

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**SÍLVIA TRINDADE PEREIRA**

**SARCOMA DE APLICAÇÃO FELINO: AVALIAÇÕES HISTOMORFOLÓGICA,  
IMUNOFENOTÍPICA E TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

**BELO HORIZONTE**

**2014**

**SÍLVIA TRINDADE PEREIRA**

**SARCOMA DE APLICAÇÃO FELINO: AVALIAÇÕES HISTOMORFOLÓGICA,  
IMUNOFENOTÍPICA E TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias

**Orientador:** Prof. Dr. Roberto Baracat de Araujo

**Co-orientadora:** Dra. Gleidice Eunice Lavalle

**Belo Horizonte**

**Escola de Veterinária – UFMG**

**2014**



Folha de assinaturas

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas oportunidades colocadas em minha vida, e pela força para aproveitá-las.

Ao Prof. Roberto Baracat, pela orientação e por todo o apoio, essenciais a este trabalho.

À Dra. Gleidice Lavallo, por ter aceitado o desafio de minha co-orientação. Já te disse uma vez que você é meu exemplo de mãe e profissional, e a cada dia te admiro mais!

Ao Prof. Geovanni Cassali, por toda a colaboração na elaboração do projeto e avaliação dos casos e por abrir as portas de seu laboratório para que nossas análises pudessem ser realizadas.

À doutoranda e amiga Cecília Bonolo, pela ajuda em todo o projeto e nas imuno-histoquímicas, que acabavam se tornando tarefas menos exaustivas, devido à ótima companhia.

Ao doutorando Conrado Gamba, pelas várias sugestões ao projeto e por todas as tardes à frente do microscópio, avaliando nossas lâminas.

Ao doutorando Rodrigo Horta, pela ajuda na seleção dos casos, na estatística e nas minhas várias dúvidas.

À doutoranda Luciana Fachini, pela ajuda inestimável, e por me receber sempre com um sorriso no rosto, em meio às diversas atividades que eu interrompia.

À toda a equipe do Laboratório de Patologia Comparada do ICB, sempre prestativos e dispostos a dar toda a ajuda necessária no mundo dos laboratórios, até então desconhecido para mim.

À equipe do Hospital Veterinário da UFMG, que adoro e que sempre me recebeu muito bem.

Ao Setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG, por permitir a avaliação de amostras de seu arquivo.

À Profa. Patrícia Coletto, pela orientação no início do mestrado. Infelizmente, forças alheias às nossas vontades nos impediram de terminar o trabalho juntas.

Aos Profs. Adriane Costa Val e Rubens Carneiro, meus pais acadêmicos, e aos Profs. Fabíola Paes Leme, Fernando Bretas, Júlio Cambraia, Paulo Ricardo Paes, Suzane Beier, a quem recorri em diversos momentos desta trajetória.

Aos meus pais, razão de todo este trabalho. Pai, você sempre será meu maior exemplo de dedicação e amor à profissão. Mãe, sua serenidade, alegria e amor por todas as pessoas sempre serão minha maior lição de vida.

À minha irmã, também minha melhor amiga, pelo apoio de sempre. A cada dia me orgulho mais de você. Aos meus familiares, pelo amor e torcida.

Aos meus queridos sócios e a toda a equipe da MedVet, pela paciência e apoio que foram essenciais para que eu pudesse completar esta etapa.

Aos amigos do colégio, da faculdade, da vida. Nossos momentos juntos, de relaxamento, diversão, e também de muito crescimento pessoal, foram essenciais para aliviar a tensão do dia a dia nestes últimos meses.

Aos animais, minha paixão e a motivação para seguir em frente!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	09
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
2.1. Histórico e epidemiologia .....	10
2.2. Patogenia .....	11
2.3. Características clínicas .....	12
2.4. Diagnóstico .....	12
2.5. Características histológicas .....	13
2.6. Avaliações Complementares .....	13
2.7. Fatores prognósticos .....	15
2.8. Tratamento .....	16
2.9. Prevenção .....	16
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>4. HIPÓTESES</b> .....	17
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	17
5.1. Objetivo geral .....	17
5.2. Objetivos específicos .....	17
<b>6. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
<b>7. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	18
ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA DO SARCOMA DE APLICAÇÃO FELINO .....	19
ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO ADJUVANTE NO TRATAMENTO DE SARCOMA DE APLICAÇÃO FELINO .....	35
ARTIGO 3 (COMUNICAÇÃO): EXÉRESE DE NÓDULOS INFLAMATÓRIOS PÓS APLICAÇÃO EM FELINOS: UMA INTERVENÇÃO PREVENTIVA?– RELATO DE TRÊS CASOS .....	48
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	53
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54
<b>10. ANEXOS</b> .....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (Artigo 1)	Felino. Sarcomas de Aplicação.	27
Figura 2 (Artigo 1)	Felino. Sarcomas de Aplicação.	28
Figura 3 (Artigo 1)	Felino. Sarcomas de Aplicação.	30
Figura 1 (Artigo 2)	Curvas de sobrevida global de pacientes com sarcoma de aplicação felino tratados com cirurgia isolada ou com associação de cirurgia e quimioterapia	42
Figura 2 (Artigo 2)	Curvas de intervalo livre de doença de pacientes com sarcoma de aplicação felino tratados com cirurgia isolada ou com associação de cirurgia e quimioterapia	42
Figura 1 (Artigo 3)	Felino. Nódulo Pós Aplicação	50
Figura 1 (Anexo 1)	Locais indicados pela VAFSTF para administração de vacinas em felinos	58

---

**LISTA DE TABELAS E QUADROS**

---

Tabela 1 (Artigo 1)	Avaliação da graduação histológica do Sarcoma de Aplicação Felino (SAF)*	22
Tabela 2 (Artigo 1)	Avaliação imunohistoquímica em pacientes com Sarcoma de Aplicação Felino (SAF) – anticorpos e metodologia utilizados	25
Tabela 3 (Artigo 1)	Histopatologia, imunohistoquímica e evolução clínica dos 16 casos de Sarcoma de Aplicação Felino (SAF)	26
Tabela 1 (Artigo 2)	Descrição dos casos de felinos com sarcoma de aplicação em acompanhamento clínico	44
Quadro 1 (Anexo 1)	Protocolo de vacinação recomendado pela VAFSTF	60

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>Cox</b>	Ciclooxigenases
<b>Cox-2</b>	Ciclooxigenases 2
<b>CD-31</b>	<i>Cluster of differentiation 31</i>
<b>CD-34</b>	<i>Cluster of differentiation 34</i>
<b>CD-105</b>	<i>Cluster of differentiation 105</i>
<b>CGA</b>	Campos de grande aumento
<b>Cm</b>	Centímetros
<b>DAB</b>	3,3-Diaminobenzidina
<b>FeLV</b>	Vírus da Leucemia Felina
<b>FGF-B</b>	Fator de crescimento fibroblástico básico
<b>FIV</b>	Virus da Imunodeficiência Felina
<b>HE</b>	Hematoxicilina-Eosina
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biológicas
<b>ILD</b>	Intervalo livre de doença
<b>PCR</b>	Reação da polimerase em cadeia
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado das plaquetas
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina 2
<b>SAF</b>	Sarcoma de Aplicação Felino
<b>SG</b>	Sobrevida global
<b>TGPF</b>	Fator transformador do crescimento
<b>UFMG</b>	Univerdade Federal de Minas Gerais
<b>VAFSTF</b>	<i>Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force</i>

## RESUMO

O Sarcoma de Aplicação Felino (SAF) é uma neoplasia de origem mesenquimal caracterizada pelo comportamento biológico agressivo, que se desenvolve em regiões onde foram previamente administradas vacinas ou medicamentos. Apresenta baixa prevalência, mas as taxas de recorrência alcançam até 80%, mesmo após tratamentos agressivos. Os SAF apresentam sensibilidade *in vitro* a doxorubicina, mitoxantrone, vincristina e paclitaxel, mas seu papel no tratamento clínico da doença ainda não está bem definido. Os objetivos deste trabalho foram contribuir para o estudo do comportamento biológico dos SAF através da avaliação de suas características histomorfológicas e imunofenotípicas e avaliar o perfil dos pacientes com SAF na região metropolitana de Belo Horizonte e a eficácia do tratamento cirúrgico comparado ao tratamento cirúrgico associado à quimioterapia. Realizou-se análise histopatológica e imunohistoquímica para os marcadores Cox-2 e Ki-67 em 16 amostras de SAF. O fibrossarcoma foi o subtipo histológico observado com maior frequência. Houve correlação negativa ( $p = 0,05$ ) entre a graduação histológica e o intervalo livre de doença, sendo que pacientes com SAF grau I apresentam maior tempo para recorrência do que os de grau II. A expressão de Cox-2 ocorreu em 81,25% tumores, havendo correlação positiva moderada entre Cox-2 e graduação tumoral ( $p = 0,028$ ;  $r = 0,546$ ), sugerindo que Cox-2 possa estar envolvida na progressão da neoplasia. O índice mitótico e a expressão de Ki-67 foram considerados baixos. Houve correlação negativa moderada entre a expressão de Ki-67 e a vascularização tumoral ( $p = 0,122$ ;  $r = - 0,450$ ) que podem sugerir que o crescimento tumoral ocorre em proporção maior que a sua angiogênese, resultando em morte celular em determinadas áreas. Realizou-se estudo retrospectivo de 22 casos de SAF para avaliação do perfil dos pacientes e da eficácia do tratamento cirúrgico (G1) comparado ao tratamento cirúrgico associado à quimioterapia (G2). A complementação quimioterápica foi realizada com carboplatina, na dose de  $200\text{mg}/\text{m}^2$  a cada 21 dias ou com doxorubicina, na dose de  $1\text{mg}/\text{kg}$  a cada 21 dias, ambas administradas por via endovenosa por quatro ciclos. A idade média dos pacientes foi de 7,8 anos e não foi observada predisposição de raça ou sexo. O tempo entre a percepção do nódulo e a busca por atendimento médico veterinário foi considerado alto, com média de 140,11 dias. Observou-se histórico de vacinação no local do tumor em cinco pacientes e de aplicação de anticoncepcional em um, podendo ser este o primeiro relato de SAF associado a anticoncepcionais. O acompanhamento clínico foi realizado em 13 pacientes, por um período médio de 544 dias (30 - 1975 dias). Cinco (38,5%) pacientes foram submetidos somente à cirurgia e oito (61,5%) receberam também quimioterapia adjuvante. A recorrência local do tumor ocorreu em 100% dos pacientes, independentemente do tratamento realizado. A sobrevida global foi de 450 dias para G1 e 850 dias para G2 e o intervalo livre de doença foi de 221 e 180 dias para os G1 e G2, respectivamente. A análise estatística do prognóstico de pacientes tratados ou não com quimioterapia não foi significativa, entretanto observou-se diferença importante nas médias e tendência a ocorrência de influência positiva do tratamento complementar. Sugere-se que o comportamento agressivo dos SAF pode estar mais relacionado ao seu caráter invasivo do que à intensa proliferação celular. A graduação tumoral pode ser um fator prognóstico para o intervalo livre de doença em pacientes com SAF de grau baixo a intermediário.

Palavras chave: Oncologia, Ki-67, Cox-2, Carboplatina, Doxorubicina, Prognóstico.

## 1. INTRODUÇÃO

O sarcoma de aplicação felino é uma doença desafiadora para a medicina veterinária, devido a sua possível conexão com a vacinação e outros procedimentos realizados pelos médicos veterinários em seus pacientes (Kirpensteijn, 2006). Além disso, o tratamento da doença pode apresentar alto custo, estar associado a considerável morbidade e frequentemente não ser bem sucedido (Morrison e Starr, 2001).

Os sarcomas que se desenvolvem nos locais de vacinação, ou em suas adjacências, podem ser denominados sarcomas induzidos por vacinas, associados a vacinas ou a locais de vacinação, ou pós vacinais (Davidson *et al.*, 1997). Recentemente, esses tumores receberam a denominação de sarcomas associados a locais de aplicação, pelo fato de que eles também podem ocorrer após a administração parenteral de vários medicamentos (Ladlow, 2013). Neste trabalho, será utilizada a terminologia Sarcoma de Aplicação Felino (SAF).

A maioria das organizações envolvidas com as questões científicas e éticas relacionadas ao SAF concordam que o melhor entendimento de sua patogênese e epidemiologia é essencial para que os médicos veterinários possam optar pela melhor conduta terapêutica e preventiva (Kirpensteijn, 2006; Carneiro *et al.*, 2008).

Neste trabalho foram avaliadas as características histopatológicas, de expressão de COX-2 e Ki-67 e o intervalo livre de doença e sobrevida global de pacientes com SAF submetidos ou não à quimioterapia adjuvante ao tratamento cirúrgico. Avaliou-se ainda o prognóstico de pacientes com granulomas pós-aplicação tratados cirurgicamente como forma de prevenção do SAF.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Histórico e epidemiologia

Os sarcomas de tecidos moles são um grupo de neoplasias de origem mesenquimal, que possuem comportamento biológico similar e podem se desenvolver a partir de uma grande variedade de tecidos: adiposo, muscular, fibroso, vascular e nervoso (Mauldin, 2007). O SAF foi inicialmente descrito por Hendrick e Goldschmidt (1991), que perceberam um grande aumento na incidência dos fibrossarcomas em felinos a partir de 1987. Este aumento coincidia com o início da obrigatoriedade da administração da vacina anti-rábica produzida a partir de vírus inativado, contendo adjuvantes, no nordeste dos Estados Unidos.

A real incidência dos SAF ainda não está bem definida (Morrison e Starr, 2001), e acredita-se que a frequência de desenvolvimento de sarcomas de tecidos moles em locais de aplicação possa ser tão alta quanto 1/1000 aplicações (Hendrick *et al.*, 1994), enquanto outros artigos relatam uma prevalência entre 1 e 3,6/10000 vacinações (Lester *et al.*, 1996). Uma pesquisa epidemiológica realizada com auxílio da internet, que envolveu 31671 gatos vacinados, relatou a ocorrência de 12 reações inflamatórias pós vacinais a cada 10000 doses, e de 0,32 casos de SAF para cada 10000 vacinações (Gobar e Kass, 2002).

Os SAF são mais prevalentes do que os sarcomas em locais onde não foram aplicadas injeções, que apresentam frequência de 20/100000 casos (MacEwen *et al.*, 2001). Um estudo retrospectivo com 345 gatos que apresentaram SAF demonstrou que o risco de um gato desenvolver um sarcoma na região interescapular (local não indicado para vacinação, atualmente) foi 50% maior do que o de um gato que não recebeu nenhuma aplicação no local, sendo que o risco para um gato que recebeu duas vacinas no mesmo local foi 127% maior e

para aqueles que receberam três ou quatro vacinas no mesmo local, o risco foi 175% maior do que o de um gato que não recebeu aplicações naquela região (Kass *et al.*, 1993).

## 2.2. Patogenia

A patogênese específica dos SAF ainda é desconhecida, mas parece envolver a estimulação de fibroblastos e miofibroblastos por adjuvantes ou outros compostos das vacinas, altamente imunogênicos. A inflamação resultante pode estar ou não associada a carcinógenos ou oncogenes, e gera a transformação neoplásica e desenvolvimento do tumor. Nestas neoplasias, podem ser identificadas zonas de transição de granuloma inflamatório para sarcoma, o que sugere fortemente que a resposta inflamatória à vacinação antecede o desenvolvimento dos sarcomas nos gatos (Hendrick *et al.*, 1994).

No passado, sugeriu-se que o desenvolvimento acelerado de sarcomas em locais de aplicação fosse compatível com o envolvimento de oncogenes virais. Porém, o vírus da leucemia felina (FeLV) não foi detectado em 130 amostras de tumores avaliadas pela técnica de imunohistoquímica e pela reação de polimerase em cadeia (PCR) (Ellis *et al.*, 1996). Outros estudos negaram o papel dos papilomavírus, herpesvírus e poliomavírus na patogênese dos SAF (Kidney *et al.*, 2000; 2001; 2001a; 2001b).

Diversos estudos demonstram que a aplicação das vacinas anti-rábica e contra o FeLV são as principais responsáveis pelo aparecimento do tumor, porém existem relatos que citam a ocorrência dos SAF após a aplicação subcutânea e intramuscular da vacina tríplice felina (parvovírus, herpesvírus-1 e calicivírus) e de fármacos como antibióticos, dexametasona, metoclopramida, corticosteroides,

antiparasitários e meloxicam (Lester *et al.*, 1996; Burton e Mason, 1997; Esplin *et al.*, 1999; Kass *et al.*, 2003; Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force, 2005; Munday *et al.*, 2011). Entretanto, não é possível descartar que tenha ocorrido vacinação prévia no local de aplicação destas substâncias. Assim, alguns pesquisadores acreditam que a implicação de agentes além das vacinas contra raiva e FeLV como causadores dos SAF pode ser infundada (Wilcock *et al.*, 2012). Um recente estudo prospectivo multicêntrico avaliou os fatores de risco para o SAF e não obteve nenhuma associação entre tipos ou marcas específicas de vacinas com o desenvolvimento dos tumores. O único fator significativamente associado ao risco de desenvolvimento do SAF foi a temperatura das vacinas no momento da aplicação, sendo as temperaturas menores associadas a um maior risco (Kass *et al.*, 2003).

A teoria mais aceita atualmente sugere que qualquer agente que cause inflamação local acentuada apresenta o potencial de desenvolver sarcoma (Hendrick *et al.*, 1994a; Jelinek, 2003). A inflamação crônica é implicada no desenvolvimento de outros sarcomas, como o “sarcoma ocular pós-traumático” em felinos (Jelinek, 2003) e o fibrossarcoma secundário a microchips em cães e gatos (Vascelari *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2008).

Nambiar *et al.* (2001) sugerem que a baixa prevalência da neoplasia em relação à quantidade de vacinas administradas pode estar relacionada a fatores inerentes a cada animal. Estes fatores podem ser genéticos ou adquiridos, envolvendo especialmente mutações em oncogenes e genes supressores de tumor. Kirpensteijn (2006) discute a diferença entre populações ao questionar a incidência extremamente baixa de SAF na Holanda, que tem uma grande população de felinos – nesse país, poucos animais são

vacinados contra raiva e FeLV. Não se sabe, entretanto, se a baixa incidência dos SAF se deve à menor frequência de vacinação ou a características específicas dos gatos daquele local.

Um modelo multifatorial de carcinogênese, incluindo fatores genéticos, iatrogênicos e locais parece ser a explicação mais plausível para a patogênese dos SAF. Os fatores genéticos que vêm sendo implicados incluem a expressão anormal do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b) e fator transformador do crescimento alfa (TGF-alpha) (Hendrick e Brooks, 1994; Kirpensteijn, 2006). A superexpressão proteica e a presença de mutações genéticas do gene p53 indicam que este tem um papel no desenvolvimento dos SAF, como já é sabido para outros tumores (Mayr *et al.*, 1998).

O intervalo entre a administração da vacina ou medicamento e a detecção do sarcoma pode ser tão curto quanto quatro meses e tão longo quanto 13 a 15 anos. A ocorrência mais provável é entre um e três anos (Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force, 2005).

### 2.3. Características clínicas

O SAF é frequentemente observado em gatos jovens, com seis a sete anos de idade, havendo outro pico de diagnósticos em animais entre 10 e 11 anos (Kass *et al.*, 1993).

Os sarcomas de aplicação ocorrem mais comumente no tecido subcutâneo, podendo se estender para a musculatura, enquanto os sarcomas não relacionados à aplicação ocorrem com maior frequência na derme. Na maioria das vezes, os SAF se aderem a planos profundos, promovendo invasão profusa dos tecidos adjacentes com projeções digitiformes (Séguin, 2002).

Clinicamente, entretanto, os SAF podem ser semelhantes aos granulomas benignos que ocorrem após injeções (Morrison *et al.*, 2001), por se tratarem de tumores sólidos e indolores (Kirpensteijn, 2006).

