

Correlación de la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos, del receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas y de la ciclooxigenasa-2 con la proliferación de células neoplásicas y la vascularización en sarcomas felinos asociados a sitios de inoculación

Correlation of fibroblast growth factor receptor, platelet-derived growth factor receptor and cyclooxygenase-2 expression with neoplastic cell proliferation and vascularization in feline vaccine-associated sarcomas

SANTELICES IGLESIAS, OA¹; ZANUZZI, CN^{2,3}; WRIGHT, C¹; DUCHENE, AG⁴; RISSO, MA⁵; RISSO, P⁵; NISHIDA, F⁶; LAVID, A⁴; ORTEGA, HH⁷; BERENGENO, AL⁷; HUBER, E⁷; PORTIANSKY, EL^{1,3}; GIMENO, EJ¹; BARBEITO, CG^{2,3}

¹Laboratorio de Análisis de Imágenes. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. ²Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. ³Consejo Nacional de Investigación, Ciencia y Tecnología (CONICET). Argentina. ⁴Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Hospital Escuela. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. ⁵Cátedra de Bioestadística, Carrera de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina. ⁶Profesional Independiente. CABA, Argentina. ⁷Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVer-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina.

RESUMEN

Los sarcomas felinos asociados a sitios de inoculación son neoplasias mesenquimáticas que se desarrollan en sitios de inoculación de sustancias. En este trabajo se determinó la expresión inmunohistoquímica de los factores de crecimiento de fibroblastos-2 y derivado de plaquetas-B y sus receptores, en sarcomas felinos asociados y no asociados a sitios de inoculación. Ambos tipos de sarcomas expresaron estos factores de crecimiento y sus receptores. En sarcomas asociados a la inoculación la proliferación celular se correlacionó positivamente con la vascularización y con ambos factores de crecimiento. Además, el grado de anaplasia se correlacionó positivamente con la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 y con el factor de crecimiento de fibroblastos, mientras que el número de vasos por campo con la expresión de ciclooxigenasa-2. La carcinogénesis de diferentes tumores se asocia con la sobreexpresión de estos factores de crecimiento. Nuestros resultados podrían justificar el uso de inhibidores de estos receptores para reducir la proliferación en este tipo de sarcomas felinos; el grado de anaplasia podría resultar de valor predictivo de la sensibilidad a inhibidores de tirosinquinazas o de ciclooxigenasa-2.

Palabras clave: (sarcomas asociados a vacunas), (factores de crecimiento), (ciclooxigenasa-2), (proliferación celular), (vascularización)

ABSTRACT

Feline inoculation site-associated sarcomas are mesenchymal neoplasms that develop at sites of inoculation of substances. In this work, the immunohistochemical expression of fibroblast growth factors-2 and platelet-derived-B growth factors and their receptors was determined in feline sarcomas associated or not associated with inoculation sites. Both types of sarcomas expressed these growth factors and their receptors. In feline sarcomas associated with inoculation, cell proliferation positively correlated with vascularization and with the expression of both growth factors. In addition, fibroblasts growth factor correlated with the degree of anaplasia, whereas the number of vessels per field with COX-2. On the other hand, the degree of anaplasia was positively correlated with cyclooxygenase-2 enzyme. The carcinogenesis of different tumors is associated with the overexpression of these growth factors. Our results could justify the use of inhibitors of these receptors to reduce proliferation in this type of feline sarcoma; the degree of anaplasia could be of predictive value for sensitivity to tyrosine kinase or cyclooxygenase-2 inhibitors.

Keywords: (vaccine-associated sarcoma), (growth factors), (cyclooxygenase-2), (cell proliferation), (vascularization)

INTRODUCCIÓN

Los sarcomas felinos asociados a sitios de inoculación (SSI) son neoplasias mesenquimáticas que se desarrollan en sitios de inyección de vacunas u otros productos, como resultado de una respuesta inflamatoria intensa y persistente motivada por diversos inóculos que conduciría a la transformación neoplásica de fibroblastos²⁶. Por lo tanto, el diagnóstico de SSI se basa en su localización y en sus características histológicas, neoplasia compuesta por células mesenquimáticas, pleomórficas, con una intensa respuesta inflamatoria asociada en la que predominan linfocitos y macrófagos²⁴. Por otro lado, se consideran sarcomas no asociados a sitios de inoculación (NSSI) a aquellos en sitios no relacionados con la inoculación de sustancias²³.

