

**VIRGÍNIA VINHA ZANUNCIO**

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM  
SARCOMAS DE APLICAÇÃO EM FELINOS. ANÁLISE CLÍNICA E  
HISTOPATOLÓGICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição

Coorientadora: Fabrícia Hallack Loures

**VIÇOSA- MINAS GERAIS**

**2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Zanuncio, Virgínia Vinha, 1983-

Z34e  
2020

Expressão de receptores de estrógeno e progesterona em sarcomas de aplicação em felinos : análise clínica e histopatológica / Virgínia Vinha Zanuncio. – Viçosa, MG, 2020. 58 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.48-56.

1. Sarcoma. 2. Estrogênios. 3. Gatos.  
4. Imuno-Histoquímica. 5. Progesterona. 6. Cirurgia veterinária.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 616.994

VIRGÍNIA VINHA ZANUNCIO


**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA  
EM SARCOMAS DE APLICAÇÃO EM FELINOS. ANÁLISE CLÍNICA E  
HISTOPATOLÓGICA.**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, para obtenção do título de  
*Doctor Scientiae*.

APROVADA: 14 de julho de 2020.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Virginia Vinha Zanuncio  
Autora

  
\_\_\_\_\_  
Lissandro Gonçalves Conceição  
Orientador

Aos meus filhos, Bernardo e Henrique,  
por me mostrarem o real sentido da vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me guiar pelos caminhos nas horas incertas, me dando forças e me mostrando que posso muito mais do que imagino.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Departamento de Medicina e Enfermagem, que tornaram possíveis o meu crescimento profissional a partir do momento em que me aproximaram da vida acadêmica e me proporcionaram parte da infraestrutura física e humana necessárias para minha pós-graduação.

À FAPEMIG e CNPQ. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Ao Convênio Funarbe da Pós Graduação da Medicina Veterinária por parte do apoio financeiro.

A minha coorientadora, Fabrícia Hallack Loures, pela ajuda nas análises, incentivo e por estar sempre disponível a ajudar. Ao Laboratório de Patologia Comparada da UFMG por disponibilizar o espaço e estrutura física para realização da imuno-histoquímica, em especial a Bruna Lima por me ajudar nessa etapa. Ao meu coorientador, professor Geovanni Cassali, pelo apoio e transmissão de conhecimento.

Ao meu orientador, professor Lissandro Gonçalves Conceição, pela disponibilidade, por confiar em mim me dando autonomia para traçar meus objetivos e por me incentivar no âmbito da pesquisa, contribuindo de forma significativa para o meu crescimento profissional.

Ao meu aluno Kelvin Rocha pela ajuda nas análises estatísticas e por estar sempre disposto e interessado a aprender e ajudar!

Às professoras Catarina Sedyama e Flávia Diniz que gentilmente aceitaram participar da minha banca de defesa.

Agradeço ao meu pai, um grande pesquisador, pelas dicas, orientações e por compartilhar seu conhecimento comigo. À minha mãe pelo incentivo e por me passar tranquilidade quando tudo parecia fora do lugar! Ao meu esposo Ricardo, pela paciência, por me incentivar a correr atrás dos meus ideais, por entender minha ausência em certos momentos em que tive que conciliar doutorado, docência,

consultório e família. Aos meus filhos Bernardo e Henrique que me mostram diariamente a alegria de viver!

A todos que, de alguma forma, me ajudaram nessa conquista!!!

Tudo é possível!!! Desde que se tenha garra, fé e coragem!!!

*O SENHOR é meu pastor, nada me faltará.*

*(Salmo 23:1)*

## RESUMO

ZANUNCIO, Virgínia Vinha, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2020. **Expressão de receptores de estrógeno e progesterona em sarcomas de aplicação em felinos. Análise clínica e histopatológica.** Orientador: Lissandro Gonçalves da Conceição. Coorientadora: Fabrícia Hallack Loures.

O sarcoma de aplicação em felino (SAF) é uma neoplasia de origem mesenquimal que surge após a aplicação de vacinas ou medicamentos. Tem caráter agressivo, altas taxas de recorrência podendo gerar metástases. Reações inflamatórias crônicas são consideradas o gatilho para o início da fase maligna. Pacientes com tumores inoperáveis, doença residual, recidivante ou metastática tem poucas opções de tratamento. Isto mostra a importância de pesquisas para avaliar perfis da tumorigênese destas neoplasias e reconhecer alvos para a manipulação terapêutica. A expressão de receptores para estrógeno (RE) e progesterona (RP), no câncer de mama, são conhecidos e consolidados como preditores de bom prognóstico na medicina humana e veterinária. A expressão e o impacto desses receptores no prognóstico dos sarcomas de partes moles vem sendo estudada, principalmente em sarcomas uterinos em humanos, mas a expressividade dos mesmos, nos sarcomas cutâneos em gatos não é conhecida. O objetivo deste trabalho foi avaliar, por imuno-histoquímica, a expressão de RE e RP em 53 casos de sarcomas de aplicação em felinos, correlacionando-os com aspectos clínicos, histopatológicos e expressão de Ki67. Trata-se de estudo retrospectivo, com blocos de parafina. Características clínicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas foram variáveis preditoras e a expressão de RE, RP e tamanho tumoral variáveis dependentes. Mais da metade dos casos, 38 (81%), estavam localizados no tronco. O grau histopatológico III foi observado em 56,6% dos casos. A expressão de RE foi observado na maioria dos casos (64%) tendo associação significativa com número de mitoses ( $P=0,046$ ) e intensidade de pleomorfismo ( $P=0,019$ ). Não houve associação significativa entre RP e as variáveis estudadas e, 62% dos casos foram negativos para esse receptor. Houve correlação positiva entre Ki67, pleomorfismo e número de mitoses. Tamanho tumoral se associou com presença de células gigantes ( $P=0,049$ ). Desta forma, o estrógeno e tamanho tumoral, aparentemente, tem efeito na patogênese desses tumores. Estudos futuros poderão analisar e