Os SAF são tumores muito invasivos, havendo grandes chances de recorrência, mesmo quando o cirurgião e o patologista concordam que a excisão apresenta margens livres de células neoplásicas e a intervenção aparenta ter sido curativa (Davidson *et al.*, 1997). São relatadas taxas de recorrência de até 80% (Davidson *et al.*, 1997; Hershey *et al.*, 2000; Bregazzi *et al.*, 2001).

Originalmente se acreditava que o risco de metástases era muito pequeno, mas hoje se sabe que este risco provavelmente cresce à medida que aumenta o tempo de sobrevivência do animal, podendo ocorrer em até 22% dos casos (Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force, 2005). Ainda não se sabe se o aumento no risco metastático ocorre apenas porque os gatos que vivem por mais tempo se tornam mais susceptíveis ao desenvolvimento das metástases, ou se alguns dos tratamentos realizados podem estar diretamente associados às metástases (Wilcock *et al.*, 2012). As metástases ocorrem inicialmente nos pulmões, mas foram observadas em outros sítios, como linfonodos regionais, mediastino, pericárdio, fígado, ossos, pâncreas, intestino, baço e olhos (Séguin, 2002).

### 2.4. Diagnóstico

A presença de um nódulo em um local comumente utilizado para injeções subcutâneas e intramusculares deve alertar o clínico para a possibilidade de SAF (Amorim, 2007). As amostras colhidas por meio de punção aspirativa por agulha fina e submetidas à avaliação citológica auxiliam a distinguir se um determinado processo possui natureza neoplásica ou inflamatória. No caso dos SAF, é esperado que a citologia

seja sugestiva de sarcoma (Mauldin, 1997). O infiltrado inflamatório peritumoral, que é uma das principais características dos SAF, pode dificultar a interpretação do exame citológico. Em alguns casos pode ser necessária, portanto, a realização de uma biópsia incisional para o estabelecimento do diagnóstico definitivo (Hauck, 2003). O ideal é que a amostra inclua três a cinco diferentes porções da massa tumoral para que haja material suficiente, aumentando a acurácia do exame (Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force, 2005). A biópsia excisional deve ser vista com cautela, pois a remoção incompleta dos SAF parece aumentar o risco de recorrência local (Macy e Couto, 2001).

Após o diagnóstico de SAF, é recomendada a realização de ultrassonografia abdominal e radiografias torácicas para pesquisa de metástases. É indicada também a realização de tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética, para determinação mais precisa da dimensão do tumor e planejamento da intervenção cirúrgica (Morisson e Starr, 2001).

Para avaliar o estado geral de saúde dos pacientes com câncer sugere-se a avaliação de hemograma, urinálise e exames bioquímicos completos (Amorim, 2007). O exame imunoenzimático para a pesquisa de antígenos de FeLV e anticorpos do vírus da imunodeficiência felina (FIV) também devem ser realizados, pois o curso da doença pode ser alterado devido ao comprometimento do sistema imunológico pelos vírus (McEntee e Page, 2001).

### 2.5. Características histológicas

Histologicamente, os sarcomas de aplicação são bastante variáveis. O tipo histológico predominante é o fibrossarcoma, mas histiocitoma fibroso maligno, osteossarcoma, condrossarcoma, rabdomiossarcoma, mixosarcoma e sarcoma

indiferenciado também são relatados (Hendrick e Brooks, 1994; Hershey, 2000; Couto *et al.*, 2002). Os SAF têm características histológicas únicas, quando comparados aos sarcomas não associados a locais de aplicação. Apresentam comportamento biológico mais agressivo, com intenso pleomorfismo celular e nuclear, grandes áreas de necrose tumoral e alta atividade mitótica. A presença de infiltrado inflamatório periférico, composto por linfócitos e macrófagos, também é uma das características mais marcantes dos SAF (Hendrick e Brooks, 1994; Doddy *et al.*, 1996). Os macrófagos nestes infiltrados frequentemente contém um material que é identificado como alumínio e oxigênio, que são componentes dos adjuvantes de diversas vacinas contendo vírus inativados (Hendrick *et al.*, 1994; Morrison e Starr, 2001).

### 2.6. Avaliações complementares

A angiogênese é definida como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, sendo crucial na fisiologia e processos patológicos em diversas doenças, incluindo neoplasias (Craft e Harris, 1994). Diversas evidências associam a atividade angiogênica a piores prognósticos, em determinados tumores (Sharma *et al.*, 2005). A vascularização promove o crescimento tumoral, pois novos vasos permitem a troca de nutrientes, oxigênio e catabólitos, onde a difusão simples destas substâncias em uma população celular elevada torna-se inadequada (Weidner, 1995). A densidade microvascular se constitui no valor médio da contagem de microvasos, obtida com auxílio de determinada amplificação objetiva, com um campo de diâmetro conhecido, em um número limitado de campos, subjetivamente selecionados das áreas com maior densidade vascular (*hot spots*). A contagem pode ser realizada em cortes submetidos à coloração comum ou específica, ou naqueles com

marcação imunohistoquímica para microvasos, utilizando os marcadores fator VIII, fator de Von Willebrand, CD34, CD31 ou CD105 (Sharma *et al.*, 2005).

As colorações histoquímicas envolvem a aplicação de substâncias químicas que resultam em reações diretas com determinados constituintes de um tecido. Na patologia veterinária oncológica, essas colorações são muito usadas para auxiliar no diagnóstico de tumores pobremente diferenciados (Ehrhart *et al.*, 2013). As colorações de Tricrômio podem ser utilizadas para identificar fibras de colágeno, o que pode auxiliar na diferenciação de certos tumores de origem mesenquimal, como os derivados de músculos e os que produzem matriz de colágeno (Ehrhart *et al.*, 2013). A coloração por Tricrômio de Gomori também pode destacar em vermelho as hemácias contidas no lúmen dos vasos sanguíneos no tecido, facilitando a identificação e contagem dos vasos sanguíneos (Zaffe *et al.*, 2002).

A imuno-histoquímica pode ser aplicada na oncologia veterinária como ferramenta auxiliar para o diagnóstico definitivo de neoplasias indiferenciadas e na determinação da origem de metástases (Werner *et al.*, 2005; Ramos-Vara *et al.*, 2005). A identificação de receptores celulares e moléculas relacionadas à progressão tumoral permite caracterizar o imunofenótipo das células neoplásicas, constituindo fatores prognósticos e preditivos importantes (Ramos-Vara *et al.*, 2005). A técnica de imuno-histoquímica é uma combinação de reações químicas e imunológicas, visualizadas em um microscópio (Ramos-Vara *et al.*, 2005).

O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear associada à proliferação celular (Gerdes *et al.*, 1983). Se expressa desde o início da fase G1 até o final do ciclo celular, e sua

imunomarcação se correlaciona fortemente com a atividade proliferativa dos tumores (Scholzen e Gerdes, 2000). O anticorpo monoclonal MIB-1 frequentemente é utilizado para a detecção de Ki-67 no núcleo de células tumorais (Hoos *et al.*, 2001).

As Ciclooxigenases (Cox) medeiam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, e são consideradas enzimas limitantes neste processo de biossíntese. As prostaglandinas são metabólitos de lipídeos de cadeia curta envolvidos em uma grande variedade de processos fisiológicos, como ovulação e manutenção do fluxo sanguíneo renal, além de contribuírem para a citoproteção da mucosa gástrica. Entretanto, as prostaglandinas também exercem papel importante em muitos processos patológicos, inclusive no desenvolvimento do câncer (Smith *et al.*, 2000). A isoforma Cox-2 normalmente está ausente no organismo (exceto em alguns poucos tecidos, como placenta, cérebro e rins), e a sua expressão é induzida pelo estímulo de vários mediadores inflamatórios, como interleucina 1, fator de necrose tumoral 1, e lipopolissacarídeos (Herschman, 2004 citado por Doré, 2011). Apesar de Cox-2 contribuir para processos fisiológicos, a sua expressão é mais intensa em estados patológicos, principalmente nas reações inflamatórias e na oncogênese (Doré, 2011). A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), um dos principais metabólitos de Cox-2, atua sobre diversos receptores celulares, promovendo proliferação e sobrevivência celular através de vários mecanismos, incluindo inibição da apoptose, indução de angiogênese tumoral (através da produção de fatores de crescimento proangiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial e o fator de crescimento fibroblástico básico), aumento na invasão celular e metástase, e supressão da resposta imune propiciando o escape das células neoplásicas à vigilância imune (Greenhough *et al.*, 2009).

## 2.7. Fatores prognósticos

Fatores prognósticos são características clínicas, patológicas e biológicas dos indivíduos e seus tumores que permitem prever a evolução clínica e a sobrevida do paciente (Allred *et al.*, 1998). Um marcador prognóstico pode ser definido como qualquer marcador capaz de no momento do diagnóstico (ou cirurgia) da neoplasia fornecer informações a respeito da sua evolução clínica. Para tal, este marcador deve estar relacionado a determinadas características biológicas envolvidas na transformação celular neoplásica, no crescimento tumoral ou no processo da cascata metastática. Este mesmo marcador poderá ser considerado como preditivo, quando fornecer informações úteis na seleção de pacientes susceptíveis à determinada terapêutica específica (Zuccari *et al.*, 2008).

Alguns fatores prognósticos seguidos à excisão cirúrgica foram estudados para os SAF, dentre eles: cirurgia com as margens livres ou comprometidas, cirurgias anteriores à ressecção definitiva, localização e tamanho do tumor, e marcadores moleculares (Davidson *et al.*, 1997; Hershey *et al.*, 2000; Hershey *et al.*, 2005; Martano *et al.*, 2005).

Diversos autores acreditam que os melhores índices de sobrevida são obtidos em gatos com margens cirúrgicas livres de células neoplásicas à primeira intervenção cirúrgica (Davidson *et al.*, 1997; Cronin *et al.*, 1998; Hershey *et al.*, 2000). Cohen *et al.* (2001) e Martano *et al.* (2005) não observaram estes resultados, relatando ausência de correlação entre o *status* das margens cirúrgicas e o prognóstico dos pacientes.

Hershey *et al.*, 2000 relatam maior sobrevida para gatos que desenvolvem SAF em um dos membros, já que nesses animais é possível a realização da amputação e

obtenção de margens cirúrgicas amplas. Davidson *et al.* (1997), apesar de descreverem o maior intervalo livre de doença para pacientes com margens livres de neoplasia, não observaram relação entre a localização do tumor e a ocorrência de recidiva.

Davidson *et al.* (1997) sugeriram que a realização de cirurgia(s) anteriore(s) à definitiva associa-se a um menor intervalo livre de doença – cinco meses para felinos que já passaram por cirurgia e mais de 16 meses para os que recebem tratamento definitivo no primeiro procedimento cirúrgico. Martano *et al.* (2005), entretanto, não observaram diferenças no intervalo livre de doença ou na sobrevida global de animais submetidos à excisão de tumor primário ou de recidivas.

Em relação ao tamanho, Martano *et al.* (2005) observaram tendência (sem significado estatístico) a melhor prognóstico para os tumores menores do que quatro centímetros, enquanto Romanelli *et al.* (2008) afirmam que o tamanho não influencia diretamente no prognóstico do paciente com SAF.

A graduação histológica é o fator prognóstico mais importante para os sarcomas de tecido mole em seres humanos adultos, em relação à probabilidade de metástases distantes e sobrevida, segundo Kandell *et al.* (1999). Para os SAF, os estudos retrospectivos não observaram correlação entre graduação tumoral e recorrência (Davidson *et al.*, 1997; Giudice *et al.*, 2010) e entre graduação e sobrevida global (Davidson *et al.*, 1997). Romanelli *et al.* (2008) observaram associação entre a graduação histológica e o desenvolvimento de metástases, sendo pacientes com SAF grau III significativamente mais propícios à metastatização.

A utilização de marcadores imuno-histoquímicos como fatores prognósticos

ainda é pouco estudada para os SAF. Hershey et al. (2005), demonstraram que nos felinos com SAF em que as células tumorais exibiam p53 no núcleo, decorria maior tempo para o aparecimento de recidiva (325 dias) do que para os que apresentavam p53 citoplasmática (135 dias). Entretanto, não foi observada diferença significativa no aumento da sobrevida. Eickstein et al. (2009) relataram ausência de correlação entre a expressão tumoral de Ki-67 e a sobrevida global dos pacientes. Carneiro (2012), não observou relação da expressão de Cox-2 com graduação, taxa de recidiva ou sobrevida global dos pacientes.

O prognóstico para um animal com SAF recorrente ou inoperável é de reservado a desfavorável (Kirpensteijn, 2006).

#### 2.8. Tratamento

A completa excisão do tumor à primeira intervenção cirúrgica, com obtenção de amplas margens livres, parece contribuir para a extensão do intervalo livre de doença (Davidson et al., 1997; Hershey et al., 2000) e da sobrevida global (Davidson et al., 1997). Portanto, a primeira excisão cirúrgica deve ser definitiva e realizada com ampla margem, de pelo menos três centímetros, incluindo ossos, músculos e outras estruturas que façam contato direto com a neoplasia e que estejam incluídas no planejamento das margens (Séguin, 2002). Entretanto, a ressecção cirúrgica dos SAF pode ser difícil, por se tratarem de tumores pobremente encapsulados, com crescimento extenso e tendência à propagação por entre os planos fasciais (Kahler, 1993).

O uso de tomografia computadorizada e/ou da ressonância magnética pode facilitar muito na determinação das margens tumorais e no planejamento do procedimento cirúrgico e da radioterapia (Morrison e Starr, 2001).

A quimioterapia pode ser benéfica principalmente para os gatos com tumores incompletamente excisados, recidivantes, inoperáveis, ou para aqueles com doença metastática (Williams et al., 2001). Dentre os agentes quimioterápicos, pode-se destacar a doxorrubicina (Poirier et al., 2002), ciclofosfamida (Barber et al., 2000), carboplatina (Kobayashi et al., 2002) e mitoxantrone (Williams et al., 2001).

Os resultados mais promissores alcançados no tratamento de gatos com SAF incluem a utilização de múltiplas terapias, como radioterapia e cirurgia. Diversas modalidades de radioterapia foram avaliadas em combinação com a cirurgia, incluindo ortovoltagem, braquiterapia e megavoltagem (Hauck, 2003). A terapia multimodal deve ser realizada em todos os casos em que a excisão cirúrgica completa não foi possível (Kirpensteijn, 2006).

A *Vaccine Associated Feline Sarcoma Task Force* (VAFSTF) recomenda que sejam realizadas reavaliações trimestrais, durante o mínimo de um ano, após a remoção cirúrgica de um SAF (Morrison e Starr, 2001).

#### 2.9. Prevenção

Considerando-se que o SAF é altamente agressivo, de difícil tratamento e de prognóstico desfavorável, deve-se proceder com o objetivo de diminuir a sua incidência e morbidade. Isso pode ser alcançado por meio da implantação de medidas que previnam o aparecimento da neoplasia (Carneiro et al., 2008).

Inicialmente deve-se diminuir a utilização de aplicações injetáveis em felinos, e quando não puderem ser evitadas, a via subcutânea deve ser priorizada, pois a formação da massa sob a pele é mais facilmente observada pelos proprietários (Macy e Couto, 2001; Novosad, 2003).

A VAFSTF sugere nos Estados Unidos que a vacinação dos felinos seja realizada a cada três anos. No Brasil, a vacinação anti-rábica anual é obrigatória (Carneiro *et al.*, 2008). A VAFSTF recomenda que os médicos veterinários dêem preferência às vacinas atenuadas que não contém adjuvantes, ou às inativadas com adjuvantes que não causem reação inflamatória exuberante (Couto, 2002).

É recomendada a padronização das aplicações injetáveis em felinos, devendo-se evitar a região interescapular. As vacinas anti-rábicas devem ser aplicadas no membro pélvico direito, as contra o FeLV no membro pélvico esquerdo e outras substâncias em membro torácico direito (Anexo 1). As aplicações devem ser realizadas o mais distalmente possível (Morrison e Starr, 2001). Macy e Couto (2001) atentam para o fato de que a utilização do mesmo local para múltiplas aplicações injetáveis pode predispor ao aparecimento do SAF.

Banerji (2006) afirma que a detecção precoce da doença, através da monitoração vigilante dos locais de aplicação, parece ser a forma mais eficiente de se obter um melhor prognóstico para o SAF. As diretrizes da VAFSTF sugerem o tratamento de massas em locais de aplicação que persistam por mais de três meses, que aumentem significativamente de tamanho após quatro semanas ou que tenham diâmetro maior que dois centímetros (Morrison e Starr, 2001).

### **3. JUSTIFICATIVA**

Apesar da baixa prevalência dos SAF, seu caráter iatrogênico, sua agressividade e o insucesso do tratamento em muitos casos, justificam maiores estudos quanto à sua patogenia e caracterização histopatológica e clínica, fornecendo subsídios para que os médicos veterinários possam optar pela melhor conduta terapêutica e profilática.

### **4. HIPÓTESES**

As características histopatológicas, histoquímicas e imuno-histoquímicas dos SAF podem estar relacionadas com o prognóstico, e serem indicativas do comportamento biológico da neoplasia.

O uso de quimioterápicos adjuvantes em associação ao tratamento cirúrgico pode proporcionar um aumento de sobrevida livre de doença e sobrevida global de pacientes com sarcoma de aplicação felino.

A remoção de nódulos pós-aplicação ainda na fase inflamatória tem caráter curativo e pode ser uma ferramenta na prevenção dos SAF.

### **5. OBJETIVOS**

#### *5.1. Objetivo Geral*

Avaliar características histopatológicas, histoquímicas e imuno-histoquímicas em SAF, assim como a eficácia da utilização de quimioterapia adjuvante na terapêutica da doença por meio da avaliação do intervalo livre de doença e da sobrevida global.

#### *5.2. Objetivos Específicos*

5.2.1. Caracterizar os SAF, considerando: tamanho tumoral, aspectos histopatológicos, gradação histológica, taxa de recorrência, densidade de microvasos e expressão imuno-histoquímica de COX-2 e Ki-67, correlacionando esses dados entre si;

5.2.2. Comparar a sobrevida livre de doença e sobrevida global de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico isolado, com pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico associado ao tratamento quimioterápico adjuvante para avaliar o benefício terapêutico destes tratamentos.

5.2.3. Avaliar a eficácia do tratamento cirúrgico de granulomas pós-aplicação em felinos.

## **6. MATERIAL E MÉTODOS**

## **7. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os tópicos material e métodos e resultados e discussão serão apresentados na forma de artigos científicos, os quais serão submetidos ao Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Artigo 1: Caracterização histomorfológica e imunofenotípica do sarcoma de aplicação felino.

Artigo 2: Avaliação do tratamento quimioterápico adjuvante no tratamento de sarcoma de aplicação felino.

Artigo 3 (Comunicação): Exérese de nódulos inflamatórios pós aplicação em felinos: uma intervenção preventiva? – relato de três casos.