Estas neoplasias no presentan predilección sexual, aparecen en gatos desde los 3 años de edad, aunque la edad promedio de aparición es de 8,1 años, menor a la de los sarcomas no asociados a sitios de vacunación que surgen a una edad promedio de 9,2 años. Además, los NSSI son menos agresivos y recidivantes²⁴. La inestabilidad genética y epigenética de las células neoplásicas malignas podría llevar a la sobreproducción de factores de crecimiento, incluidos el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), que participan en la proliferación, migración y diferenciación celular. Ambos factores de crecimiento activan receptores de tirosinquinasa (TK) en la superficie celular^{4,30}.

FGF-2 y PDGF se coexpresan en tumores mesenquimáticos. Su expresión se asocia con la

progresión neoplásica y la capacidad metastásica. Su acción es sinérgica y la coexpresión promueve más el crecimiento tumoral que cada uno de los factores por separado⁴. FGF-2 está íntimamente relacionado con los procesos inflamatorios, la angiogénesis y el desarrollo de tumores mesenquimales^{2,30}. PDGF está implicado en la patogenia de leucemias, gliomas, sarcomas y carcinomas en humanos, al actuar sobre el crecimiento, la angiogénesis, la invasividad local y la metástasis². Se han descrito, en numerosas neoplasias humanas, mutaciones activadoras de receptores de PDGF y FGF. Los pacientes con este tipo de mutaciones responden favorablemente al tratamiento con inhibidores de TK^{19,28}.

Las células inflamatorias que infiltran las neoplasias malignas secretan citocinas y proteasas, como metaloproteinasas, que colaboran con la angiogénesis y, por lo tanto, con el crecimiento de las células neoplásicas y las metástasis⁴. Además, las citocinas y prostaglandinas pueden inducir la liberación de FGF-2 por parte de las células tumorales. La secreción de PDGF y FGF2 estimula la síntesis y activación de la fosfolipasa A2^{5,6,7}, y la actividad y expresión de la enzima proinflamatoria ciclooxigenasa 2 (COX-2)⁵.

La enzima COX-2 fue hallada en neoplasias en humanos y en animales^{11,25}. Los SSI expresan COX-2^{5,17,22} y la expresión de COX-2 se correlaciona positivamente con el grado de inflamación (GI) de estas neoplasias, siendo mayor en aquellos SSI con mayor GI y menor en los muy indiferenciados²².

Teniendo en consideración la relevancia biológica de estos factores de crecimiento en la carcinogénesis y la limitada información sobre

ellos en la patogenia de los SSI, en el presente trabajo estudiamos la inmunolocalización de los receptores de FGF y PDGF y de sus ligandos, y la correlación de dichos receptores con la proliferación, vascularización y expresión de COX-2 en SSI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (62-5-17T CICUAL-Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio-). Se utilizaron 54 casos diagnosticados como SSI por dos patólogos expertos y 10 casos diagnosticados como sarcomas no asociados a sitios de inoculación (NSSI). Estos últimos, ubicados en base de la oreja, almohadilla plantar, anca, carpo, distal de la tibia, dedo, globo ocular (2) y región retro ocular (2). Las variables grado de inflamación (GI), grado de anaplasia (GA), expresión de COX-2 y porcentaje de células proliferantes (PCP) aquí utilizadas se obtuvieron en trabajos previos^{22,24}.

Histopatología

El GA se determinó utilizando un esquema que toma en cuenta la diferenciación celular, el índice mitótico y el grado de necrosis, y permite asignar un puntaje y clasificar las neoplasias en tres grados (I, II, y III)²⁴.

El GI se estableció al evaluar el infiltrado linfocitario peritumoral a baja magnificación (4X), estableciéndose los siguientes grados de inflamación: 0=ausencia de infiltrado linfocitario peritumoral, 1=escaso infiltrado linfocitario, 2=infiltrado difuso o pequeños agregados en menos del 50 % de los campos, y 3=agregados linfocitarios en el 50 % de los campos o más²⁴.