## ARTIGO 1

### CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA DO SARCOMA DE APLICAÇÃO FELINO

#### Histomorphological and Immunophenotypic Characterization of Feline Injection Site-Associated Sarcoma

##### Resumo

O Sarcoma de Aplicação Felino (SAF) é uma neoplasia de origem mesenquimal caracterizada pelo comportamento biológico agressivo, que se desenvolve em regiões onde foram previamente administradas vacinas ou medicamentos. Apresenta baixa prevalência, mas as taxas de recorrência alcançam até 80%, mesmo após tratamentos que incluem cirurgias extensas, quimioterapia e radioterapia. O objetivo deste trabalho foi contribuir para o estudo do comportamento biológico dos SAF através da avaliação de suas características histomorfológicas e imunofenotípicas. Realizou-se análise histopatológica e imuno-histoquímica para os marcadores Cox-2 e Ki-67 em 16 amostras de SAF. O fibrossarcoma foi o subtipo histológico observado com maior frequência (62,5%). O tumor de bainha de nervo periférico maligno foi diagnosticado em 3/16 (18,75%) amostras, demonstrando que o SAF também pode ocorrer sob esta forma. A graduação tumoral foi realizada conforme sugerido por Couto *et al.* (2002). A maioria dos casos, 10/16 (62,5%) foi classificada como grau II; seguido de 4/16 (25%) grau I e 2/16 (12,5%) grau III. Houve correlação negativa ( $p = 0,05$ ) entre a graduação histológica e o intervalo livre de doença, sendo que pacientes com SAF grau I apresentaram maior tempo para recorrência do que os de grau II. Não foram incluídos pacientes com grau III na análise estatística. A expressão de Cox-2 ocorreu em 13/16 (81,25%) tumores, havendo correlação positiva moderada entre Cox-2 e graduação tumoral ( $p = 0,028$ ;  $r = 0,546$ ), sugerindo que Cox-2 possa estar envolvida na progressão da neoplasia. O índice mitótico e a expressão de Ki-67 foram considerados baixos. Houve correlação negativa moderada entre a expressão de Ki-67 e a vascularização tumoral ( $p = 0,122$ ;  $r = -0,450$ ) que podem sugerir que o crescimento tumoral ocorre em proporção maior que a sua angiogênese, resultando em morte celular em determinadas áreas. Com base nos resultados encontrados, sugere-se que o comportamento agressivo dos SAF pode estar mais relacionado ao seu caráter invasivo do que à intensa proliferação celular e que a graduação tumoral pode ser um fator prognóstico para o intervalo livre de doença em pacientes com SAF de grau baixo a intermediário.

Palavras-chave: Câncer, Oncologia, Ki-67, Cox-2, Sarcoma Vacinal

##### Introdução

A partir de 1990, médicos veterinários patologistas perceberam um aumento no número de casos de fibrossarcomas de origem cutânea e subcutânea, na região cervical dorsal e interescapular de felinos, locais frequentemente utilizados para aplicação de vacinas e medicamentos (Hendrick e Goldschmidt, 1991). Estes casos foram posteriormente denominados Sarcoma

de Aplicação Felino (SAF), que se caracterizam clinicamente pelo aparecimento de nódulo solitário firme ou massa difusa, aderido a planos profundos, em região onde foi previamente administrada uma vacina ou medicamento (Liptak e Forrest, 2013). O tempo para desenvolvimento do tumor após a vacinação pode variar de quatro meses a 10 anos (Burton e Mason, 1997). A frequência de ocorrência dos SAF é estimada entre

0,36/10000 vacinações (Gober e Kass, 2002) a 1/1000 vacinações (Hendrick *et al.*, 1994; Lester *et al.*, 1996).

Os SAF apresentam características histológicas consistentes com um comportamento biológico mais agressivo, quando comparados aos sarcomas não associados à aplicação, revelando intenso pleomorfismo celular e nuclear, grandes áreas de necrose tumoral e alta atividade mitótica. Além disso, é muito comum a observação de um infiltrado inflamatório periférico, composto principalmente por linfócitos e macrófagos (Hendrick e Brooks, 1994; Doddy *et al.*, 1996).

Para alguns autores, os SAF têm origem em mecanismos oncogênicos diferentes dos observados nos sarcomas clássicos, constituindo uma entidade patológica distinta (Kass *et al.*, 1993; Hendrick *et al.*, 1994; Doddy *et al.*, 1996). A inflamação linfocítica persistente e a proliferação de fibroblastos e miofibroblastos associados à reação inflamatória, em conjunto com a ativação de oncogenes e/ou a inativação de genes supressores de tumor, são sugeridos como possíveis causas para o desenvolvimento dos SAF (Hendrick *et al.*, 1994; Nieto *et al.*, 2003).

O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear associada à proliferação celular que se expressa desde o início da fase G1 até o final do ciclo celular, e sua coloração à imunohistoquímica se correlaciona fortemente com a atividade proliferativa dos tumores (Scholzen e Gerdes, 2000). Nos sarcomas de tecidos moles de alto grau histológico, em seres humanos, a expressão de Ki-67 é considerada um fator prognóstico independente (Hoos *et al.*, 2001).

As Ciclooxygenases (Cox) medeiam a conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas (Smith *et al.*, 2000). A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), um dos principais

metabólitos de Cox-2, atua sobre diversos receptores celulares, promovendo proliferação e sobrevivência celular através de vários mecanismos, incluindo inibição da apoptose, indução de angiogênese tumoral, aumento na invasão celular e metástase, e supressão da resposta imune, propiciando o escape das células neoplásicas à vigilância imune (Greenhough *et al.*, 2009). A expressão de Cox-2 já foi demonstrada em diversas neoplasias em cães e gatos, e anti-inflamatórios não esteroidais, que inibem a atividade de Cox, são utilizados com sucesso no tratamento de alguns tipos de câncer, como o carcinoma de bexiga em cães (Knapp *et al.*, 1994).

Apesar da baixa prevalência, a agressividade dos SAF e a ineficiência do tratamento em muitos dos casos justificam maiores estudos, dando subsídios para que os médicos veterinários optem pela melhor conduta terapêutica e profilática (Carneiro *et al.*, 2008).

O objetivo deste trabalho foi contribuir para o estudo do comportamento biológico dos SAF através da avaliação de suas características histomorfológicas e de expressão de Cox-2 e Ki-67.

## Material e Métodos

Blocos de parafina contendo sarcomas em felinos, encaminhados para biópsia entre 2001 e 2013, foram obtidos do Setor de Patologia da Escola de Veterinária e do Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas, ambos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram selecionadas as amostras cujos tumores haviam sido excisados de locais tipicamente utilizados para aplicação parenteral (dorso, flanco e membros) e aquelas em que havia histórico de administração de injeção no local de aparecimento do nódulo, totalizando 16 amostras.

As fichas de solicitação dos exames e os registros clínicos dos pacientes foram avaliados para obtenção de dados como raça, idade, sexo, tamanho do tumor, tratamentos realizados e evolução clínica. Quando não foi possível a obtenção destas informações, os clínicos e/ou cirurgiões e os proprietários destes pacientes foram entrevistados.

Para a avaliação histopatológica, seções histológicas de 4 µm do tumor foram obtidas de amostras das neoplasias fixadas por 48 horas em formol neutro e tamponado a 10%, processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). Os tumores foram avaliados quanto ao seu diagnóstico histológico. Quando apenas a avaliação histopatológica não permitiu a definição do diagnóstico, foram realizadas avaliações complementares através de imunohistoquímica (vimentina, S100) ou por colorações especiais (safranina). Avaliou-se a celularidade tumoral (baixa, moderada ou elevada), a formação de células gigantes tumorais e a presença de infiltrado inflamatório, que foi classificado quanto ao tipo celular predominante (linfocítico, linfoplasmocítico), à distribuição (focal, escore 1; multifocal; escore 2; difuso, escore 3) e à intensidade (discreto, escore 1; moderado, escore 2; intenso, escore 3). O produto obtido pela multiplicação dos escores de distribuição e intensidade permitiu a definição de um valor de 1 a 9 para a magnitude da inflamação peritumoral. A formação de folículos linfóides em meio ao infiltrado inflamatório também foi registrada.

A graduação histológica dos SAF foi definida de acordo com o sistema adaptado por Couto *et al.* (2002). Este sistema considera diferenciação histológica, necrose tecidual e contagem mitótica. O método de avaliação está descrito no Quadro 1. A contagem mitótica foi realizada em campos selecionados da periferia do tumor, por dois observadores. Utilizou-se o microscópio BX-41 com ocular de 10x e objetiva de 40x, sendo os eventos mitóticos contados em 10 Campos de Grande Aumento (CGA). Para a obtenção do grau histológico combinado do tumor, o escore para cada fator foi somado, resultando em um valor total que variou de 3 a 9. O grau tumoral foi alocado baseado nos valores a seguir:  $\leq 4$  pontos: grau I – baixo grau; 5 – 6 pontos: grau II – grau intermediário;  $\geq 7$  pontos: grau III – alto grau.

Na análise histoquímica foi empregada a coloração de Tricrômio de Gomori para avaliação da densidade microvascular tumoral, determinação da produção de colágeno e confirmação da histogênese fibroblástica da neoplasia. A densidade microvascular foi determinada através da contagem de neovasos intratumorais em dez campos *hot spot* em aumento de 400X, com posterior determinação do índice vascular médio. Foram definidos como vasos os conjuntos de células endoteliais, com lúmen contendo hemácias no centro. Não foram considerados os vasos que apresentavam camada muscular em sua parede, por não estarem associados à neovascularização.

**Tabela 1 – Avaliação da graduação histológica do Sarcoma de Aplicação Felino (SAF)\***

Parâmetros	Pontos
<b>Diferenciação</b>	
• Semelhante a tecido mesenquimal adulto	1
• Subtipo histológico específico	2
• Indiferenciado	3
<b>Necrose</b>	
• Ausente	1
• < 50%	2
• ≥ 50%	3
<b>Contagem mitótica**</b>	
• 0 a 9	1
• 10 a 19	2
• ≥ 20	3

\* Adaptado de Couto et al. (2002): Para a obtenção do grau histológico combinado do tumor, o escore para cada fator foi somado, resultando em um valor total que variou de 3 a 9. O grau tumoral foi alocado baseado nos valores a seguir:

Grau I ou baixo grau: ≤ 4 pontos.

Grau II ou grau intermediário: 5 ou 6 pontos

Grau III ou alto grau: ≥ 7 pontos

\*\* A contagem mitótica foi realizada em campos selecionados da periferia do tumor, por dois observadores, com ocular de 10x e objetiva de 40x, contados em 10 campos de grande aumento.

Para a análise imunohistoquímica, utilizaram-se secções histológicas de 4 µm de amostras selecionadas. Os ítems relacionados ao anticorpo, clone, fonte, diluição, método de recuperação antigênica e tempo de incubação estão descritos na Tabela 2. A identificação imunohistoquímica foi realizada a partir de anticorpo secundário polimerizado (*ADVANCE HRP – ready to use – DakoCytomation*). Para a realização de bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e álcool metílico por 15 minutos. Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, e a imunoreatividade foi visualizada através da incubação das lâminas por 10 minutos em Diaminobenzidina (DAB) (DAB substrate system, Dakocytomation). Como controles positivos foram usadas amostras de neoplasias previamente testadas para Ki-67; e secções de rim de cão, sabidamente positivo para Cox-2. Os

controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário pelo soro normal (*Ultra V Block, Laboratory Vision*). O índice de proliferação foi calculado pela contagem manual, com auxílio de imagens capturadas para um computador, de núcleos positivos para Ki-67 em um total de 1000 células neoplásicas. Para tanto, foram selecionadas áreas da periferia do tumor, onde a proliferação é geralmente mais alta (Dutra et al., 2008). Positividade para Cox-2 foi indicada pela presença de marcação citoplasmática. O número de células positivas para Cox-2 foi avaliado de forma semi-quantitativa com o escore de distribuição definido pela estimativa de porcentagem de células positivas em cinco campos de 400X. Para todos os tumores foi dado um valor para distribuição de: 0, caracterizado por ausência de marcação; 1, menos de 10% de células marcadas, 2, entre 10 e 30% de marcação; 3, entre 31 e 60% de marcação; e 4, mais de 60% de células

coradas. Para a intensidade de marcação foram dados valores de: 0, caracterizado por ausência de marcação; 1, marcação fraca; 2, marcação moderada; e 3, marcação forte. O valor final do escore foi determinado variando entre 0 e 12 e foi obtido pela multiplicação do valor da distribuição pelo da intensidade. Em seguida as amostras foram divididas em grupos de baixa (0-5) e alta (6-12) expressão de Cox-2 (Lavalle *et al.*, 2012).

Para testar e medir a associação entre as diferentes variáveis estudadas (tipo histológico, graduação histológica, presença de células gigantes e multinucleadas, tipo e intensidade do infiltrado inflamatório, presença de folículos linfóides, expressão de Cox-2, índice de proliferação celular,

densidade microvascular, produção de colágeno e celularidade) foi utilizada a correlação de Spearman. As correlações significativas ( $p < 0,05$ ) foram consideradas fortes quando ocorreram em mais de 49% da população estudada ( $r > 0,07$ ), moderada, quando ocorreram em 9 a 49% ( $0,3 < r < 0,7$ ), e fraca, quando ocorreram em menos de 9% da população ( $r < 0,3$ ). A sobrevida e o intervalo livre de doença dos pacientes foram avaliados em análise univariada. As curvas de sobrevida para cada graduação foram derivadas da estimativa de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste log-rank de Cox-Mantel. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

**Tabela 2 – Avaliação imunohistoquímica em pacientes com Sarcoma de Aplicação Felino (SAF) – anticorpos e metodologia utilizados.**

\*Dakocytomation target retrieval solution

Anticorpo (Clone)	Fonte	Diluição	Recuperação antigênica (temperatura/ tempo de exposição [min])	Tempo (h)/ temperatura de incubação
Ki-67 (MIB-1)	Dakocytomation	1:25	Calor pressurizado (125° C/2) tampão citrato pH 6,0*	12/ambiente
Cox-2 (SP21)	Neomarkers	1:80	Banho maria (98° C/20) com tampão pH 6,0*	1/ambiente

## Resultados e Discussão

Foram avaliados 16 casos de SAF, sendo oito (50%) em machos e oito (50%) em fêmeas. Devido ao caráter retrospectivo do estudo, não foi possível obter todas as informações em alguns casos. Em relação à raça, 10/14 (71,4%) animais não tinham raça definida, 2/14 (14,3%) eram persas e 2/14 (14,3%) siameses. Estes dados corroboram com o descrito na literatura, não havendo predisposição de sexo ou raça para a doença (Doddy *et al.*, 1996; Hershey *et al.*, 2000; Nieto, 2003; Martano *et al.*, 2005). A idade ao aparecimento da doença variou de quatro a 14 anos (média  $7,80 \pm 3,21$ ), em

concordância com a média relatada por Doddy *et al.* (1996), de oito anos para pacientes com SAF - menor que a observada em gatos diagnosticados com sarcomas não associados à aplicação, que é de 11 anos.

As informações referentes a cada caso clínico podem ser encontradas na Tabela 3. O tamanho dos nódulos, após excisão cirúrgica, foi determinado em 12 casos, com o maior diâmetro variando entre 0,5 a 10 cm (média  $4,26 \pm 3,19$  cm). Giudice *et al.* (2010), observaram valores médios semelhantes. Ladlow (2013) afirma que os pacientes com SAF geralmente apresentam nódulos maiores do que aqueles com

sarcomas não associados à aplicação. Sugere que o maior tamanho possa estar relacionado à dificuldade do proprietário em perceber um aumento de volume subcutâneo na região interescapular ou ao comportamento agressivo do tumor. Romanelli *et al.* (2008) acreditam que o tamanho do tumor não influencia diretamente no prognóstico, mas Martano *et al.* (2005) observaram tendência (sem significado estatístico) a melhor prognóstico para os tumores menores que quatro centímetros. Ressalta-se, portanto, a importância de que os médicos veterinários orientem os proprietários de felinos a acompanhar atentamente os locais onde foram realizadas aplicações de vacinas ou medicamentos.

Com relação à localização da neoplasia, 6/15 (40%) encontravam-se no dorso, 5/15 (33%) no flanco, 3/15 (20%) na região costal, e 1/15 (7%) em membro torácico. O estudo incluiu pacientes com diagnóstico a partir de 2001, e as recomendações VAFSTF de que as aplicações em felinos sejam realizadas nos membros já estavam sendo amplamente divulgadas na comunidade científica veterinária (Morrison e Starr, 2001). Observou-se, portanto, que a maior parte dos sarcomas se desenvolveu em locais contraindicados para aplicações em felinos, podendo sugerir que as recomendações da VAFSTF ainda não estão bem difundidas na rotina dos médicos veterinários em Belo Horizonte. Como o intervalo entre a aplicação e o aparecimento do nódulo pode chegar a 13 anos (média um a três anos), não foi possível concluir se realmente não houveram mudanças na localização das aplicações em felinos em Belo Horizonte. Shaw *et al.* (2009) descreveram, entretanto, uma rápida mudança no local de desenvolvimento dos sarcomas de aplicação entre 1990 e 2006, nos Estados Unidos.

O fibrossarcoma foi o tipo histológico mais prevalente neste estudo, ocorrendo em 10/16 (62,5%) dos casos, seguido de 3/16

(18,75%) casos de tumor de bainha de nervo periférico maligno (neurofibrossarcoma Schwannoma), e de 1/16 (6,25%) caso de hemangiossarcoma, 1/16 (6,25%) sarcoma histiocítico e 1/16 (6,25%) osteossarcoma. Para a definição do diagnóstico foi necessária a realização de imunohistoquímica (S100) em 3/16 (18,75%) amostras, todas de tumor de bainha de nervo periférico maligno, e de coloração especial (safranina) em 3/16 (18,75%) amostras, sendo duas de fibrossarcomas e uma de osteossarcoma. O fibrossarcoma é caracterizado como uma neoplasia maligna de fibroblastos, e é descrito como o tipo histológico mais comum dentre os SAF, ocorrendo em cerca de 80% dos casos, de acordo com Wilcock *et al.* (2012). É relatado ainda como o tumor maligno mesenquimal mais comum em gatos, representando 12 a 25% de todos os tumores de pele em felinos (Gross *et al.*, 1992). Outras variantes histológicas para os SAF incluem histiocitoma fibroso maligno, osteossarcoma, condrossarcoma, rabiomiossarcoma, mixosarcoma e sarcoma indiferenciado, relatadas por Hendrick e Brooks (1994) e Doddy *et al.* (1996). Não foram encontrados relatos do subtipo histológico de tumor de bainha de nervo periférico maligno para SAF, na literatura consultada, podendo ser este o primeiro relato de sua ocorrência. Ochôa e Lopes (2008) relataram uma incidência de 3,2% de tumores de bainha de nervo periférico maligno em sarcomas felinos. Estes autores, entretanto, não classificaram os tumores quanto à sua associação à aplicação de vacinas ou medicamentos. Wilcock *et al.* (2012) não observaram associação entre diagnóstico histológico e prognóstico nos SAF. Couto *et al.* (2002) sugerem que os sarcomas observados em locais de aplicação em felinos sejam classificados histologicamente apenas como SAF, devido ao grande pleomorfismo observado nos mesmos.

**Tabela 3: Histopatologia, imunohistoquímica e evolução clínica dos 16 casos de Sarcoma de Aplicação Felino (SAF).**

Caso	Diagnóstico	HE	GH	COX-2	Ki-67	DMV	IM	Necrose	CEL	Colágeno	MDT	QT	ILD	SG
1	Fibrossarcoma	C	II	3	nd	5,4	< 9	2	2	3	7	nd	nd	nd
2	Fibrossarcoma	F	III	4	4,5	3,8	30	2	2	2	5	D	730	780
3	Fibrossarcoma	CF	III	6	0,3	30,6	20	3	3	1	3	nd	nd	nd
4	Fibrossarcoma	nd	I	3	3,6	10,2	< 9	1	1	2	nd	C	1670	1975
5	TBNPM	C	II	3	1,3	2,8	< 9	2	2	nd	10	nd	nd	nd
6	Fibrossarcoma	nd	I	1	nd	23,8	< 9	1	2	3	2	C	330	630
7	TBNPM	nd	II	3	1,7	10	< 9	2	3	nd	0,5	nd	nd	nd
8	Fibrossarcoma	nd	II	1	0,4	8,4	< 9	2	2	3	4	Não	60	340
9	Hemangiossarcoma	nd	II	4	0	56,8	17	1	2	nd	nd	nd	nd	nd
10	Fibrossarcoma	nd	I	2	8,6	2,4	< 9	2	2	2	2	nd	nd	nd
11	SH	C	II	0	nd	1,8	< 9	3	2	nd	nd	nd	nd	nd
12	Fibrossarcoma	nd	II	4	1,6	7	10	2	3	2	2,5	nd	nd	nd
13	Fibrossarcoma	nd	I	0	0	4,4	< 9	1	2	1	1	nd	nd	nd
14	Osteossarcoma	nd	II	6	nd	3	0	3	3	nd	nd	C	40	40
15	TBNPM	nd	II	3	1,7	3,8	< 9	3	2	nd	10	D	221	221
16	Fibrossarcoma	nd	II	0	0,5	25,4	11	2	2	3	8	D	10	150

nd – dado não disponível; TBNPM – Tumor de Bainha de Nervo Periférico Maligno; SH – Sarcoma Histiocítico; HE – Observações à hematoxilina-eosina; C – Células Gigantes Multinucleadas; F – Folículos Linfóides; CF – Células Gigantes Multinucleadas e Folículos Linfóides; GH – Grau Histológico; DMV – Densidade Microvascular (Média de neovasos/Campo); IM – Índice Mitótico (Contagem de mitoses/10 campos); Necrose (1: ausente, 2: < 50%, 3: > 50%); Celularidade e Produção de Colágeno (1: baixa; 2: moderada, 3: intensa); MDT - Maior Diâmetro Tumoral, em centímetros; QT – Quimioterapia (D – Doxorrubicina, C – Carboplatina); ILD – Intervalo Livre de Doença, em dias; SG – Sobrevida Global, em dias.

Em relação à graduação histológica, a maioria dos casos, 10/16 (62,5%) foi classificada como grau II; seguido de 4/16 (25%) grau I e 2/16 (12,5%) grau III (Figuras 1A e 1B). A graduação histológica é o fator prognóstico mais importante para os sarcomas de tecido mole em seres humanos adultos, em relação à probabilidade de metástases distantes e sobrevida, segundo Kandell *et al.* (1999). Para os SAF, os estudos retrospectivos não observaram correlação entre graduação tumoral e recorrência (Davidson *et al.*, 1997; Giudice *et al.*, 2010) e entre graduação e sobrevida global (Davidson *et al.*, 1997). Romanelli *et al.* (2008) observaram associação entre a graduação histológica e o desenvolvimento de metástases, sendo pacientes com SAF grau III significativamente mais propícios à metastatização. Observaram ainda tendência à menor sobrevida para os pacientes que desenvolveram metástases distantes. Devido ao caráter retrospectivo do presente estudo, o acompanhamento clínico foi possível em apenas sete pacientes. Conforme os trabalhos anteriores, também não foi observada diferença na sobrevida global de acordo com a graduação tumoral, mas houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre o intervalo livre de doença dos pacientes com SAF de graus I e II. O grau III não foi incluído nesta análise estatística, devido à pequena amostragem (apenas um caso com acompanhamento de sobrevida). Estes resultados sugerem, apesar do número reduzido de casos, que a graduação histológica pode ser um fator prognóstico para os pacientes com SAF de grau baixo a intermediário.

A vascularização tumoral variou de 1,8 a 56,8 (média  $12,47 \pm 14,38$ ) neovasos por campo (Figuras 1C e 1D). Couto *et al.* (2002) avaliaram a vascularização dos SAF através da análise imuno-histoquímica da expressão do fator VIII, que é considerado um marcador do endotélio vascular, e observaram marcação em 0,3% a 4,8% das

células. A diferença nas metodologias empregadas para análise da densidade microvascular impedem a comparação destes resultados. Em ambos os estudos, entretanto, não foi observada relação entre a vascularização e a graduação tumoral.

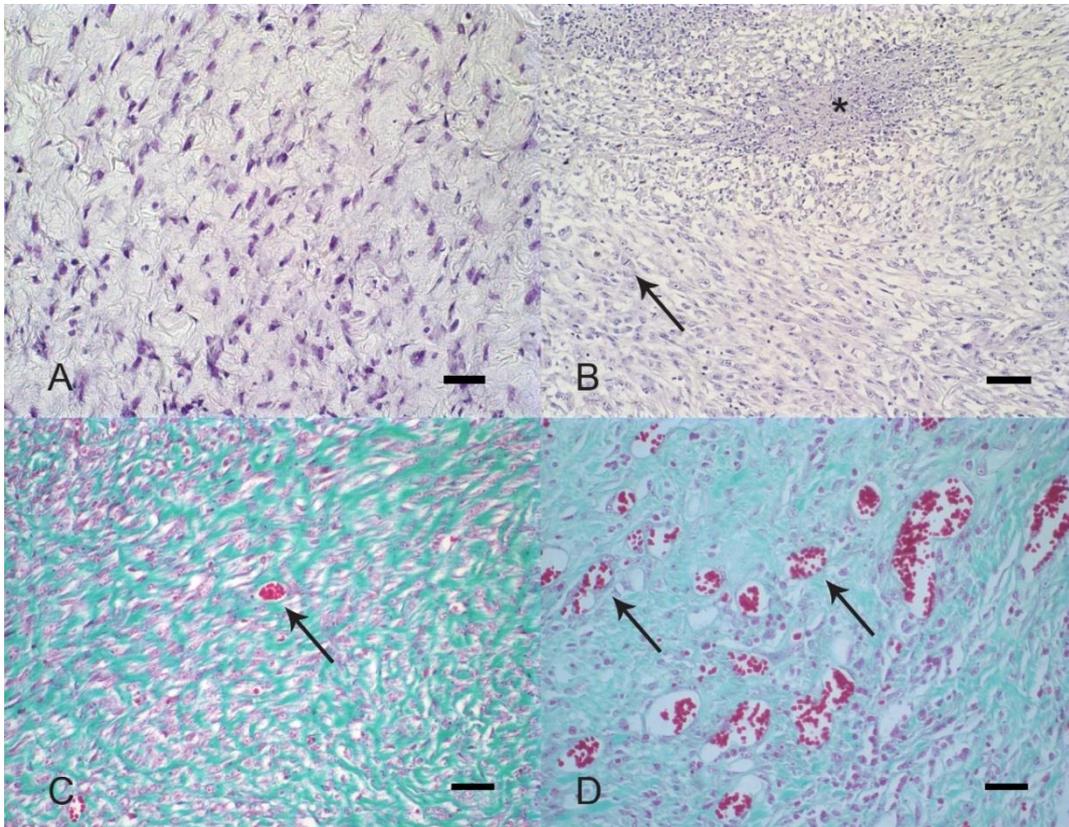
Um infiltrado inflamatório peritumoral foi observado em todas as amostras, sendo de origem linfocítica em 11/16 (68,75%) das amostras e linfoplasmocítica em 5/16 (31,25%) dos casos. A intensidade do infiltrado foi discreta em 9/16 (56,25%) e moderada em 7/16 (43,75%), conforme demonstrado nas figuras 2A e 2B. Em relação à distribuição foi considerado multifocal em 13/16 (81,25%), focal em 2/16 (12,5%) e difuso em 1/16 (6,25%) dos casos. Couto *et al.* (2002) também identificaram infiltrado inflamatório linfocítico na periferia tumoral de todas as amostras de SAF analisadas. Estes autores hipotetizam que miofibroblastos ativado pelo tumor formem uma cápsula protetora para o nódulo, prevenindo mecanicamente a penetração de linfócitos T e macrófagos no tumor, conforme já descrito por Lieubeau *et al.* (1999) para tumores colorretais em camundongos. No presente estudo, assim como no trabalho realizado por Couto *et al.* (2002), não se observou correlação entre a intensidade do infiltrado inflamatório e a graduação tumoral.

Folículos linfóides foram observados no infiltrado inflamatório de duas amostras, ambas constituindo-se em fibrossarcomas de grau III (Figura 2C). Houve correlação positiva moderada ( $p = 0,005$ ;  $r = 0,666$ ) entre a graduação e a formação de folículos linfóides em meio ao infiltrado inflamatório e correlação positiva moderada ( $p = 0,045$ ;  $r = 0,506$ ) entre o escore do infiltrado inflamatório e a ocorrência de folículos linfóides. Diversos autores citam a ocorrência de agregados linfóides perivascularares, entretanto nenhum deles correlaciona sua presença com quaisquer

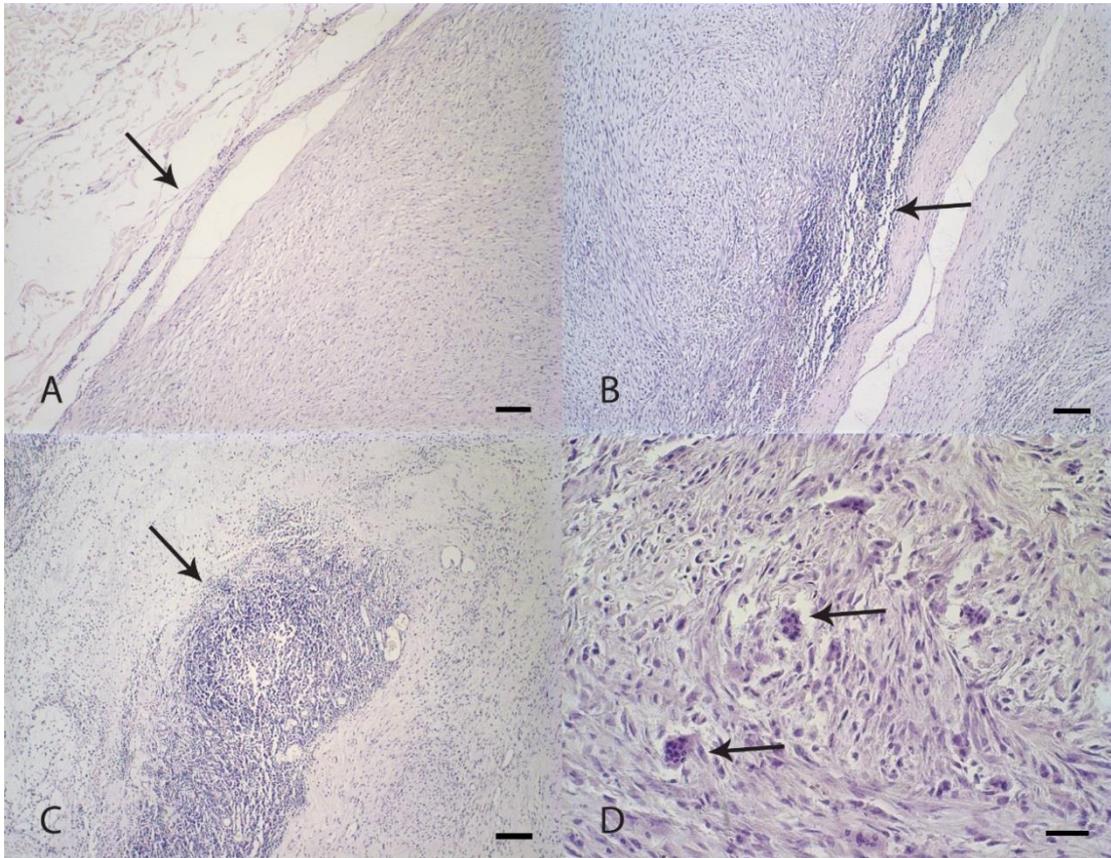
outros fatores da progressão ou diferenciação tumoral (Doddy *et al.*, 1996; Couto *et al.*, 2002; Nieto, 2003). Os resultados do presente estudo sugerem que a presença de infiltrado inflamatório organizado sob a forma de folículos linfóides possa se constituir em um fator prognóstico para pacientes com SAF.

Células tumorais gigantes e multinucleadas foram observadas em apenas 4/16 (25%)

casos, todas em tumores de grau II ou III (Figura 2D). A ausência de células gigantes em SAF de grau I corrobora com os achados de Couto *et al.* (2002) e Eickstein *et al.* (2009). Couto *et al.* (2002), entretanto, observaram correlação positiva entre a presença de células gigantes multinucleadas e a graduação tumoral. No presente estudo não foi observada correlação entre estas variáveis, mas observou-se uma tendência ao aparecimento de células gigantes nos tumores com graduação mais elevada.



**Figura 1.** Felino. Sarcomas de Aplicação. A. Neoplasia de baixo grau histológico apresentando células uniformes. Figuras de mitose e áreas de mitose não são observadas. Coloração de H&E. 30µm; B. Neoplasia de alto grau histológico revelando pleomorfismo celular moderado. Figuras de mitose (seta) e área de necrose (asterisco) podem ser observadas. Coloração de H&E. 30µm; C. Neoplasia contendo baixa densidade microvascular. Coloração de Tricrômico de Gomori. 30µm; D. Neoplasia contendo elevada densidade microvascular. Coloração de Tricrômico de Gomori. 30µm.



**Figura 2.** Felino. Sarcomas de Aplicação. A. Presença de infiltrado linfocítico peritumoral discreto (Seta). Coloração de H&E. 50µm; B. Presença de infiltrado linfocítico peritumoral intenso (Seta). Coloração de H&E. 50µm; C. Formação de foliculo linfóide peritumoral (Seta). Coloração de H&E. 50µm; D. Presença de células gigantes no interior do tumor (Setas). Coloração de H&E. 50µm.

A ausência de correlação pode estar relacionada ao menor número amostral utilizado neste estudo. Em pacientes humanos diagnosticados com sarcomas de tecido mole, a presença de células gigantes intratumorais se correlaciona com um fenótipo tumoral agressivo e invasivo, sendo esta uma das variáveis utilizadas para estimar prognóstico (Jösten e Rudolph, 1997). Avaliou-se a celularidade e quantidade de colágeno produzida pelos fibrossarcomas. A celularidade foi moderada em 8/11 (72,7%), alta em 2/11 (18,2%) e baixa em 1/11 (9,1%) das amostras. A produção de colágeno foi considerada alta em 4/11 (36,4%), moderada em 4/11

(36,4%) e baixa em 3/11 (27,2%). A maior produção de colágeno é esperada em tumores mais diferenciados, entretanto, não foi observada correlação desta variável com a graduação histológica. Houve correlação negativa moderada ( $p = 0,023$ ,  $r = -0,563$ ) entre a quantidade de colágeno produzida e a intensidade do infiltrado inflamatório. Este resultado pode ser mais uma evidência do envolvimento da inflamação no desenvolvimento e progressão dos SAF, visto que os tumores com menor diferenciação, e portanto tendência a pior comportamento biológico, apresentam maior inflamação ao seu redor.

A expressão de Cox-2 foi observada em 14/16 (87,5%) das amostras, sendo considerada baixa em 11/16 (68,75%), e alta em 2/16 (12,5%), conforme demonstrado nas figuras 3A e 3B. Carneiro (2012) relatou expressão de Cox-2 em 64% das 22 amostras analisadas, sem, entretanto, caracterizar a intensidade da marcação. Estes resultados contrastam com os obtidos por Beam *et al.* (2003), que não observaram expressão de Cox-2 ao avaliar dez amostras de SAF. Observou-se no presente estudo correlação positiva moderada ( $p = 0,028$ ;  $r = 0,546$ ) entre a graduação tumoral e a expressão de Cox-2, sugerindo que Cox-2 possa estar envolvida na progressão tumoral. Este achado opõe-se ao relatado por Carneiro (2012), que não observou relação da expressão de Cox-2 com graduação, taxa de recidiva ou sobrevida global dos pacientes.

O mecanismo de ação de Cox e seus metabólitos, como a prostaglandina, sobre os tumores, têm sido elucidado em diversos trabalhos. As prostaglandinas, produzidas através de Cox-2, podem aumentar a proliferação celular, inibir a apoptose, induzir a angiogênese, alterar a adesão celular de forma a facilitar o desenvolvimento de metástases, inibir a vigilância imune (Dempke *et al.*, 2001). No presente estudo não foi observada correlação entre Cox-2 e angiogênese intratumoral. É provável que outros fatores tenham maior importância no estímulo à angiogênese (que parece não ser muito proeminente) nos SAF, e que o efeito de Cox-2 sobre a progressão tumoral se deva a um ou mais dos vários mecanismos de ação descritos acima.

A análise imuno-histoquímica para Ki-67 foi possível em 12 casos. Diferenças na preservação antigênica podem estar relacionadas à ausência de marcação nas outras quatro amostras. Observou-se marcação variando entre 0 a 8,6% das células (média

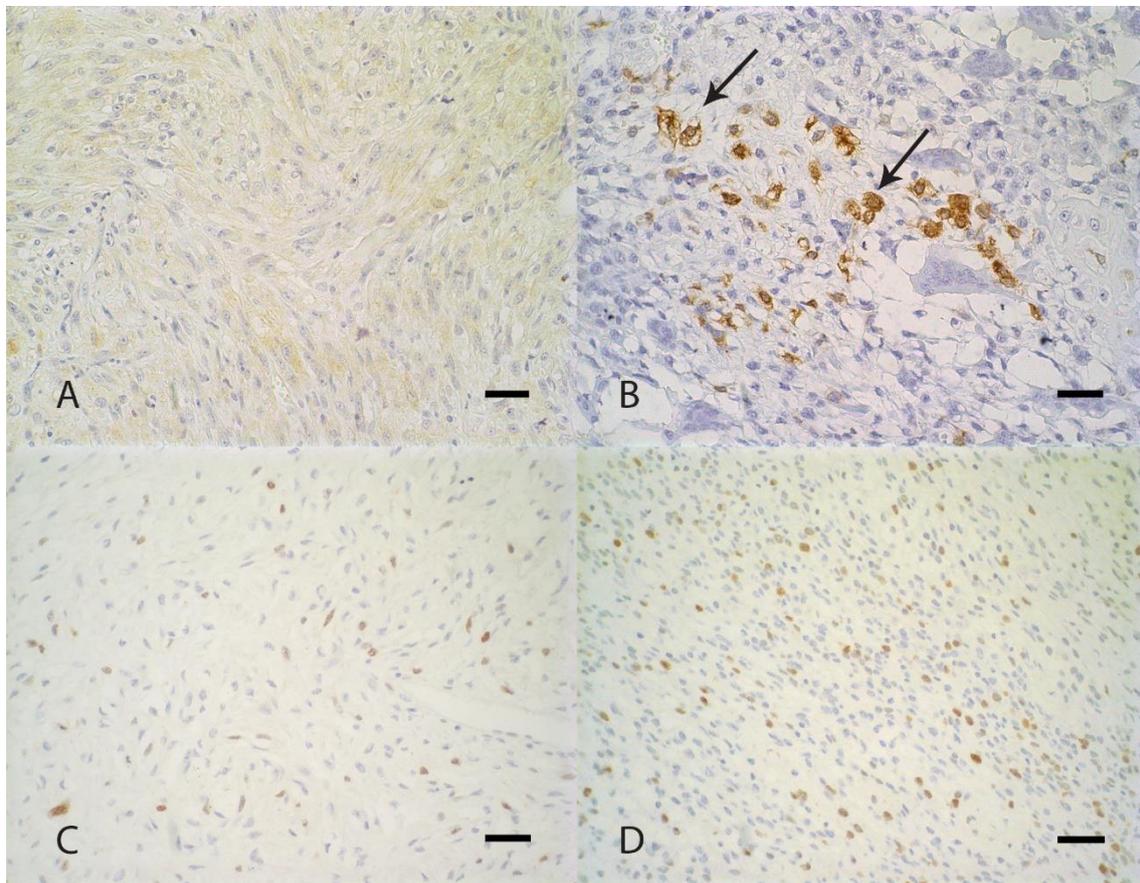
$2,39 \pm 2,48\%$ ), que pode ser considerada uma expressão baixa (Figura 3C e 3D). Eickstein *et al.* (2009) analisaram 52 amostras de SAF, sendo 51% delas grau III, e obtiveram marcação para Ki-67 em 0 a 40% das células tumorais (média 14%). A menor marcação para Ki-67 nas amostras do presente estudo podem estar relacionadas ao menor número de amostras de SAF grau III ou a diferenças nas populações estudadas. Couto *et al.* (2002) e Eickstein *et al.* (2009) não observaram diferença significativa na expressão de Ki-67 em SAF de graduações diferentes. Eickstein *et al.* (2009) relataram ausência de correlação entre a expressão tumoral de Ki-67 e a sobrevida em felinos apresentando sarcoma de aplicação, entretanto este estudo envolveu protocolos de tratamento muito variáveis, dificultando a avaliação dos resultados. Ki-67 é considerado um marcador prognóstico independente nos sarcomas de alto grau de vários subtipos histológicos que acometem seres humanos, para sobrevida livre de doença e de metástases (Heslin *et al.*, 1998). São necessários, portanto, estudos envolvendo maior amostragem de SAF grau III, para avaliar a real importância do Ki-67 como fator prognóstico para a doença.