Inmunohistoquímica

Secciones de parafina de tres μm de espesor se montaron en portaobjetos positivados (HistoSystem, Rosario, Argentina). Se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en una batería de alcoholes de concentración decreciente. Se incubaron con metanol- H_2O_2 al 3 %, para inhibir la peroxidasa endógena (30 minutos a temperatura ambiente) y se lavaron con solución tampón fosfato (PBS), pH 7,4. La recuperación de antígenos se realizó en dos ciclos de calentamiento en microondas de 3 minutos, en citrato pH 6,0 para FGF-2 y PDGF-B; para sus receptores y CD31 no se

realizó recuperación antigénica. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % (30 minutos a temperatura ambiente), en cámara húmeda. Se utilizaron anticuerpos primarios policlonales de conejo diluidos en BSA al 1 %: anti-PDGFR α 1:100 [MBS301499] (MyBioSource, San Diego); anti-FGFR-2 1:100 (Lifespan BioSciences Inc., Seattle); anti-FGF-2 1:50 [ab126861] (Abcam, Cambridge); anti-PDGF-B 1:100 [sc-127] (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz) y anti-CD31 1:25 [ab28364] (Abcam, Cambridge). Se utilizó como anticuerpo secundario y sistema de amplificación Dako EnVision+ Dual Link System-HRP® (DakoCytomation, Carpinteria, California) para FGFR-2 y PDGFR α . Como control de especificidad de los anticuerpos se reemplazó cada anticuerpo primario con PBS, pH 7,4. Como control tisular negativo se utilizaron áreas no neoplásicas o no vasculares de cada muestra. Como controles tisulares positivos, se utilizaron: riñón de perro y gato para PDGFR α ¹⁰, estómago de rata para FGFR-2¹⁴ y vasos sanguíneos dérmicos de gato para CD31. Se utilizó tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobencidina (DAB) (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) como cromógeno y hematoxilina tinción de contraste nuclear.

La inmunotinción para PDGFR α y FGFR-2 se evaluó estimando el porcentaje de células con marcación citoplasmática en 10 campos observados con un objetivo de 40X. Las imágenes se capturaron utilizando una cámara digital (Sony DXC-390) montada en un microscopio trinocular (CX31, Olympus, Japón) y conectada a una computadora. Luego, se procesaron mediante un analizador de imágenes digital (ImagePro Plus v6.3, Media Cybernetics, MD). La inmunomarcación para FGF-2 y PDGF-B se evaluó cualitativamente (marcación positiva o negativa), tanto para células neoplásicas como para vasos sanguíneos.

El número de vasos (Vpc: vasos por campo-cantidad de vasos/campo=0,5 mm^2 -), el área vascular (AV, en $\text{mm}^2/10$ campos=5 mm^2), el AV/c= área vascular por campo (AV/c, mm^2/campo =0,5 mm^2) y la densidad vascular por campo (DV/c, número de vasos/área del campo=0,5 mm^2), se evaluaron en secciones marcadas con anticuerpos anti-CD31¹. Se analizaron diez imágenes digitales de cada muestra, utilizando un objetivo de 20X. Se descartaron las áreas necróticas. La cuantificación se realizó manualmente.

La expresión de COX-2 se evaluó mediante técnicas inmunohistoquímicas y se estimó el porcentaje de células positivas al contar células con marca citoplasmática positiva en imágenes de 10 campos a 40X²².

El porcentaje de células proliferantes (PCP) se evaluó mediante la inmunomarcación con anticuerpo anti-PCNA, estimando el porcentaje de células con marcación nuclear positiva, al contar estas sobre imágenes digitales tomadas en diez campos a una magnificación de 40X²⁴.

Análisis estadístico

Se aplicó la metodología de correlación bayesiana mediante el software JASP (<https://jasp-stats.org/>)²⁰. El nivel de significancia considerado fue $P < 0,05$.

RESULTADOS

La expresión de PDGFR α y FGFR2 se localizó en el citoplasma de las células neoplásicas de los SSI. Sin embargo, también se observó marcación positiva de FGFR2 en el núcleo (Figura 1). PDGFR α (Figura 2) se expresó en el 100 % y FGFR2 en el 50% de los SSI. Además, FGF-2 y PDGF-B (Figura 3) se expresaron en el 100 % de los SSI, en el citoplasma de células neoplásicas y vasculares. En algunas células neoplásicas, se observó inmunomarcación nuclear para FGF2 (Figura 4). El 90 % de los NSSI fueron positivos para PDGFR α y el 70 % para FGFR-2. La correlación estadística entre las variables se muestra en la Tabla 1.