No presente estudo, observou-se índice mitótico abaixo de 9 eventos em 11/16 (68,7%) amostras, e entre 10 e 19 eventos mitóticos em 5/16 (31,3%) casos. A maioria dos trabalhos sobre SAF descrevem a alta atividade mitótica deste tumor, sem, entretanto, quantificá-la (Hendrick e Brooks, 1994; Doddy *et al.*, 1996; Couto *et al.*, 2002). Carneiro (2012) apresentou a contagem mitótica em seu estudo de 22 casos de SAF no Brasil, e observou menos de 9 mitoses/10 campos em 77,3% dos casos; entre 10 e 19 em 18,2% e mais que 20 eventos mitóticos em apenas um caso (4,5%). Estes achados podem caracterizar uma diferença no comportamento biológico dos SAF no Brasil, em relação ao observado nos Estados

Unidos, ou pode estar relacionado ao pequeno número de amostras de grau III em ambos os estudos.

O pequeno índice mitótico e a baixa expressão de Ki-67 dos SAF podem explicar a baixa taxa de metastatização do tumor (0 a 22%) (Hershey, 2000; Bregazzi *et al.*, 2001) e a resposta inconsistente à quimioterapia e à radioterapia (Cohen *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002; Eckstein *et al.*, 2009). Hipotetiza-se que o comportamento agressivo dos SAF possa estar associado não

a seu crescimento intenso, mas ao seu caráter localmente invasivo, com ocorrência de projeções entre os planos fasciais nos tecidos, dificultando a exérese cirúrgica com margens livres de células neoplásicas, mesmo após intervenções agressivas. Este comportamento localmente invasivo também pode estar relacionado à recorrência de até 42% dos casos de SAF em que as margens cirúrgicas foram consideradas livres de células neoplásicas, conforme descrito por Kobayashi *et al.* (2002).



**Figura 3.** Felino. Sarcomas de Aplicação. A. Células neoplásicas apresentando imuno-marcação citoplasmática de intensidade fraca para COX-2. Estreptavidina-peroxidase, anti-COX-2, contracorado com hematoxilina de Harris. 30µm; B. Células neoplásicas apresentando imuno-marcação citoplasmática de intensidade forte para COX-2 (setas). Estreptavidina-peroxidase, anti-COX-2, contracorado com hematoxilina de Harris. 30µm; C. Neoplasia com imuno-marcação nuclear para MIB-1 revelando índice de proliferação celular baixo. Estreptavidina-peroxidase, anti-Ki-67, contracorado com hematoxilina de Harris. 30µm; D. Neoplasia com imuno-marcação nuclear para MIB-1 revelando índice de proliferação celular elevado. Estreptavidina-peroxidase, anti-Ki-67, contracorado com hematoxilina de Harris. 30µm.

A presença de necrose foi observada em 12 (75%) casos, sendo considerada de intensidade moderada em oito (66,7%) e alta em quatro (33,3%) delas. Couto *et al.* (2002) discutem a origem das áreas de necrose nos SAF, sugerindo que na região central do tumor, que apresenta mesmo índice proliferativo da periferia, porém menor atividade angiogênica, possa ocorrer necrose pela falta de suprimento sanguíneo. Outra possível explicação para as áreas de necrose seria uma reação secundária aos seromas pós-vacinais. Observou-se no presente estudo correlação negativa moderada ( $p = 0,122$ ;  $r = - 0,450$ ) entre a expressão de Ki-67 e a vascularização tumoral, sugerindo que o crescimento dos SAF possa ocorrer em proporção maior do que a angiogênese, decorrendo em pobre nutrição e oxigenação celular e consequente necrose.

### Conclusões

Nas condições em que este estudo foi realizado, pode-se sugerir que o comportamento agressivo dos SAF pode estar mais relacionado ao seu caráter invasivo do que ao seu índice proliferativo. Uma menor diferenciação tumoral nessas neoplasias pode estar associada à ocorrência de infiltrado inflamatório peritumoral organizado sob a forma de folículos linfóides. A graduação tumoral pode ser um fator prognóstico para o intervalo livre de doença em pacientes com SAF de grau baixo a intermediário e a expressão de Cox-2 está associada à maior graduação tumoral, sugerindo o envolvimento da enzima na progressão dos SAF. Além disso, um subtipo histológico que até então não havia sido relatado na literatura foi descrito no presente estudo, o tumor de bainha de nervo periférico maligno.

### Referências Bibliográficas

- BURTON, G; MASON, K.V. Do post vaccinal sarcomas occur in Australian cats? *Aust Vet Jou*, v.75, p.102-106, 1997.
- BREGAZZI, V. S.; LaRUE, S. M.; McNIEL, E.; *et al.* Treatment with a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine-associated sarcomas: 25 cases (1995-2000). *J Am Vet Med Assoc*, v.218, n.4, p.547-550, 2001.
- CARNEIRO, C.S; QUEIROZ, G.F; ZERWES, M.B.C; MATERA, J.M. Sarcoma de Aplicação Felino. *Semina: Ci Agrárias*, v.4 p.921-932, 2008.
- CARNEIRO, C.S. Caracterização dos pacientes portadores de sarcoma de aplicação feline quanto ao escore de condição corporal, à origem de sua formação e ao microambiente de seu desenvolvimento. 2012. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2012.
- COHEN, M.; WRIGHT, J. C.; BRAWNER, W. R.; *et al.* Use of a surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine-associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc*, v.219, n.11, p.1582-1589, 2001.
- COUTO, S.S.; GRIFFEY, S.M.; DUARTE, P.C.; *et al.* Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. *Vet Pathol*, v.39, p. 33 -41, 2002.
- DAVIDSON, E.B.; GREGORY, C.R.; KASS, P.H. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg*, v.26, p. 265- 269, 1997.

- DEMPKE, W.; RIE, C.; GROTHEY, A.; *et al.*: Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol*, v.127, p. 411 – 417, 2001.
- DODDY, F.D.; GLICKMAN, L.T.; GLICKMAN, N.W. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and nonvaccination sites. *J Comp Pathol*, v.114, p. 165-174, 1996.
- DUTRA, A. P.; GRANJA, N. V. M.; SCHMITT, F. C.; *et al.* C-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary 98 tumors. *Braz J Med Biol Res*, v.37, p.1673-1681, 2004.
- ECKSTEIN, C.; GUSCETTI, F.; ROOS, M.; *et al.* A retrospective analysis of radiation therapy for the treatment of feline vaccine-associated sarcoma. *Vet Comp Onco*, v.7, n.1, p. 54 – 68, 2009.
- GIUDICE, C.; STEFANELLO, D.; SALA, M.; *et al.* Feline injection-site sarcoma: Recurrence, tumour grading and surgical margin status evaluated using the three-dimensional histological technique. *Vet J*, v. 186, p. 84 -88, 2010.
- GOBER, G.M; KASS,P.H. World Wide Web-Based Survey of vaccination practices, postvaccination reactions, and vaccine-site associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc*, v.220, p.1477-1482, 2002.
- GREENHOUGH, A.; SMARTT, H.J.M.; MOORE, A.E.; *et al.* The COX-2/ PGE<sub>2</sub> pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumor microenvironment. *Carcinogenesis*, n.30, p. 377 – 386, 2009.
- GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J. *Veterinary Dermatopathology. St Louis, Mosby-Year Book, 1992; 484p.*
- HENDRICK, M.J.; GOLDSCHMIDT, M.H. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? (letter). *J Am Vet Med Assoc*, v.199, p.968, 1991.
- HENDRICK, M.J.; BROOKS, J.J. Postvaccinal sarcomas in the cat: Histology and immunohistochemistry. *Vet Pathol*, v.31, p. 126-129, 1994.
- HENDRICK, M.J.; SHOFR, F.S.; GOLDSCHMIDT, M.H.; *et al.* Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991 -1992). *J Am Vet Med Assoc*, v. 205, n.10, p. 1425 – 1429, 1994.
- HERSHEY, A. E.; SORENMO, K. U.; HENDRICK, M. J.; *et al.* Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). *J Am Vet Med Assoc*, v.216, n.1, p.58-61, 2000.
- HESLIN, M.J.; CORDON-CARDO, C.; LEWIS, J.J.; *et al.* Ki-67 detected by MIB-1 predicts distant metastasis and tumor mortality in primary, high grade extremity soft tissue sarcoma. *Cancer*, v.83, n.3, p. 490 – 497, 1998.
- HOOS, A.; STOJADINOVIC, A.; MASTORIDES, S. High Ki-67 Proliferative Index Predicts Disease Specific Survival in Patients with High Risk Soft Tissue Sarcomas. *Cancer*, v.92, n.4, 869 – 874, 2001.
- JÖSTEN, M; RUDOLPH, R. Methods for the differentiation of giant cells in canine and feline neoplasias in paraffin sections. *J Vet Med Sci*, v. 44, p. 159 -166, 1997.
- KANDEL, R.A.; BELL, R.S.; WUNDER, J.S.; *et al.* Comparison between a 2- and a 3-grade system in predicting metastatic-free survival in extremity soft tissue sarcoma. *J Surg Onc*, v.79, p. 77-82, 1999.

- KASS, P.H.; BARNES, W.G. Jr; SPANGLER, W.L.; *et al.* Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Assoc*, v.203, n.3, p.396-405, 1993.
- KNAPP, D.W.; RICHARD, R.C.; CHAN, T.C.; *et al.* Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Vet Int Med*, v.8, p. 273 - 278, 1994.
- KOBAYACHI, T.; HAUCK, M.L.; DODGE, R.; *et al.* Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. *Vet Radiol Ultras*, v.43, p. 473 - 479, 2002.
- LADLOW, J. Injection-Site Associated Sarcoma in the Cat: Treatment Recommendations and Results to Date. *J Fel Med Surg*, v.15, p.409 – 418, 2013.
- LAVALLE, G. E.; CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C.; *et al.* Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. *In Vivo*, v. 26, n. 3, p. 375-379, 2012.
- LESTER, S.; CLEMETT, T.; BURT, A. Vaccine site-associated sarcomas in cats: clinical experience and a laboratory review (1982 – 1993). *J Am Vet Med Assoc*, v. 32, n.2, p. 91 – 95, 1996.
- LIEUBEAU, B.; HEYMANN, M.F.; HENRY, F.; *et al.* Immunomodulatory effects of tumor-associated fibroblasts in colorectal tumor development. *Int J Cancer*, v. 81, p. 629 -636, 1999.
- LIPTAK, J.M; FORREST, L.J. Soft Tissue Sarcomas, p.356-380. In: WITHROW, S.J; MACEWEN, D.V. *Small Animal Clinical Oncology*, 5 ed., Missouri, Saunders, 2013.
- MARTANO, M.; MORELLO, E.; UGHETTO, M.; IUSSICH, S.; PETTERINO, C.; CASCIO, P.; BURACCO, P. Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. *Vet J*, v.170, n.1, p.84-90, 2005.
- MORRISON, W.B.; STARR, R.M.; VACCINE-ASSOCIATED FELINE SARCOMA TASK FORCE. Vaccine-associated feline sarcomas. *J Am Vet Med Assoc*, v.218, n. 5, p. 697 – 702, 2001.
- NIETO, A.; SANCHEZ, M. A.; MARTINEZ, E.; *et al.* Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor- $\alpha$  in feline vaccine-associated sarcomas. *Vet Pathol*, v.40, p.651-658, 2003.
- OCHÔA, C.; LOPES, C. Contributo para a caracterização dos sarcomas dos tecidos moles do gato e identificação de factores de prognóstico. *Rev Port Cien Vet*, v.103, p. 5 – 15, 2008.
- ROMANELLI, G.; MARCONATO, L.; OLIVERO, D.; *et al.* Analysis of prognostic factors associated with injection-site sarcoma in cats: 57 cases (2001 – 2007). *J Am Vet Med Assoc*, v. 232, n.8, p. 1193 – 1199, 2008.
- SHAW, S.C.; KENT, M.S.; GORDON, *et al.* Temporal changes in characteristics of injection-site sarcomas in cats: 392 cases (1990 – 2006). *J Am An Hosp Assoc*, v. 234, n.3, p. 376 – 380, 2009.
- SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The ki-67 protein: from de known and the unknow. *J Cell Phys*, v.182, p. 311-322, 2000.

SMITH, W.L.; DeWITT, D.L.;  
GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases:  
structural, cellular, and molecular biology.  
*Annu Rev of Biochem*, v.69, p. 145 -182,  
2000

WILCOCK, B; WILCOCK, A.;  
BOTTOMS, K. Feline Postvaccinal Sarcoma:  
20 years later (Brief Communication). *Can  
Vet J*, v. 53, p. 430-434, 2012.

## ARTIGO 2

### AValiação DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁpICO ADJUVANTE NO TRATAMENTO DE SARCOMA DE APLICAÇÃO FELINO

#### Evaluation of chemotherapy in the management of Feline Injection Site-Associated Sarcoma

##### Resumo – Palavras chave

O Sarcoma de Aplicação Felino (SAF) parece estar relacionado à inflamação profunda e persistente, secundária aos adjuvantes ou outros componentes de vacinas e medicamentos, através da transformação neoplásica de fibroblastos residentes, em gatos geneticamente predispostos. Apresenta morbidade e taxas de metastatização relativamente baixas, mas alta frequência de recorrência, implicando em redução na qualidade de vida e na sobrevida global dos felinos acometidos. Os SAF apresentam sensibilidade *in vitro* a doxorubicina, mitoxantrone, vincristina e paclitaxel, mas seu papel no tratamento clínico da doença ainda não está bem definido. A carboplatina tem sido administrada para os gatos no tratamento de uma variedade de carcinomas e sarcomas. Realizou-se estudo retrospectivo de 22 casos de SAF para avaliação do perfil dos pacientes e acompanhamento clínico de 13 pacientes para avaliação da eficácia do tratamento cirúrgico (G1: 5/38,5%) comparado ao tratamento cirúrgico associado à quimioterapia (G2: 8/61,5%). A complementação quimioterápica foi realizada com carboplatina, na dose de 200mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias ou com doxorubicina, na dose de 1mg/kg a cada 21 dias, ambas administradas por via endovenosa por quatro ciclos. A idade média dos pacientes foi de 7,8 anos e não foi observada predisposição de raça ou sexo. O tempo entre a percepção do nódulo e a busca por atendimento médico veterinário foi considerado alto, com média de 140,11 dias. Apenas 9% dos tumores localizavam-se nos membros, sugerindo que não tenha ocorrido modificação nos locais de aplicação em Belo Horizonte, apesar das recomendações desde 2001 para que aplicações em felinos sejam realizadas nos membros. Observou-se histórico de vacinação no local do tumor em cinco pacientes e de aplicação de anticoncepcional em um, podendo ser este o primeiro relato de SAF associado à anticoncepcionais. O diâmetro tumoral médio foi de 4,58 centímetros, considerado grande. O acompanhamento clínico foi realizado em 13 pacientes, por um período médio de 544 dias (30 - 1975 dias). Cinco (38,5%) pacientes foram submetidos somente à cirurgia e oito (61,5%) receberam também quimioterapia adjuvante. A recorrência local do tumor ocorreu em 100% dos pacientes, independentemente do tratamento realizado. A sobrevida global foi de 450 dias para G1 e 850 dias para G2 e o intervalo livre de doença foi de 221 e 180 dias para os G1 e G2, respectivamente. Apesar da ausência de significado estatístico da associação de quimioterapia ao tratamento cirúrgico de felinos com SAF, foi possível observar uma importante diferença nas médias de intervalo livre de doença e sobrevida global de pacientes submetidos ou não ao tratamento complementar. Desta forma, a quimioterapia parece ser uma ferramenta útil na melhora da qualidade e tempo de vida destes pacientes.

Palavras chave: Oncologia, Doxorubicina, Carboplatina, Sobrevida, Sarcoma Vacinal.

## Introdução

O Sarcoma de Aplicação Felino (SAF) foi inicialmente descrito por Hendrick e Goldschmidt (1991), que perceberam um grande aumento na incidência dos fibrossarcomas em felinos a partir de 1987. Este aumento coincidia com o início da obrigatoriedade da administração da vacina anti-rábica contendo adjuvantes, no nordeste dos Estados Unidos. Hipotetiza-se que a inflamação profunda e persistente, secundária aos adjuvantes ou outros componentes das vacinas, desencadeie a transformação neoplásica de fibroblastos residentes, em gatos geneticamente predispostos (Hendrick et al., 1994).

A frequência de desenvolvimento de sarcomas em locais de aplicação ainda não está bem definida, com relatos variando entre 0,32/10000 vacinações (Gobar e Kass, 2002) a 1/1000 aplicações (Hendrick et al., 1994; Lester et al., 1996). A presença de um nódulo em local comumente utilizado para injeções subcutâneas e intramusculares deve alertar o clínico para a possibilidade de SAF, e o diagnóstico presuntivo pode ser realizado através de citologia e o definitivo através de biópsia (Amorim, 2007).

Mesmo quando são instituídos tratamentos agressivos, a prevalência de metástases é de até 22,5% (Hershey et al., 2000). A completa excisão do tumor à primeira intervenção cirúrgica, com obtenção de amplas margens livres, parece contribuir para um melhor prognóstico (Davidson et al., 1997; Hershey et al., 2000). Morrison e Starr (2001) afirmam que, uma vez estabelecido o SAF, não existem boas opções de tratamento, sendo o prognóstico desfavorável. São necessários, portanto, maiores estudos quanto à patogenia e caracterização dos SAF, dando subsídios para que os médicos veterinários possam

optar pela melhor conduta terapêutica e preventiva.

A eficácia da quimioterapia no tratamento dos SAF ainda não está bem definida na literatura, com resultados variáveis nos estudos existentes (Ladlow, 2013). Dois estudos *in vitro* demonstraram a sensibilidade dose dependente de algumas linhagens de SAF à doxorubicina, mitoxantrone, vincristina e paclitaxel (Williams et al., 2001; Barneji et al., 2002). Alguns autores sugerem que a combinação de cirurgia com quimioterapia e/ou radioterapia possa aumentar o intervalo livre de doença (ILD) e a sobrevida global (SG), enquanto outros não observam diferença significativa em relação ao tratamento com cirurgia isolada (Cronin et al., 1998; Barber et al., 2000; Bregazzi et al., 2001; Cohen et al., 2001; Kobayashi et al., 2002; Poirier et al., 2002). A carboplatina tem sido administrada para os gatos no tratamento de uma variedade de carcinomas e sarcomas (Kent, 2013).

O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil dos gatos diagnosticados com SAF em Belo Horizonte e comparar a eficácia dos tratamentos envolvendo apenas excisão cirúrgica ou complementados com quimioterapia.

## Material e Métodos

Amostras de exames histopatológicos com diagnóstico de SAF, realizados entre 2001 e 2013, foram pesquisadas nos arquivos do Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas e do Setor de Patologia da Escola de Veterinária, ambos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os registros clínicos dos animais selecionados foram avaliados para coleta de informações como sexo, raça, idade, tempo

decorrido entre a percepção do nódulo e a procura pela assistência veterinária, histórico de aplicação de vacinas ou medicamentos no local do tumor, localização e tamanho tumoral, diagnóstico histológico, tratamento(s) realizado(s) e evolução clínica. Quando as informações não constavam dos registros clínicos do paciente, o médico veterinário e/ou proprietário do animal foram entrevistados.

Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com o tratamento recebido. No primeiro grupo (G1) foram alocados os animais submetidos apenas à intervenção cirúrgica, e no segundo (G2) aqueles que, além da cirurgia, receberam também quimioterapia. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados conforme as recomendações de buscar a obtenção de ampla margem, entretanto, sabe-se que a ressecção cirúrgica dos SAF pode ser difícil, por se tratarem de tumores pobremente encapsulados, com crescimento extenso e tendência à propagação por entre os planos fasciais (Kahler, 1993).