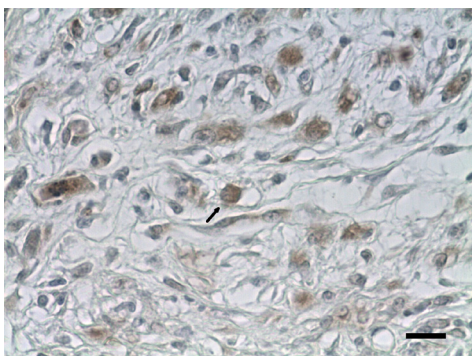


Figura 1. Inmunomarcación para FGFR2 en células neoplásicas en SSI. La flecha señala núcleos con marca positiva. Barra = 25 μ m.

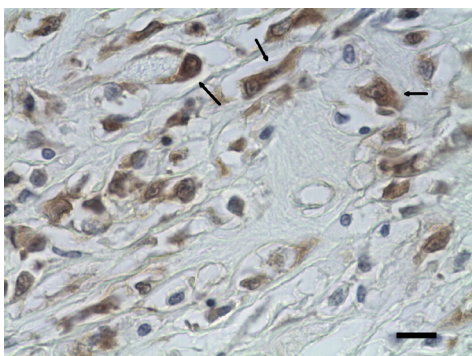


Figura 2. Inmunomarcación citoplasmática para PDGFR α en células neoplásicas en SSI. La flecha señala células con marca positiva. Barra = 25 μ m.

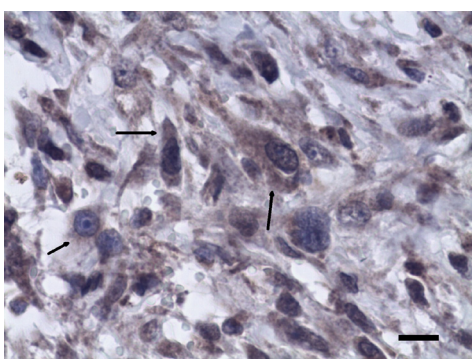


Figura 3. Inmunomarcación citoplasmática para PDGF-B en células neoplásicas en SSI. La flecha señala células con marca positiva. Barra = 25 μ m.

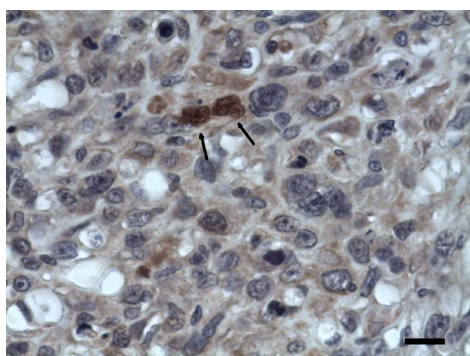


Figura 4. Inmunomarcación positiva para FGF2 en células de SSI. La flecha señala un núcleo con marca positiva. Barra = 25 µm.

Tabla 1. Correlación Bayesiana. Correlación entre variables.

Variable 1	Variable 2	Pearson cc	valor- p ⁽¹⁾
FGFR-2	GA	0,278	0,0210
FGFR-2	GI	-0,027	0,5760
FGFR-2	COX-2	0,184	0,0920
PDGFRα	GA	0,137	0,1610
PDGFRα	GI	0,066	0,3180
PDGFRα	COX-2	0,21	0,0630
Vpc	PCP	-0,123	0,1890
Vpc	COX-2	0,255	0,0310
Vpc	FGFR-2	-0,007	0,4790
Vpc	PDGFRα	-0,242	0,0390
AV	PCP	0,303	0,0130
AV	COX-2	0,077	0,2910
AV	FGFR-2	0,033	0,4060
AV	PDGFRα	0,062	0,3280
AV/c	PCP	0,252	0,0330
AV/c	COX-2	0,203	0,0710
AV/c	FGFR-2	0,066	0,3170
AV/c	PDGFRα	-0,023	0,5660
DV/c	PCP	0,252	0,0330
DV/c	COX-2	0,203	0,0710
DV/c	FGFR-2	0,066	0,3170
DV/c	PDGFRα	-0,023	0,5660
Vpc	GA	-0,084	0,7260
Vpc	GI	0,09	0,2590
AV	GA	-0,059	0,6650
AV	GI	-0,055	0,6530
AV/c	GA	-0,153	0,8650
AV/c	GI	0,083	0,2750
DV/c	GA	-0,153	0,8650
DV/c	GI	0,083	0,2750
FGFR-2	PDGFRα	0,212	0,0620
FGFR-2	PCP	0,359	0,0350
PDGFRα	PCP	0,305	0,0120

(1) Valor-**p** < **0,05** indica correlación estadísticamente significativa.