A complementação quimioterápica foi realizada com carboplatina, na dose de 200mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias ou com doxorubicina, na dose de 1mg/kg a cada 21 dias, ambas administradas por via endovenosa por quatro ciclos. Os critérios para instituição de quimioterapia e a escolha do protocolo de tratamento foram definidos pelos clínicos que conduziam o caso de cada paciente. A doxorubicina foi considerada o quimioterápico de primeira escolha, mas não foi utilizada nos gatos que apresentavam azotemia, devido ao seu potencial nefrotóxico. Os gatos agressivos e/ou agitados também não receberam doxorubicina, que requer um tempo de infusão mais longo do que a carboplatina, dificultando a administração do medicamento.

O tempo de SG foi definido (em dias) como o período entre a data da exérese cirúrgica do tumor até a data de óbito do animal em consequência da doença. Os animais que vieram a óbito por razões desconhecidas ou causas não relacionadas ao tumor, ou que deixaram de ser acompanhados, foram considerados censurados.

A SG dos animais foi avaliada em análise univariada. As curvas de SG foram derivadas da estimativa de Kaplan-Meier. Pelo teste log-rank os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## Resultados e Discussão

Entre 2001 e 2013 foram atendidos 22 gatos com suspeita de SAF, sendo 10/21 (47,6%) fêmeas e 11/21 (52,4%) machos. Devido ao caráter retrospectivo do estudo, não foi possível a obtenção de todas as informações pesquisadas, em alguns casos. Foram observados 14/17 (82,3%) gatos sem raça definida, 2/17 (11,8%) persas e 1/17 (5,9%) siameses. Estes dados corroboram com o descrito na literatura, não havendo predisposição de sexo ou raça para a doença (Doddy *et al.*, 1996; Hershey *et al.*, 2000, Nieto, 2003, Martano *et al.*, 2005). A idade ao aparecimento da doença variou de quatro a 14 anos (média 7,80 ± 3,21), em concordância com a média relatada na literatura de oito anos para pacientes com SAF - menor que a observada em gatos diagnosticados com sarcomas não associados à aplicação, que é de 11 anos, segundo Doddy *et al.* (1996).

Em nove pacientes foi possível estimar o tempo entre a percepção do nódulo pelo proprietário e a busca por assistência veterinária, que variou de um dia a 12 meses (média 140,11 ± 119,03 dias). Hershey *et al.* (2000), em estudo retrospectivo realizado nos Estados Unidos, relataram tempo médio de 60 dias entre a percepção do nódulo e o

atendimento veterinário. A demora dos proprietários dos pacientes envolvidos neste estudo em solicitar o auxílio do médico veterinário após perceber o aparecimento de um nódulo em seus animais pode refletir a falta de consciência do público geral sobre a existência e a gravidade dos SAF. Pode estar associada, também, ao grande número de felinos que são criados no peridomicílio, em Belo Horizonte, devido ao desconhecimento do conceito de posse responsável por muitas pessoas.

As recomendações da *Vaccine Associated Feline Sarcoma Task Force* (VAFSTF) para prevenção dos SAF incluem o tratamento agressivo de nódulos pós-vacinais que apresentem diâmetro maior que dois centímetros, persistam por três meses ou que aumentem de tamanho em um mês após a aplicação. Banerji (2006) afirma que a detecção precoce da doença, através da monitoração vigilante dos locais de aplicação, parece ser a forma mais eficiente de se obter um melhor prognóstico para o SAF. É essencial, portanto, a educação dos proprietários, por parte dos médicos veterinários, para que a progressão dos nódulos pós-aplicação seja acompanhada e a intervenção, quando necessária, seja realizada de forma precoce.

Quanto à localização tumoral, as lesões neoplásicas foram encontradas no dorso em 9/22 (41%), flanco em 6/22 (27,3%), região costal em 3/22 (13,7%), região lombar em 2/22 (9%) e porção distal de um membro em 2/22 (9%). O estudo incluiu pacientes com diagnóstico a partir de 2001, e as recomendações da VAFSTF de que as aplicações em felinos sejam realizadas apenas nos membros já estavam sendo amplamente divulgadas na comunidade científica veterinária (Morrison e Starr, 2001). Observou-se, portanto, que a maior parte dos sarcomas se desenvolveu em locais contraindicados para aplicações em felinos, podendo sugerir que as recomendações da

VAFSTF ainda não estão bem difundidas na rotina dos médicos veterinários em Belo Horizonte. Como o intervalo entre a aplicação e o aparecimento do nódulo pode chegar a 13 anos (média um a três anos) (Vaccine-Associated Feline Task Force, 2005), possíveis mudanças na localização das aplicações podem ter sido mascaradas. Shaw *et al.* (2009) descreveram, entretanto, uma rápida mudança no local de desenvolvimento dos sarcomas de aplicação entre 1990 e 2006, nos Estados Unidos. Houve grande redução nos casos de SAF no dorso e membros do lado esquerdo, com aumento dos casos em membros do lado direito e aspecto lateral direito do abdômen, o que acredita-se que se deva à aplicações aberrantes, intencionadas originalmente ao membro pélvico.

Observou-se histórico de vacinação no local do tumor em cinco pacientes e de aplicação de anticoncepcional em um. Nos demais pacientes, apesar da localização compatível com SAF, o histórico de aplicação de medicamentos não estava claro. Diversos estudos demonstram que a aplicação das vacinas anti-rábica e contra o FeLV são as principais implicadas com o aparecimento do tumor, porém existem relatos que citam a ocorrência dos SAF após a aplicação subcutânea e intramuscular da vacina tríplice felina (parvovírus, herpesvírus-1 e calicivírus) e de fármacos como antibióticos, dexametasona, metoclopramida, corticosteroides, antiparasitários e meloxicam (Burton e Mason, 1997; Esplin e McGill., 1999; Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force, 2005; Munday *et al.*, 2011). Na literatura consultada, não foram encontrados relatos de SAF associados à administração de anticoncepcional injetável, podendo ser este o primeiro relato. Entretanto, não é possível descartar que tenha ocorrido vacinação prévia no mesmo local, apesar de o proprietário do animal negar a aplicação de outras substâncias na região de

desenvolvimento do nódulo. Indica-se, portanto, a redução da utilização de aplicações injetáveis em felinos, e quando não puderem ser evitadas, a via subcutânea deve ser priorizada, pois a formação da massa sob a pele é mais facilmente observada pelos proprietários (Macy e Couto, 2001).

O tamanho do tumor, considerado como o maior diâmetro, foi definido pela avaliação macroscópica após a exérese cirúrgica em 14 casos, e variou de 0,5 a 10 centímetros (média  $4,58 \pm 3,24$  cm). Giudice *et al.* (2010) observaram média semelhante, de quatro centímetros (um a 15 cm). Os pacientes com SAF geralmente apresentam nódulos maiores do que aqueles com sarcomas não associados à aplicação. Sugere-se que o maior tamanho possa estar relacionado à dificuldade do proprietário em perceber um aumento de volume subcutâneo na região interescapular ou ao comportamento agressivo do tumor (Ladlow, 2013). Martano *et al.* (2005) observaram tendência (sem significado estatístico) a melhor prognóstico para os tumores com tamanho menor do que quatro centímetros, o que reforça, mais uma vez, a necessidade de que os médicos veterinários orientem os proprietários de felinos a acompanhar atentamente os locais onde foram realizadas aplicações de vacinas ou medicamentos.

O diagnóstico presuntivo foi obtido pela punção aspirativa por agulha fina (PAAF) seguida de citologia e o definitivo pela histopatologia, após a exérese cirúrgica. Sabe-se que o infiltrado inflamatório peritumoral, que é uma das principais características dos SAF, pode dificultar a interpretação da avaliação citológica. Martano *et al.* (2005) relataram que a citologia permitiu o diagnóstico de SAF em 50% dos casos avaliados, justificando a utilização rotineira do método, por ser menos invasivo e requerer menor tempo

para o diagnóstico. Pode ser necessária, entretanto, a realização de uma biópsia incisional para o estabelecimento do diagnóstico definitivo em alguns casos (Hauck, 2003). O ideal é que a amostra a ser biopsiada inclua três a cinco diferentes porções da massa tumoral para que haja material suficiente, aumentando a acurácia do exame (Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force, 2005). A coleta deve ser cuidadosa, e a área incisada não deve se estender do sarcoma para tecidos saudáveis (Ladlow, 2013). A biópsia excisional para fins diagnósticos deve ser vista com muita cautela, pois a remoção incompleta dos SAF aumenta o risco de recorrência local (Ladlow, 2003).

As margens cirúrgicas foram avaliadas quanto à presença de infiltração neoplásica em 8/22 (36,4%) casos, sendo consideradas livres em dois (25%). Nos demais casos, a ocorrência de infiltração neoplásica nas margens não foi avaliada. Como a obtenção de margens cirúrgicas livres de neoplasia é um fator importante para a predição de recorrência local do SAF, é essencial que o cirurgião solicite a complementação do exame histopatológico com avaliação das margens. É importante se reconhecer, portanto, que não apenas o cirurgião, mas também o médico veterinário patologista está crucialmente envolvido no manejo do SAF. O patologista é quem define se há infiltração neoplásica nas margens cirúrgicas, e as decisões terapêuticas pós-cirúrgicas são baseadas neste dado (Giudice *et al.*, 2010).

Um dos fatores prognósticos mais difundidos para o SAF é a completa excisão do tumor à primeira intervenção cirúrgica, com obtenção de amplas margens livres, que parece contribuir para a extensão do ILD (Davidson *et al.*, 1997; Hershey *et al.*, 2000) e aumento da SG (Davidson *et al.*, 1997). Kobayashi *et al.* (2002) relatam que o risco

de recorrência é dez vezes maior nos pacientes em que não foram obtidas margens cirúrgicas livres de neoplasia. Entretanto, existem relatos de até 50% de recorrência de tumores que foram excisados com margens cirúrgicas limpas (Kobayashi et al., 2003; Romanelli et al., 2008; Phelps et al., 2011). Além disso, dois estudos recentes relatam ausência de correlação entre o *status* das margens cirúrgicas e o prognóstico dos pacientes (Cohen *et al.*, 2001; Martano *et al.*, 2005). Estes autores discutem o real benefício de cirurgias tão agressivas conforme proposto até então, sugerindo que as intervenções cirúrgicas podem ser associadas a terapias complementares, como a quimioterapia e a radioterapia, para obtenção de ILD e SG semelhantes. O fato das margens classificadas como completas ainda apresentarem uma elevada percentagem de recorrência pode se associar ao fato de as células tumorais se disseminarem de forma assimétrica e infiltrativa, dificultando a avaliação precisa das margens (Ehrhart, 2013; Giudice *et al.*, 2010). Outra teoria discutida na literatura é de que a inflamação causada pelo procedimento cirúrgico possa provocar novo processo de oncogênese, em pacientes que parecem ser geneticamente predispostos, explicando a frequente “recorrência” de tumores que foram completamente excisados (Ladlow, 2013).

O acompanhamento clínico foi realizado em 13 pacientes (Tab. 1), por um período médio de 544 dias (30 - 1975 dias). A quimioterapia foi sugerida para todos os pacientes, para complementação do tratamento cirúrgico, entretanto, alguns proprietários não aderiram à terapia. Desta forma, cinco (38,5%) pacientes foram submetidos somente à cirurgia e oito (61,5%) receberam também quimioterapia adjuvante. Destes, quatro foram tratados com doxorubicina e quatro com carboplatina.

A doxorubicina tem sido relatada como o medicamento de escolha para o tratamento quimioterápico do SAF (Poirier et al., 2002). Este medicamento é comumente administrado aos gatos para tratamento de linfomas, carcinomas e sarcomas (Kent, 2013). O efeito adverso dose-limitante para este agente quimioterápico é a neutropenia, e também pode ocorrer anorexia. Uma particularidade do uso da doxorubicina nos gatos, que deve ser cuidadosamente avaliada, é a possibilidade de desenvolvimento de lesão e insuficiência renal mediante o acúmulo de altas dosagens (O’Keefe *et al.*, 1993). A toxicidade cardíaca aguda que se apresenta sob a forma de arritmias e a toxicidade crônica, dose-dependente, da cardiomiopatia dilatada, que podem ocorrer nos cães em tratamento com doxorubicina, não são relatadas nos gatos (Kent, 2013). Alguns estudos sugerem a carboplatina como tratamento adjuvante para os SAF, mas sua real colaboração ainda não foi elucidada (Kisseberth et al., 1996; Hauck, 2003). A carboplatina tem sido administrada para os gatos no tratamento de uma variedade de carcinomas e sarcomas (Kent, 2013). Assim como para a doxorubicina, a neutropenia é o efeito adverso dose-limitante, podendo ocorrer entre sete e 21 dias após a sessão quimioterápica (Hahn *et al.*, 1997).

No presente estudo, a recorrência local do tumor ocorreu em 100% dos pacientes, independentemente do tratamento realizado. Destes, apenas em 1/13 (6,25%) se conhecia o status das margens cirúrgicas, que estavam livres de células neoplásicas. A literatura descreve taxas de recorrência de 11% a mais de 80% (Davidson *et al.*, 1997; Hershey *et al.*, 2000). No presente estudo, a alta taxa de recorrência observada pode estar relacionada ao comprometimento das margens cirúrgicas. Deve-se pensar também no fato de que o acompanhamento clínico é mais facilmente realizado nos pacientes que apresentam recidiva, visto que nestes casos o

animal precisa retornar ao hospital veterinário.

O ILD para estes pacientes, independentemente do tratamento realizado, foi de 25 a 1670 dias (média 180 dias). O maior ILD (1670 dias) foi obtido pelo paciente cujas margens cirúrgicas eram conhecidas e consideradas livres. A SG média, independentemente dos tratamentos realizados para os pacientes com SAF foi de 630 dias. As maiores média de sobrevida global relatadas na literatura são de 901 dias, obtida em pacientes tratados com cirurgia agressiva, com obtenção de margens de três a cinco centímetros (Phelps *et al.*, 2001) e de 1300 dias, para pacientes que passaram por cirurgia e radioterapia (Eckstein *et al.*, 2009). Infelizmente, em Belo Horizonte ainda não é possível o tratamento de pacientes veterinários com radioterapia.

Observou-se ocorrência de metástase em 1/13 (7,7%) caso, em que o nódulo em dorso metastatizou para a região proximal do membro posterior do paciente. Dois pacientes apresentaram intensa infiltração tumoral (em um caso subcutânea e no outro, linfática), inviabilizando novo procedimento cirúrgico para exérese tumoral. Originalmente se acreditava que o risco de metástases do SAF era muito pequeno, mas hoje sabe-se que este risco provavelmente cresce à medida que aumenta o tempo de sobrevida do animal, podendo ocorrer em até 22% dos casos (Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force, 2005). Ainda não se sabe se o aumento no risco metastático ocorre apenas porque os gatos que recebem tratamento mais agressivo vivem por mais tempo, se tornando mais susceptíveis ao desenvolvimento das metástases, ou se alguns destes tratamentos podem estar diretamente associados às metástases (Wilcock *et al.*, 2012). As metástases ocorrem inicialmente nos pulmões, mas já foram observadas em outros sítios, como linfonodos regionais,

mediastino, pericárdio, fígado, ossos, pâncreas, intestino, baço e olhos (Ogilvie e Moore, 2002; Séguin, 2002). Ao diagnosticar um paciente com SAF, é importante, portanto, pesquisar a existência de metástases, principalmente em pulmões, através de exames de imagem, e de linfonodos regionais, que devem ser avaliados por palpação e, se necessário, também por citologia (Ladlow, 2013).

A evolução para óbito, por progressão do SAF, ocorreu em 69,2% dos pacientes (9/13), sendo 3/13 (23,1%) por eutanásia. Um paciente sofreu compressão medular pela massa neoplásica que recidivou na região da coluna lombar.

A SG foi de 450 dias para G1 e 850 dias para G2 (Figura 1) e o ILD foi de 221 e 180 dias para os G1 e G2 (Figura 2), respectivamente. Apesar da diferença observada nas médias, a análise estatística não foi significativa. Poirier *et al.* (2002) observaram aumento no ILD, mas não na SG, de pacientes que tiveram o tratamento cirúrgico complementado pela quimioterapia com doxorubicina ou doxorubicina encapsulada em lipossomos. Relataram intervalo livre de doença de 388 dias para os pacientes submetidos à quimioterapia associada à cirurgia e de 93 dias para aqueles tratados apenas com intervenção cirúrgica. Martano *et al.* (2005) compararam a associação de doxorubicina e cirurgia com cirurgia isolada e sugerem que a quimioterapia adjuvante não impacta sobre ILD, taxa de recorrência ou de metástases, mas pode aumentar as possibilidades de ressecção cirúrgica e ampliar a expectativa de vida de animais com massas até então consideradas inoperáveis. Barber *et al.* (2000) trataram 12 pacientes com tumores inoperáveis com uma combinação de doxorubicina e ciclofosfamida e observaram redução de até 50% no tamanho do tumor de seis pacientes, mas a resposta teve curta duração (média 125 dias), e todos

os gatos apresentaram doença progressiva. A SG dos pacientes que responderam à quimioterapia foi de 242 dias, enquanto a dos que não responderam foi de apenas 83 dias. Em estudo de fase I sobre o uso de carboplatina em felinos com câncer,

incluindo alguns pacientes com SAF, Kisseberth et al. (2008) obtiveram uma resposta parcial (<50% de redução tamanho inicial do tumor) e de curta duração, com recorrência média após 42 (7 -168) dias.

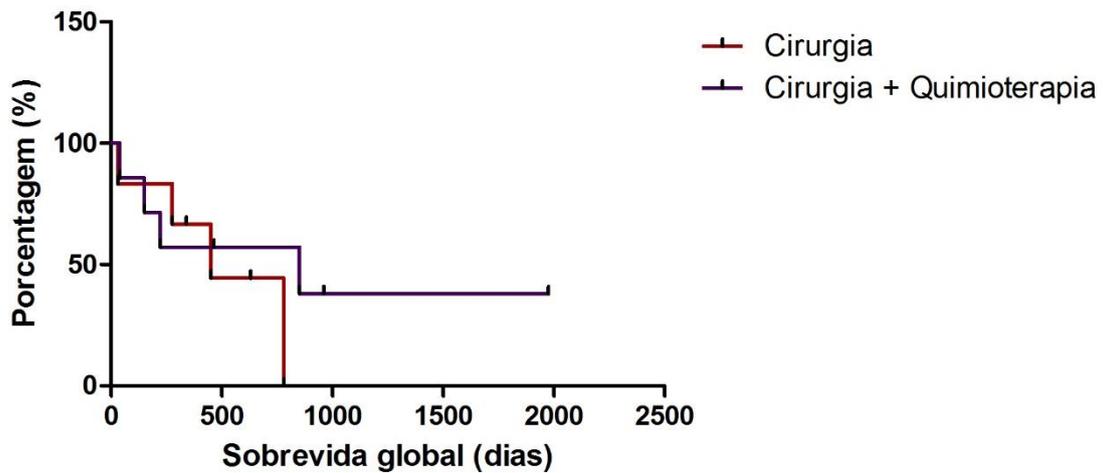


Figura 1 – Curvas de sobrevida global de pacientes com sarcoma de aplicação felino tratados com cirurgia isolada ou com associação de cirurgia e quimioterapia.