Referencias: Pearson cc: coeficiente de correlación de Pearson. GA: grado de anaplasia (I, II, III). GI: grado de inflamación (0, 1, 2, 3). FGFR-2: expresión de FGFR-2(%). PDGFRα: expresión de PDGFRα (%). COX-2: expresión de COX-2 (%). Vpc: vasos por campo (cantidad de vasos/campo=0,5 mm²). AV= área vascular (mm²/10 campos=5 mm²). AV/c= área vascular por campo (mm²/campo=0,5 mm²). DVc= densidad vascular por campo (número de vasos/campo=0,5 mm²). PCP= porcentaje de células proliferantes (%).

DISCUSIÓN

La principal hipótesis sobre el origen de los SSI es la transformación maligna de los fibroblastos reactivos que se produce en el contexto de una respuesta inflamatoria crónica en los lugares de inyección²⁶.

En trabajos previos hemos demostrado que existe una correlación significativa entre el grado de inflamación y la expresión de COX-2 en SSI, y que la expresión de COX-2 es menor cuanto mayor GA tengan estos tumores^{22, 24}. En el presente estudio se demostró que los SSI expresan PDGFR α y FGFR-2. Sin embargo, ambos receptores también se expresaron en NSSI, en contraste con los resultados de Hendrick¹² quien no especificó el tipo de monómero (α o β) evaluado. Aquí, se evaluó al monómero α , pero no se pudo determinar si el monómero β también está presente en las muestras SSI y NSSI.

También, hemos demostrado que los SSI expresan el receptor y los ligandos FGF-2 y PDGF-B. Por lo tanto, se puede confirmar que estas neoplasias coexpresan tanto receptores como ligandos de factores de crecimiento, siendo posible la activación autocrina como postulan otros autores^{12, 13}.

Si bien FGF-2 activa mecanismos canónicos relacionados con la función TK de su receptor, la inmunomarcación nuclear observada para FGF-2 y su receptor sugiere la participación de mecanismos no canónicos, que han sido previamente descritos y que pueden implicar la translocación del receptor y su ligando a nivel nuclear para promover la transcripción de ADN, y el incremento de la proliferación¹⁸, como se ha informado en neoplasias humanas²⁷.

Recientemente, estudios experimentales *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la pentraxina, un inhibidor de la vía de FGF, reduce la proliferación celular y el crecimiento tumoral en fibrosarcomas humanos²¹. Dado que la expresión de FGFR-2 y PDGFR α se correlaciona positivamente con el porcentaje de células proliferantes, como ocurre en otras neoplasias y en fibroblastos normales, las vías de señalización de FGF y PDGF podrían participar en la promoción de la proliferación celular en SSI^{4, 18}. Estos resultados destacan el uso potencial de los inhibidores de estas TK para reducir la proliferación en SSI^{15, 19}.

Tanto con la prueba de correlación, como con la de análisis de varianza²³, se demostró asociación entre FGFR-2 y GA. La primera muestra que a mayor GA mayor es la expresión de FGFR-2. El análisis de varianza comprueba que el grupo con GA I expresa el receptor en menor cuantía²³.

La misma asociación entre GA y PDGFR α se demuestra en la prueba de análisis de varianza. Los sarcomas con menor GA expresan menos este receptor²³, sin embargo en el presente trabajo, no se pudo establecer correlación entre GA y PDGFR α . Por lo tanto, sabemos que los SSI de menor GA (GA I) expresan menos los receptores de los factores de crecimiento estudiados²³. De modo inverso, los tumores con mayor GA expresaron menos COX-2²⁴. A partir de estos resultados, proponemos que el GA podría utilizarse como predictor de la sensibilidad de cada sarcoma a las terapias con inhibidores de TK o de COX-2.