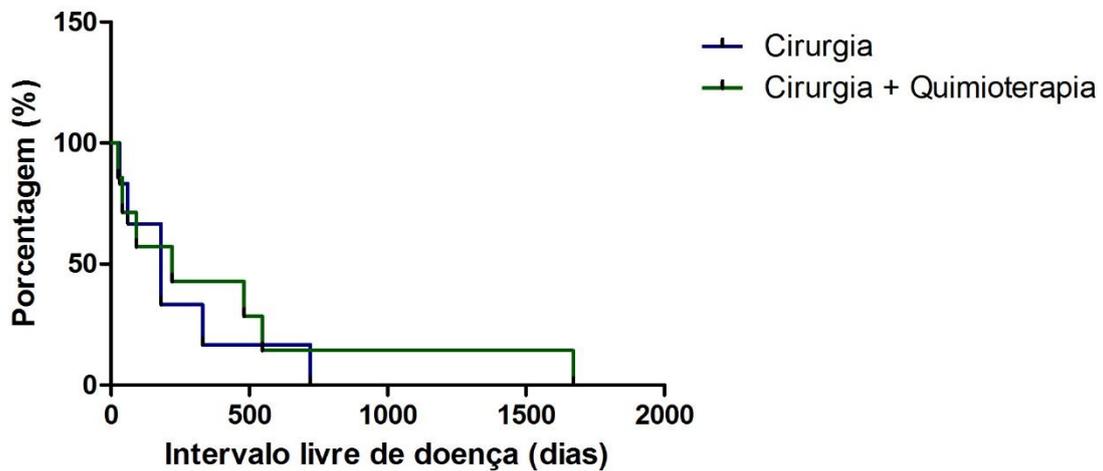


Figura 2 – Curvas de intervalo livre de doença de pacientes com sarcoma de aplicação felino tratados com cirurgia isolada ou com associação de cirurgia e quimioterapia.

Algumas limitações deste estudo são a amostra relativamente pequena, as dificuldades inerentes à avaliação retrospectiva e a variabilidade na conduta terapêutica adotada. Entretanto, deve-se destacar que a grande maioria dos estudos sobre o SAF foram realizados nos Estados Unidos, sendo uma doença ainda pouco estudada no Brasil. Esta é a segunda maior casuística já publicada no estudo do SAF no Brasil, e confirma a dificuldade de tratamento e a alta incidência de recidivas da doença.

## **Conclusões**

Nas condições em que este estudo foi realizado observou-se ausência de significado estatístico da associação de quimioterapia ao tratamento cirúrgico de pacientes com SAF. Entretanto, devido à importante diferença nas médias de intervalo livre de doença e sobrevida global entre os grupos que receberam ou não o tratamento complementar, sugere-se que a quimioterapia pode ser uma ferramenta útil na melhora da qualidade e tempo de vida de pacientes com SAF tratados cirurgicamente .

**Tabela 1 – Descrição dos casos de felinos com sarcoma de aplicação e acompanhamento clínico.**

CASO	SEXO	RAÇA	IDADE	LOCAL	MDT	TEV	QUIM	ILD	SG	OBS
1	F	-	7	Costal	5	-	-	720	780	
2	M	SRD	9	Flanco	-	-	Carbo	1670	Vivo (1975)	
3	M	Siamês	15	Dorso	2	-	-	330	630	Eutanásia por doença renal crônica
4	M	SRD	7	Dorso	4	1	-	60	340	Infiltração Subcutânea
5	F	SRD	6	Dorso	10	30	Carbo	40	40	Eutanásia SAF
6	F	SRD	10	MT	2	-	Doxo	221	221	Eutanásia SAF
7	F	SRD	-	Dorso	-	120	Doxo	10	Viva (960)	
8	M	SRD	8	Flanco	-	300	Doxo	546	850	Eutanásia SAF; Metástase MP
9	F	SRD	6	Lombar	3	60	Doxo	90	520	Eutanásia SAF – Compressão medular
10	F	SRD	14	Lombar	6	180	Carbo	480	150	
11	M	SRD	11	Dorso	-	-	Doxo	25	Viva (465)	
12	F	SRD	10	Dorso	-	-	-	180	275	Eutanásia SAF – Infiltração Linfática
13	M	SRD	4	MP	-	180	-	180	450	Eutanásia SAF

F – Feminino; M – Masculino; SRD – Sem Raça Definida; IDADE, em anos; MT – Membro Torácico; MP – Membro Pélvico; MDT – Maior diâmetro do tumor, em centímetros; TEV – Tempo de Evolução, em dias; QUIM – Quimioterapia; DOXO – Doxorubicina; CARBO – Carboplatina; ILD dias –Intervalo Livre de Doença, em dias; SG – Sobrevida Global, em dias; OBS - Observações

## Referências Bibliográficas

BANERJI, N.; KANJILAL, S. Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *Am J Vet Res*, v.67, n.10, p.1766-1772, 2006.

BANERJI, N.; LI, X.; KAPUR, V.; *et al.* Evaluation of in vitro chemosensitivity of vaccine-associated feline sarcoma cell lines to vincristine and paclitaxel. *Am J Vet Res*, v.63, n.5, p. 728-732, 2002.

BARBER, LG.; SONREMO, K.U.; CRONIN, K.L., *et al.* Combined doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy for nonresectable feline fibrosarcoma. *J Am An Hosp Assoc*, v.36, n.5, p. 416-421, 2000.

BURTON, G; MASON, K.V. Do post vaccinal sarcomas occur in Australian cats? *Aust Vet Jou*, v.75, p.102-106, 1997.

BREGAZZI, V. S.; LaRUE, S. M.; McNIEL, E.; *et al.* Treatment with a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine-associated sarcomas: 25 cases (1995-2000). *J Am Vet Med Assoc*, v.218, n.4, p.547-550, 2001.

COHEN, M.; WRIGHT, J. C.; BRAWNER, W. R.; *et al.* Use of a surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine-associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc*, v.219, n.11, p.1582-1589, 2001.

CRONIN, K.; PAGE, R.L.; SPODNICK, G.; *et al.* Radiation Therapy and Surgery for Fibrosarcoma in 33 Cats. *Vet Radiol Ultras*, v. 39, n.1, p. 51-56, 1998.

DAVIDSON, E.B.; GREGORY, C.R.; KASS, P.H. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg*, v.26, p. 265- 269, 1997.

DODDY, F.D; GLICKMAN, L.T; GLICKMAN, N.W. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and nonvaccination sites. *J Comp Pathol*, v.114, p. 165-174, 1996.

EHRHART, E.J.; DEBRA, A.K.; POWERS, B.E. The Pathology of Neoplasia. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. *Withrow & McEwen's Small Animal Oncology*. Elsevier, Missouri, 5 ed., p. 51 – 67, 2013.

ESPLIN, D.G.; MCGILL, L.D. Fibrosarcoma at the site of lufenuron injection in a cat. *Vet Cancer Soc News*, v.23, p.8 – 9, 1999.

GIUDICE, C.; STEFANELLO, D.; SALA, M.; *et al.* Feline injection-site sarcoma: Recurrence, tumour grading and surgical margin status evaluated using the three-dimensional histological technique. *Vet J*, v. 186, p. 84 -88, 2010.

GOBAR, G.M; KASS,P.H. World Wide Web-Based Survey of vaccination practices, postvaccination reactions, and vaccine-site associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc*, v.220, p.1477-1482, 2002.

HAHN, K.A.; McENTEE, M.F.; DANIEL, G.B.; *et al.* Hematologic and systemic toxicoses associated with carboplatin administration in cats. *Am J Vet Res*, v.58, p. 677-679, 1997.

HAUCK, M. Feline injection site sarcomas. *Vet Clin N Am - Small An Pract*, v.33, n.3, p.553-571, 2003.

- HENDRICK, M.J.; GOLDSCHMIDT, M.H. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? (letter). *J Am Vet Med Assoc*, v.199, p.968, 1991.
- HENDRICK, M.J.; SHOFER, F.S.; GOLDSCHMIDT, M.H.; *et al.* Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991 -1992). *J Am Vet Med Assoc*, v. 205, n.10, p. 1425 – 1429, 1994.
- HERSHEY, A. E.; SORENMO, K. U.; HENDRICK, M. J.; *et al.* Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). *J Am Vet Med Assoc*, v.216, n.1, p.58-61, 2000.
- KAHLER, S. Collective effort needed to unlock factors related to feline injection-site sarcomas. *J Vet Am Med Assoc*, v.202, n.10, p. 1551-1554, 1993.
- KENT, M.S. Cats and chemotherapy. *J Fel Med Surg*, v.15, p. 419-424, 2013.
- KISSEBERTH, W.C.; VAIL, D.M.; YAISSLE, J; *et al.* Phase I Clinical Evolution of carboplatin in tumor-bearing cats: a Veterinary Comparative Oncology Group Study. *J Vet Int Med*, v.22, n.1, p.83-88, 2008.
- KOBAYACHI, T.; HAUCK, M.L.; DODGE, R.; *et al.* Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. *Vet Radiol Ultras*, v.43, p. 473 - 479, 2002.
- LADLOW, J. Injection-Site Associated Sarcoma in the Cat: Treatment Recommendations and Results to Date. *J Fel Med Surg*, v.15, p.409 – 418, 2013.
- LESTER, S.; CLEMETT, T.; BURT, A. Vaccine site-associated sarcomas in cats: clinical experience and a laboratory review (1982 – 1993). *J Am Vet Med Assoc*, v. 32, n.2, p. 91 – 95, 1996.
- MACY, D.W.; COUTO, G.C. Prevention and Treatment of Injection-Site Sarcomas. *J Feline Med Surg*, v.3, n.4, p. 169-170, 2001.
- MARTANO, M.; MORELLO, E.; UGHETTO, M.; *et al.* Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. *Vet J*, v.170, n.1, p.84-90, 2005.
- MORRISON, W.B.; STARR, R.M.; VACCINE-ASSOCIATED FELINE SARCOMA TASK FORCE. Vaccine-associated feline sarcomas. *J Am Vet Med Assoc*, v.218, n. 5, p. 697 – 702, 2001.
- MUNDAY, J.S.; BANYAY, K.; ABERDEIN, D.; *et al.* Development of an injection site sarcoma shortly after meloxicam injection in an unvaccinated cat. *J Feline Med Surg*, v.13, n.12, p.988-991, 2011.
- NIETO, A.; SANCHEZ, M. A.; MARTINEZ, E.; *et al.* Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor- $\alpha$  in feline vaccine-associated sarcomas. *Vet Pathol*, v.40, p.651-658, 2003.
- O'KEEFE, D.A.; SISSON, D.D.; GELBERG, H.B.; *et al.* Systemic toxicity associated with doxorubicin administration in cats. *J Vet Inter Med*, v.7, p. 309 -317, 1993.

PHELPS, H.A.; KUNTZ, C.A.; MILNER, R.J.; et al. Radical excision with five-centimeter margins for treatment of feline injection-site sarcomas: 91 cases (1998-2002). *J Vet Am Med Assoc*, v.239, n.1, p.97-106, 2011.

POIRIER, V. J.; THAMM, D. H.; KURZMAN, I. D.; et al. Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil®) e doxorubicin in treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. *J Am Vet Med Assoc*, v.16, n.6, p.726-731, 2002.

SHAW, S.C.; KENT, M.S.; GORDON, et al. Temporal changes in characteristics of injection-site sarcomas in cats: 392 cases (1990 – 2006). *J Am An Hosp Assoc*, v. 234, n.3, p. 376 – 380, 2009.

VACCINE-ASSOCIATED FELINE SARCOMA TASK FORCE. The current understanding and management of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc*, v.213, p.1428-1429, 2005.

WILLIAMS, L.E.; BANERJI, N.; KLAUSNER, J.S.; et al. Establishment of two vaccine-associated feline sarcoma cell lines and determination of in vitro chemosensitivity to doxorubicin and mitoxantrone. *Am J Vet Res*, v.62, n.9, p. 1354 -1357, 2001.

**ARTIGO 3 (COMUNICAÇÃO)**  
**EXÉRESE DE NÓDULOS INFLAMATÓRIOS PÓS APLICAÇÃO EM**  
**FELINOS: UMA INTERVENÇÃO PREVENTIVA? – RELATO DE TRÊS**  
**CASOS**

**Resumo**

A vacinação é uma ferramenta importante para proteção do indivíduo e da população contra doenças graves, que se constituem em ameaça à vida dos animais. Entretanto, as vacinas também podem apresentar reações adversas leves, como a letargia e os granulomas pós aplicação, ou graves, como os sarcomas de aplicação (SAF). Os SAF parecem estar relacionados à inflamação local acentuada que ocorre após a aplicação de vacinas ou medicamentos em felinos e se constituem em doença grave, que reduz muito a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes acometidos. Três pacientes apresentando nódulos pós aplicação há mais de 30 dias foram acompanhados por 780 a 1800 dias, todos eles diagnosticados com reação inflamatória local, através de citologia e histopatológico. Optou-se pela exérese cirúrgica como forma de tratamento curativo. Nenhum dos pacientes apresentou complicações decorrentes dos granulomas no período de acompanhamento. Conclui-se que é essencial que os médicos veterinários esclareçam os proprietários de felinos quanto à possibilidade de reações locais após a aplicação de medicamentos e vacinas, que podem culminar com complicações neoplásicas que reduzem a expectativa e a qualidade de vida destes animais. A detecção precoce das lesões e instituição do tratamento definitivo, ainda na forma inflamatória, objetivam a cura e interrupção de um possível processo carcinógeno e devem ser considerados pelos médicos veterinários como forma de prevenção dos SAF.

O *Vaccine Guidelines Group* (VGG) da WSAVA (*World Small Animal Veterinary Association*) recomenda que sempre que possível todos os gatos recebam o benefício das vacinas. A vacinação não protege apenas o animal como indivíduo, pois devido à “herança imune”, os anticorpos são transmitidos também aos seus descendentes, o que minimiza a ocorrência de surtos de doenças infecciosas naquela população. As vacinas consideradas essenciais para todos os felinos, por prevenirem doenças graves e que se constituem em ameaça à vida dos animais, são as que protegem contra parvovírus felino, calicivírus felino e herpesvírus felino tipo 1. Nas áreas do mundo onde a raiva é uma doença endêmica, a vacinação anti-rábica também é considerada essencial. O VGG reconhece entretanto, a necessidade de se reduzir ao mínimo necessário a vacinação dos felinos,

para minimizar as potenciais reações adversas às vacinas (Day *et al.*, 2010).

Um estudo epidemiológico nos Estados Unidos, que avaliou as reações pós vacinais em gatos, relatou a ocorrência de efeitos adversos em 0,5% das 469 mil vacinas administradas, sendo a maior parte delas associada à letargia. As reações locais, incluindo inflamação, edema e dor, representaram 25% dos efeitos. Os felinos foram acompanhados por um a dois anos após a vacinação, e nenhum dos pacientes desenvolveu sarcoma de aplicação felino (SAF), nem mesmo os 428 pacientes que apresentaram reações locais no período de até 30 dias após a vacinação (Moore, 2007). Entretanto, sabe-se que o tempo entre a vacinação e o desenvolvimento do tumor pode variar de três meses a 14 anos (Vaccine Associated Feline Sarcoma Task Force,

2005), com 93% dos casos ocorrendo em até quatro anos (Hauck, 2003).

Nódulos pós vacinais são muito comuns, especialmente após a administração de vacinas que contêm adjuvantes (Macy, 2013). Segundo Macy e Couto (2001), algumas vacinas contra o vírus da raiva e o vírus da leucemia felina (FeLV) produzem nódulos em 100% dos pacientes após a aplicação (Macy e Couto, 2001). A maioria destes nódulos terão um curso benigno e se resolverão em até três meses (Macy 2013). Sabe-se que as reações locais após a vacinação ocorrem em uma frequência duas a cinco vezes maior em gatos do que em cães (Frana *et al.*, 2006).

A frequência de desenvolvimento dos SAF ainda não está bem definida, com relatos variando entre 0,32/10000 vacinações (Gobar e Kass, 2002) a 1/1000 aplicações (Hendrick *et al.*, 1994). A teoria mais aceita atualmente para a patogênese desta neoplasia é de que qualquer agente que cause inflamação local acentuada apresenta o potencial de desenvolver sarcoma (Jelinek, 2003). As vacinas contra raiva e FeLV são consideradas as principais implicadas com o aparecimento do tumor, porém existem relatos de SAF associados à aplicação subcutânea e intramuscular da vacina tríplice felina (parvovírus, herpesvírus-1 e calicivírus) e de fármacos como antibióticos, dexametasona, metoclopramida, corticosteroides, antiparasitários e meloxicam (Esplin *et al.*, 1999, Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force, 2005; Munday *et al.*, 2011).

Clinicamente, os SAF podem ser semelhantes aos granulomas benignos que ocorrem após injeções (Morrison *et al.*, 2001), por se tratarem de tumores sólidos e indolores (Kirpensteijn, 2006). A presença de um nódulo em local comumente utilizado para injeções subcutâneas e intramusculares deve alertar o clínico para a possibilidade de

SAF, e o diagnóstico pode ser realizado através de citologia e/ou biópsia (Amorim, 2007).

Entre 2007 e 2013, três pacientes com suspeita de SAF foram acompanhados pelo Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais. Estes felinos apresentavam nódulos de um centímetro de diâmetro (Figura 1A), com evolução há mais de 30 dias da aplicação de vacinas, em dois casos, e de medicamento desconhecido, em um caso. Tratavam-se de duas fêmeas e um macho, com idade variando entre dois e oito (média  $4,66 \pm 2,49$ ) anos.

Em todos os casos, o diagnóstico presuntivo foi realizado através de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) seguida de citologia, que sugeriu a ocorrência de processo inflamatório. Segundo Schultze *et al.* (2007), as características citológicas das reações subcutâneas pós-vacinais em gatos incluem infiltrados inflamatórios compostos primariamente por linfócitos, consistindo em uma reação inflamatória não supurativa. Carrol *et al.* (2007) relatam que os gatos apresentam maior concentração local de linfócitos, após a vacinação, em comparação a outras espécies animais. Schultze *et al.* (2007) afirmam que esta inflamação não supurativa pode ser atribuída aos adjuvantes vacinais que exacerbam a resposta imune normal.

Com o resultado do exame citológico, optou-se por realizar a exérese cirúrgica dos nódulos, em todos os casos. A intervenção cirúrgica neste momento é considerada curativa e é um procedimento pouco agressivo, por se tratarem de nódulos pequenos e não associados a neoplasia (Figura 1B). Segundo Ladlow (2013), se um granuloma é diagnosticado após a aplicação de um medicamento ou vacina, em teoria pode ser tratado apenas com excisão cirúrgica marginal. Já Gobar e Kass (2002)

relatam que apenas uma pequena proporção dos nódulos inflamatórios pós vacinais, estimada em 5%, está destinada à transformação maligna e acreditam que a excisão rotineira dos nódulos inflamatórios não é justificada. Entretanto, conforme afirmado por Morrison e Starr (2011) deve-se considerar que o SAF é uma importante

doença dos gatos e, embora várias terapias prolonguem a vida de alguns pacientes, o prognóstico geralmente é ruim, com evolução para eutanásia, na maioria dos pacientes, ao fim das possibilidades de tratamento, o que enfatiza a necessidade de prevenção.



A



B

Figura 1: Felino. Nódulo Pós Aplicação. A. Nódulo subcutâneo firme, com um centímetro de diâmetro. B. Ferida cirúrgica após excisão do nódulo.

O diagnóstico definitivo, obtido por histopatologia, foi de paniculite granulomatosa, para todos os casos. Desta forma, não foram necessários tratamentos complementares à cirurgia. Os pacientes foram acompanhados por 780 a 1080 (média  $886 \pm 136$ ) dias, e nenhum deles apresentou complicações associadas ao granuloma. Em um estudo com gatos com SAF tratados pela excisão cirúrgica, a taxa de recidiva foi de 80% no tempo médio de quatro meses após a excisão cirúrgica. Somente 10% dos gatos se tornaram livres do tumor pelo período de um ano após a excisão (Bregazzi *et al.*, 2001). A maior média de sobrevida global para felinos com SAF é de 1300 dias, mesmo com a instituição de tratamentos agressivos (Phelps *et al.*, 2011), mas a sobrevida média pode ser tão curta quanto 270 dias (Davidson *et al.*, 1997).

Frente à gravidade do SAF e à dificuldade de tratamento da doença, esta série de casos

corroborar com a afirmação de Banerji (2006), de que a detecção precoce da doença, através da monitoração vigilante dos locais de aplicação, parece ser a forma mais eficiente de se obter um melhor prognóstico para o SAF.