La vascularización es fundamental para la viabilidad del tejido neoplásico ya que crea un microambiente favorable para la supervivencia y proliferación de las células tumorales⁸. Esto podría explicar la correlación positiva encontrada entre la densidad vascular y el área vascular por campo y el porcentaje de células proliferantes registrada en las muestras de SSI. La correlación positiva entre el número de vasos por campo y la expresión de COX-2 podría deberse al potencial proangiogénico de los mediadores inflamatorios sintetizados en la vía de COX-2. Las prostaglandinas producidas en esta vía participan en la formación de vasos en la progresión tumoral²⁹. Con base en estos datos, se puede postular que los inhibidores de COX-2, de baja toxicidad, utilizados en los protocolos de quimioterapia conducirían a un efecto antiangiogénico¹⁶.

A diferencia de otras vías de factores de crecimiento asociadas con TK, como la del VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular)⁹, no se encontró asociación entre la expresión de COX-2 y los receptores de los factores de crecimiento aquí estudiados. Hasta el momento, no hemos encontrado datos de asociación entre estas variables en SSI, por lo que no es posible comparar nuestros resultados con otros.

En diversos tumores caninos y felinos, incluidos los mastocitomas, tumores del estroma gastrointestinal y hemangiosarcomas, existen mutaciones y desregulaciones de las TKs³. Como resultado, los inhibidores de TK, tales como el imatinib (Novartis; también conocido como Gleevec o Glivec), están cambiando actualmente el enfoque terapéutico sobre tumores malignos en perros y gatos. Imatinib inhibe la actividad de varias TK, incluida la PDGFR, y ha mostrado actividad antitumoral con toxicidad tolerable en mastocitomas de perros y gatos³.

Futuras investigaciones deberían dirigirse a evaluar los inhibidores de TK y COX-2 en protocolos de quimioterapia en SSI, debido su potencial antiproliferativo y antiangiogénico, respectivamente. El GA podría tener valor predictivo en cuanto a la sensibilidad al tratamiento.

CONCLUSIONES

Las vías de FGF-2, PDGF-B y COX-2 en SSI están correlacionadas con la alta proliferación de células neoplásicas y la vascularización del tumor. Estos hallazgos posibilitarían establecer terapias antiproliferativas y antiangiogénicas para los SSI.