Os resultados sugerem que é essencial que os médicos veterinários esclareçam os proprietários de felinos quanto à possibilidade de reações locais após a aplicação de medicamentos e vacinas, que podem culminar com complicações neoplásicas que reduzem a expectativa e a qualidade de vida destes animais. A detecção precoce das lesões e instituição do tratamento definitivo, ainda na forma inflamatória, objetivam a cura e interrupção de um possível processo carcinógeno e devem ser considerados pelos médicos veterinários como forma de prevenção dos SAF.

## Referências Bibliográficas

BANERJI, N.; KANJILAL, S. Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *Am J Vet Res*, v.67, n.10, p.1766-1772, 2006.

BREGAZZI, V. S.; LaRUE, S. M.; McNIEL, E.; *et al.* Treatment with a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine-associated sarcomas: 25 cases (1995-2000). *J Am Vet Med Assoc*, v.218, n.4, p.547-550, 2001.

CARROLL, E.E.; DUBIELZIG, R.R.; SCHULTZ, R.D. Cats differ from mink and ferrets in their response to commercial vaccines: a histologic comparison of early vaccine reactions. *Vet Pathol*, v.39, p.216-227, 2002.

DAVIDSON, E.B.; GREGORY, C.R.; KASS, P.H. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg*, v.26, p. 265- 269, 1997.

DAY, M.J.; HORZINEK, M.C.; SCHULTZ, R.D.; *et al.* Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J Small An Pract*, v.51, p.1-32, 2010.

ESPLIN, D.G.; MCGILL, L.D. Fibrosarcoma at the site of lufenuron injection in a cat. *Vet Cancer Soc News*, v.23, p.8 – 9, 1999.

FRANA, T.S.; ELSKEN, L.A.; KARLI, S.A. Summary of adverse event reports for veterinary biologic products received by the USDA from 1999 through 2005. *J Am Vet Med Assoc*, v.229, p. 1100-1102, 2006.

GOBAR, G.M; KASS,P.H. World Wide Web-Based Survey of vaccination practices, postvaccination reactions, and vaccine-site associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc*, v.220, p.1477-1482, 2002.

HAUCK, M. Feline injection site sarcomas. *Vet Clin Small Anim*, v.33, p.553-571, 2003.  
MACY, D.W.; COUTO, G.C. Prevention and Treatment of Injection-Site Sarcomas. *J Feline Med Surg*, v.3, n.4, p. 169-170, 2001.

HENDRICK, M.J.; SHOFER, F.S.; GOLDSCHMIDT, M.H.; *et al.* Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991 -1992). *J Am Vet Med Assoc*, v. 205, n.10, p. 1425 – 1429, 1994.

JELINEK, F. Postinflammatory sarcoma in cats. *Exp Toxic Pathol*, v. 57, p. 167 – 172, 2003.

LADLOW, J. Injection-Site Associated Sarcoma in the Cat: Treatment Recommendations and Results to Date. *J Fel Med Surg*, v.15, p.409 – 418, 2013.

MACY, D.W. Feline vaccine associated sarcomas, 2013. Disponível em: [[http://www.cvm.ncsu.edu/conted/documents/VMF\\_2013\\_Macynotes.pdf](http://www.cvm.ncsu.edu/conted/documents/VMF_2013_Macynotes.pdf)]. Acesso em 10 de dezembro de 2013.

MOORE, G.E.; DE-SANTIS KERR, A.C.; GUPTILL, L.F.; *et al.* Adverse events after vaccine administration in cats: 2560 cases (2002-2005). *J Am Vet Med Assoc*, v.231, n.1, 2007.

MORRISON, W.B.; STARR, R.M.; VACCINE-ASSOCIATED FELINE SARCOMA TASK FORCE. Vaccine-associated feline sarcomas. *J Am Vet Med Assoc*, v.218, n. 5, p. 697 – 702, 2001.

MUNDAY, J.S.; BANYAY, K.; ABERDEIN, D.; *et al.* Development of an injection site sarcoma shortly after meloxicam injection in an unvaccinated cat. *J Feline Med Surg*, v.13, n.12, p.988-991, 2011.

PHELPS, H.A.; KUNTZ, C.A.; MILNER, R.J.; *et al.* Radical excision with five-centimeter margins for treatment of feline injection-site sarcomas: 91 cases (1998-2002). *J Vet Am Med Assoc*, v.239, n.1, p.97-106, 2011.

SCHULTZE, A.E.; FRANK, L.A.; HAHN, K.A. Repeated physical and cytologic characterizations of subcutaneous postvaccinal reactions in cats. *Am J Vet Res*, v.58, p.719-724, 2007.

VACCINE-ASSOCIATED FELINE SARCOMA TASK FORCE. The current understanding and management of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc*, v.213, p.1428-1429, 2005.

## **8. Considerações Finais**

Mesmo após 30 anos o Sarcoma de Aplicação Felino (SAF) ainda é considerado um desafio para os médicos veterinários e, embora várias terapias prolonguem a vida de alguns pacientes, o prognóstico geralmente é ruim.

Ainda não foram elucidados na Medicina Veterinária os fatores genéticos ou do sistema imune dos felinos que possam estar envolvidas no desenvolvimento do SAF em alguns indivíduos, após a administração de vacinas ou medicamentos por via parenteral.

Atualmente o principal papel dos médicos veterinários frente à doença é de prevenir a

sua ocorrência. A vacinação deve ser vista como um procedimento onde os protocolos devem ser individualizados de acordo com a real necessidade de cada paciente. As vacinas e demais medicamentos injetáveis devem ser administrados em locais passíveis de ressecção cirúrgica com amplas margens, essencialmente na região distal dos membros.

O papel do médico veterinário é fundamental, despertando a atenção dos proprietários de felinos a acompanharem a evolução de nódulos pós aplicação atentamente, para que o auxílio veterinário não seja tardio.

## 9. Referências Bibliográficas

- ALLRED, C. D.; HARVEY, J. M.; BERNARDO, M.; *et al.* Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, v. 11, n. 2, p. 155-168, 1998.
- AMORIM, F.V. Sarcomas de locais de injeção. *Acta Scient Vet*, v.35, s2, p. s221-s223, 2007.
- BANERJI, N.; KANJILAL, S. Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *Am J Vet Res*, v.67, n.10, p.1766-1772, 2006.
- BARBER, L.G.; SORENMO, K.U.; CRONIN, K.L.; SHOFER, F.S. Combined doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy for nonresectable feline fibrosarcoma. *Jou Am An Hosp Assoc*, v. 36, p. 416 – 421, 2000.
- BREGAZZI, V. S.; LaRUE, S. M.; McNIEL, E.; *et al.* Treatment with a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine-associated sarcomas: 25 cases (1995-2000). *J Am Vet Med Assoc*, v.218, n.4, p.547-550, 2001.
- BURTON, G; MASON, K.V. Do post vaccinal sarcomas occur in Australian cats? *Aust Vet Jou*, v.75, p.102-106, 1997.
- CARNEIRO, C.S; QUEIROZ, G.F; ZERWES, M.B.C; MATERA, J.M. Sarcoma de Aplicação Felino. *Semina: Ci Agrárias*, v.4 p.921-932, 2008.
- COHEN, M.;WRIGHT, J. C.; BRAWNER, W. R.; *et al.* Use of a surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine-associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000). *Jou Am Vet Med Assoc*, v.219, n.11, p.1582-1589, 2001.
- COUTO, S.S.; GRIFFEY, S.M.; DUARTE, P.C.; MADEWELL, R. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. *Vet Pathol*, v.39, p. 33 -41, 2002.
- CRAFT, P.S.; HARRIS, A.L. Clinical prognostic significance of tumour angiogenesis. *Ann Oncol*, v.5, p.305 – 311, 2004.
- CRONIN, K.; PAGE, R.L.; SPODNICK, G.; *et al.* Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats. *Vet Rad Ultrassound*, v. 39, n. 1, p. 51-56, 1998.
- DAVIDSON, E.B.; GREGORY, C.R.; KASS, P.H. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg*, v.26, p. 265- 269, 1997.
- DALY, M.K.; SABA, C.F.; CROCHIK, S.S.; HOWERTH, E.W.; KOSAREK, C.E.; CORNELL, K.K.; ROBERTS, R.E.; NORTHRUP, N.C. Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat. *Jou Fel Med Surg*, v.10, n.2, p. 202- 205, 2008.
- DODDY, F.D; GLICKMAN, L.T; GLICKMAN, N.W. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and nonvaccination sites. *J Comp Pathol*, v.114, p. 165-174, 1996.
- DORÉ, M. Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers. *Vet Pathol*, v.48, n.1, p. 254-265, 2011.
- EHRHART, E.J.; DEBRA, A.K.; POWERS, B.E. The Pathology of Neoplasia. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. *Withrow & McEwen's Small Animal Oncology*. Elsevier, Missouri, 5 ed., p. 51 – 67, 2013.

- ESPLIN, D.G.; MCGILL, L.D. Fibrosarcoma at the site of lufenuron injection in a cat. *Vet Cancer Soc News*, v.23, p.8 – 9, 1999.
- GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; *et al.* Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int Jou Cancer*, v.31, p. 13- 20, 1983.
- GOBAR, G.M; KASS,P.H. World Wide Web-Based Survey of vaccination practices, postvaccination reactions, and vaccine-site associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc*, v.220, p.1477-1482, 2002.
- GREENHOUGH, A.; SMARTT, H.J.M.; MOORE, A.E.; *et al.* The COX-2/ PGE<sub>2</sub> pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumor microenvironment. *Carcinogenesis*, n.30, p. 377 – 386, 2009.
- HAUCK, M. Feline injection site sarcomas. *Vet Clin North Am Small An Pract*, v.33, n.3, p.553-571, 2003.
- HENDRICK, M.J.; GOLDSCHMIDT, M.H. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? (letter). *J Am Vet Med Assoc*, v.199, p.968, 1991.
- HENDRICK, M.J.; BROOKS, J.J. Postvaccinal sarcomas in the cat: Histology and immunohistochemistry. *Vet Pathol*, v.31, p. 126-129, 1994.
- HENDRICK, M.J.; KASS, P.H.; MCGILL, L.D.; *et al.* Postvaccinal sarcomas in cats. *Jou Nat Cancer Inst*, v.86, n.5, p.648-657, 1994.
- HENDRICK, M.J.; SHOFER, F.S.; GOLDSCHMIDT, M.H.; *et al.* Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991 -1992). . *J Am Vet Med Assoc*, v. 205, n.10, p. 1425 – 1429, 1994a.
- HERSHEY, A. E.; SORENMO, K. U.; HENDRICK, M. J.; *et al.* Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). *Jou Am Vet Med Assoc*, v.216, n.1, p.58-61, 2000.
- HERSHEY, A. E.; DUBIELZIG, R. R.; PADILLA, M. L.; *et al.* Aberrant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis. *Vet Pathol*, v.42, n.6, p.805-811, 2005.
- HOOS, A.; URIST, M.J.; STOJADINOVIC, A.; *et al.* *Am Jou Pathol*, v.158, n.4, p.1245 -1251, 2001.
- JELINEK, F. Postinflammatory sarcoma in cats. *Exp Toxic Pathol*, v. 57, p. 167 – 172, 2003.
- KAHLER, S. Collective effort needed to unlock factors related to feline injection site sarcomas. *Jou Am Vet Med Assoc*, v. 202, p. 1551 – 1554, 1993.
- KASS, P.H.; BARNES, W.G. Jr; SPANGLER, W.L.; *et al.* Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Med Assoc*, v.203, n.3, p.396-405, 1993.
- KASS, H.K.; SPANGLER, W.L.; HENDRICK, M.J.; *et al.* Multicenter casecontrol study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc*, v. 223; p. 1283–1292, 2003.

- KIDNEY, B.A.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M.; *et al.* Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. *Am J Vet Res*, v. 61, p.1037–1041, 2000.
- KIDNEY, B.A.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M.; *et al.* Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res.*, v.62, p.1990–1994, 2001.
- KIDNEY, B.A.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M.; *et al.* Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for polyomavirus DNA and antigen. *Am J Vet Res*, v.62, p.828–832, 2001a.
- KIDNEY, B.A.; HAINES, D.M.; ELLIS, J.A.; *et al.* Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen. *Am J Vet Res*, v.62, p.833–839, 2001b.
- KIRPENSTEIJN, J. Feline injection site-associated sarcoma: Is it a reason to critically evaluate our vaccination policies? *Vet Microb*, v.117, p. 59 – 65, 2006.
- LADLOW, J. Injection-Site Associated Sarcoma in the Cat: Treatment Recommendations and Results do Date. *J Fel Med Surg*, v.15, p.409 – 418, 2013.
- LESTER, S.; CLEMETT, T.; BURT, A. Vaccine site-associated sarcomas in cats: clinical experience and a laboratory review (1982 – 1993). *J Am Vet Med Assoc*, v. 32, n.2, p. 91 – 95, 1996.
- MACY, D.W.; COUTO, C. G. Prevention and treatment of injection-site sarcomas. *J Fel Med Surg*, v.3, n.4, p.169-170, 2001.
- MARTANO, M.; MORELLO, E.; UGHETTO, M.; *et al.* Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. *Vet Jou*, v.170, n.1, p.84-90, 2005.
- MAULDIN, G.N. Soft Tissue Sarcomas. *Vet Clin N Am: Small An Pract*, v.37, n.1, p. 137 -148, 1997.
- MAYR, B.; REIFINGER, M.; ALTON, K.; *et al.* Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. *Vet Res Commun*, v.22, n.4, p.249-255, 1998.
- MCEWEN, E.G.; CHUN, R.; GARRET,L. Cancer Chemotherapy, p. 99 -113. In: WITHROW, S.J; MACEWEN, D.V. *Small Animal Clinical Oncology*, 3 ed., Missouri, Saunders, 2001.
- MORRISON, W.B.; STARR, R.M.; VACCINE-ASSOCIATED FELINE SARCOMA TASK FORCE. Vaccine-associated feline sarcomas. *J Am Vet Med Assoc*, v.218, n. 5, p. 697 – 702, 2001.
- MUNDAY, J.S.; BANYAY, K.; ABERDEIN, D.; *et al.* Development of an injection site sarcoma shortly after meloxicam injection in an unvaccinated cat. *J Feline Med Surg*, v.13, n.12, p.988-991, 2011.
- NAMBIAR, P.R.; JACKSON, M.L.; ELLIS, J.A.; *et al.* Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline vaccine site-associated sarcomas. *Vet Pathol*, v. 38, p. 236 – 238, 2001.
- NOVOSAD, C. A. Principles of treatment for vaccine-associated sarcomas. *Clin Tech Small An Pract*, v.18, n.2, p.115-117, 2003.

- RAMOS-VARA, J.A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol*, v.42, n.4, p.405-426, 2005.
- ROMANELLI, G.; MARCONATO, L.; OLIVERO, D.; et al. Analysis of prognostic factors associated with injection-site sarcoma in cats: 57 cases (2001 – 2007). *J Am Vet Med Assoc*, v. 232, n.8, p. 1193 – 1199, 2008.
- SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The ki-67 protein: from the known and the unknown. *Jou Cell Physiol*, v.182, p. 311-322, 2000.
- SÉGUIN, B. Feline Injection Site Sarcomas. *Vet Clin Nort Am Small Anim Pract*, v.32, n.4, p.983-995, 2002.
- SHARMA, S.; SHARMA, S.C.; SARKAR, C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview histoprostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathol*, v.46, p. 481-489, 2005.
- SMITH, W.L.; DeWITT, D.L.; GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Ann Rev Biochem*, v.69, p. 145 -182, 2000.
- VACCINE-ASSOCIATED FELINE SARCOMA TASK FORCE. The current understanding and management of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc*, v. 226, p. 1821-1842, 2005.
- VASCELLARI, M.; MELCHIOTTI, E.; MUTINELLI, F. Fibrosarcoma with typical features of postinjection sarcoma at the site of microchip implantation in a dog: histologic and immunohistochemical study. *Vet Pathol*, v. 43, n.4, p. 545 – 548, 2008.
- WEIDNER, N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat*, v.32, n.2, p.169-180, 1995.
- WERNER, B.; CAMPOS, A.C.; MEHDAD, N.; TORRES, L.F.B. Uso prático da imunohistoquímica na patologia cirúrgica. *J Bras Patol Med Lab*, v. 41, n.5, p. 353 – 364, 2005.
- WILCOCK, B.; WILCOCK, A.; BOTTOMS, K. Feline Postvaccinal Sarcoma: 20 years later (Brief Communication). *Can Vet Jou*, v. 53, p. 430-434, 2012.
- ZAFFE, D.; BERTOLDI, C.; PALUMBO, C.; et al. Morphofunctional and clinical study on mandibular alveolar distraction osteogenesis. *Clin Oral Implant Res*, v.13, n.5, p.550-557, 2002.
- ZUCCARI, D.A.P.C.; BERTON, C.R.; TERZIAN, A.C.B.; et al. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. *Arq Ciênc Saúde*, v.15, n.4, p.189-198, 2008.
- WILLIAMS, L.E.; BANERJI, N.; KLAUSNER, J.S.; et al. Establishment of two vaccine-associated feline sarcoma cell lines and determination of in vitro chemosensitivity to doxorubicin and mitoxantrone. *Am J Vet Res*, v.62, n.9, p. 1354 -1357, 2001.

ANEXO 1 – Protocolo de vacinação de felinos recomendado pela VASFTF (Morrison e Starr, 2001).

- 1) A vacinação é um procedimento médico, é devem ser customizados protocolos individuais de acordo com a necessidade de cada paciente. Nenhuma vacina deve ser administrada até que a importância médica e o potencial zoonótico do agente infeccioso, o risco de exposição do paciente, e os requerimentos da legislação local tenham sido avaliados.
- 2) Rotas alternativas de vacinação (ex: intranasal ou tópica) devem ser consideradas, quando disponíveis.
- 3) O desenvolvimento de sarcomas de aplicação ou de quaisquer efeitos adversos devem ser informados ao fabricante da vacina. O relato deve incluir o tipo de vacina, o número do lote e o local de vacinação. Estas informações também devem ser incluídas nos registros clínicos do paciente.
- 4) Os médicos veterinários devem padronizar os locais de aplicação de vacinas e de outros medicamentos injetáveis em sua rotina e documentar o local de cada aplicação, a substância administrada e o número do lote das vacinas e registrar todas essas informações na ficha clínica dos pacientes. São recomendados os seguintes locais para aplicação:
  - a) Vacinas tríplices ou quádruplas (limitadas aos agentes vírus da panleucopenia, herpesvírus felino tipo 1 e calicivírus felino, contendo ou não antígeno da *Clamídia*) devem ser administradas no membro anterior.
  - b) Vacinas que contenham o vírus da raiva, associado ou não a outros antígenos, devem ser administradas no membro posterior direito, o mais distal possível.
  - c) Vacinas contendo o antígeno da FeLV, contendo ou não outros antígenos, exceto o vírus da raiva, devem ser administradas no membro posterior esquerdo, o mais distal possível.

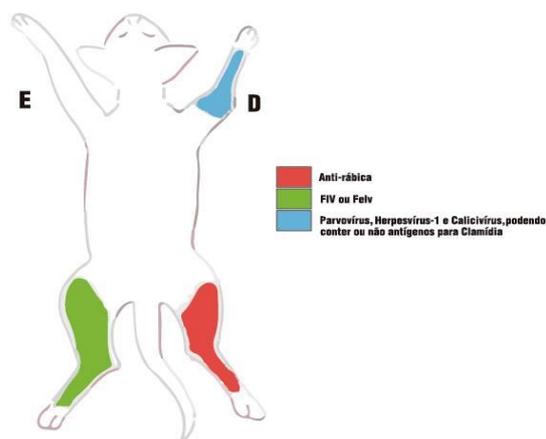


Figura 1 – Locais indicados pela VAFSTF para administração de vacinas em felinos. Anti-rábica: membro posterior direito; FIV e/ou Felv: membro posterior esquerdo; Tríplice ou Quádrupla Felina (Parvovírus, Herpesvírus-1, Calicivírus, podendo conter Clamídia): membro anterior direito