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez Martín, M.J.; Esquivias López-Cuervo, J.; O'Valle Ravassa, F.; Caballero Morales, T. Angiogénesis y desmoplasia en cáncer de colon. X Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 2009. En http://www.conganat.org/10congreso/trabajo.asp?id_trabajo=2052, consultado 19 de julio de 2023
2. Andrae, J.; Gallini, G.; Betsholtz, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008; 22:1276–1312.
3. Bonkobara, M. Dysregulation of tyrosine kinases and use of imatinib in small animal practice. *Vet J.* 2015; 205: 180-8.
4. Cao, Y.; Cao, R.; Hedlund, E.M. Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *J Mol Med.* 2008; 86: 785-789.
5. Carneiro, C.S.; Queiroz, G.F.; Pinto, A.C.; Dagli, M.L.; Matera, J.M. Feline injection site sarcoma: immunohistochemical characteristics. *J Feline Med Surg.* 2018; 1:1–8.
6. Cha, Y.I.; DuBois, R.N. NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2. *Annu Rev Med.* 2007; 58: 239-252.
7. Chen, Q.R.; Miyaura, C.; Higashi, S.; et al. Activation of cytosolic phospholipase A2 by platelet-derived growth factor is essential for cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 synthesis in mouse osteoblasts cultured with interleukin-1. *J Biol Chem.* 1997; 272: 5952-5958.
8. Cullen, J.M.; Page, R.; Misdorff, W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. En: Meuten DJ. Tumors in domestic animals, 4ta Edición, Iowa, USA, Ed. Blackwell Publishing. 2002. p. 3-44.
9. Gallo, O.; Franchi, A.; Magnelli, L.; et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia.* 2001; 3:53-61.
10. Gesualdo, L.; Di Paolo, S.; Milani, S.; et al. Expression of platelet-derived growth factor receptors in normal and diseased human kidney. An immunohistochemistry and in situ hybridization study. *J Clin Invest.* 1994; 94:50-8.
11. Gregório, H.; Magalhães, T.R.; Pires, I.; Prada, J.; Carvalho, M.I.; Queiroga, F.L. The role of COX expression in the prognostication of overall survival of canine and feline cancer: A systematic review. *Vet Med Sci.* 2021; 7:1107-1119.
12. Hendrick, M.J. Feline vaccine-associated sarcomas. *Cancer Invest.* 1999; 17: 273-7.
13. Hendrick, M.J. Musings on feline injection site sarcomas. *Vet J.* 2011; 188:130-131.
14. Hughes, S.E. Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45: 1005–1019.
15. Kadivar, A.; Ibrahim Noordin, M.; Aditya, A.; et al. Antiproliferative effects of imatinib mesylate on ZR 75 1 and MDA MB 231 cell lines via PDGFR β , PDGF BB, c Kit and SCF expression. *Int J Mol Med.* 2018; 42: 414-424.
16. Kongara, K.; Chambers, J.P. Robenacoxib in the treatment of pain in cats and dogs: safety, efficacy, and place in therapy. *Vet Med (Auckl).* 2018; 9: 53-61.
17. Lu, C.H.; Yu, S.H.; Wu, C.H.; et al. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor robenacoxib on primary cells derived from feline injection-site sarcoma. *J Cell Mol Med.* 2023; 1-11.
18. Nugent, M.A.; Iozzo, R.V. Fibroblast growth factor-2. *The International J Biochem Cell Biol.* 2000; 32: 115-120.
19. Patani, H.; Bunney, T.D.; Thiyagarajan, N.; et al. Landscape of activating cancer mutations in FGFR kinases and their differential responses to inhibitors in clinical use. *Oncotarget.* 2016; 7:24252-68.
20. Risso, M.A.; Risso, P. Capítulo I. El teorema de Bayes. En: Risso MA, Risso P. Una introducción a la estadística bayesiana: uso de lenguaje R y WinBUGS, 1ra Edición, La Plata, Argentina, Ed. Vuelta a casa. 2017. p. 113-126.
21. Rodrigues, P.F.; Matarazzo, S.; Maccarinelli, F. et al. Long Pentraxin 3-Mediated Fibroblast Growth Factor Trapping Impairs Fibrosarcoma Growth. *Front Oncol.* 2018;8:472.

22. Santelices Iglesias, O.A.; Wright, C.; Duchene, A.G.; *et al.* Association between degree of anaplasia and degree of inflammation with the expression of COX-2 in feline injection site sarcomas. *J Comp Path.* 2018; 165: 45-51.
23. Santelices Iglesias, O.A. Caracterización de sarcomas felinos en sitios de inoculación vacunal en la República Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2019. 133p.
24. Santelices Iglesias, O.A.; Wright, C.; Duchene, A.G.; *et al.* Estudios histopatológicos y seguimiento clínico de sarcomas felinos asociados a sitios de inoculación. *Analecta Vet.* 2019; 39(2):1526.
25. Sharma-Walia, N.; Patel, K.; Chandran, K.; *et al.* COX-2/PGE2: molecular ambassador of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus oncoprotein-v-FLIP. *Oncogenesis.* 1012; 1-21.
26. Spugnini, E.P.; Vincenzi, B.; Carocci, F.; Bonichi, C.; Menicagli, F.; Baldi, A. Combination of bleomycin and cisplatin as adjuvant electrochemotherapy protocol for the treatment of incompletely excised feline injection-site sarcomas: A retrospective study. *Open Vet J.* 2020; 10(3):267-271.
27. Tsimafeyeu, I.; Naumova, A.; Stepanova, E.; *et al.* FGFR2 expression to predict survival outcome in patients with metastatic papillary renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2017; 34: 506-506.
28. Velghe, A.I.; Van Cauwenberghe, S.; Polyansky, A.A.; *et al.* PDGFRA alterations in cancer: characterization of a gain-of-function V536E transmembrane mutant as well as loss-of-function and passenger mutations. *Oncogene.* 2014; 33:2568-76.
29. Williams, C.; Mann, M.; DuBois, R. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene.* 1999; 18: 7908-7916.
30. Xie, Y.; Su, N.; Yang, J.; *et al.* FGF/FGFR signaling in health and disease. *Sig Transduct Target Ther.* 2020; 5:181.