comparar a expressão de RE com características clínicas prognósticas como recidiva, metástases e sobrevida e explorar uma possível ação dos moduladores dos RE e inibidores de aromatase na patogênese dessa doença, como terapêutica alternativa de baixo custo e com poucos efeitos colaterais.

**Palavras-chave:** Cirurgia veterinária. Estrógeno. Gatos. Imuno-histoquímica. Progesterona. Sarcomas. Vacinas.

## ABSTRACT

ZANUNCIO, Virgínia Vinha, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2020. **Expression of estrogen and progesterone receptors, clinical and histopathological analysis in feline injection site sarcomas.** Advisor: Lissandro Gonçalves da Conceição. Co-advisor: Fabrícia Hallack Loures.

Feline injection site sarcoma (FISS) is a neoplasm of mesenchymal origin, with an aggressive character, with high recurrence and can lead to metastases. This appears after the application of vaccines or medications. Chronic inflammatory reactions are considered the trigger for the onset of the malignant phase of this disease. Patients with inoperable tumors, residual, recurrent or metastatic disease have few treatment options. This shows the importance of research to evaluate the tumorigenesis profiles of these neoplasms and to recognize targets for therapeutic manipulation. The expression of estrogen (ER) and progesterone receptors (RP), in breast cancer, are known and consolidated as predictors of good prognosis in human and veterinary medicine. The expression and impact of these receptors on the prognosis of soft tissue sarcomas has been studied, mainly in uterine sarcomas in humans, but their expressiveness, in cutaneous sarcomas in cats, needs further studies. The objective of this work was to evaluate, by immunohistochemistry, the expression of ER and PR in 53 cases of FISS and correlating them with clinical, histopathological aspects and Ki67 expression. This is a retrospective study with paraffin blocks. Clinical, histopathological and immunohistochemical characteristics were the predictive variables and the expression of ER, RP and tumor size were the dependent variables. The trunk was the most affected site, with 38 cases (81%). Histopathological grade III was observed in 56.6% of the cases. The expression of ER was observed in most cases (64%) with a significant association with the mitotic index ( $P=0.046$ ) and pleomorphism ( $P=0.019$ ). Differences between PR and the clinical, histopathological and other immunohistochemical variables studied were not significant and 62% of cases were negative for this receptor. The Ki-67 antigen was positively correlated with the number of mitoses and pleomorphism. Tumor size was associated with the presence of giant cells ( $P=0.049$ ). Thus, estrogen and tumor size apparently have an effect on the pathogenesis of these tumors. Future studies will be able to analyze and compare the ER expression with prognostic clinical

characteristics such as recurrence, metastasis and survival and explore a possible action of ER modulators and aromatase inhibitors in the pathogenesis of this disease.

**Keywords:** Cats. Estrogen. Immunohistochemistry. Progesterone. Sarcomas. Vaccines. Veterinary surgery.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Sarcoma de Aplicação em Felino. Foto ilustrativa
Tabela 1	Sistema de Graduação para Sarcomas de Partes Moles
Tabela 2	Detalhamento dos anticorpos utilizados na imuno-histoquímica
Figura 2	Fluxograma Imuno-histoquímica do Laboratório de Patologia Comparada da UFMG
Figura 3	Localização anatômica dos sarcomas de aplicação em felinos
Tabela 3	Características histopatológicas dos Sarcomas de Aplicação em Felinos
Figura 4	Imunomarcção para Vimentina em Sarcoma de Aplicação em Felino
Figura 5	Imunomarcção para estrógeno em Sarcoma de Aplicação em Felino
Figura 6	Imunomarcção para progesterona em Sarcoma de Aplicação em Felino
Figura 7	Imunomarcção para Ki67 em Sarcoma de Aplicação em Felino
Figura 8	Estratificação da intensidade de expressão de receptores de estrógeno e progesterona, em função do grau histológico dos sarcomas de aplicação em felinos
Tabela 4	Características clínicas, histológicas e imuno-histoquímicas associadas à ausência ou presença de receptores de estrógeno
Tabela 5	Características clínicas, histológicas e imuno-histoquímicas associadas a ausência ou presença de receptores de progesterona
Tabela 6	Características clínicas, histológicas e imuno-histoquímicas em função do tamanho clínico do tumor em centímetros
Apêndice A	Expressão imuno-histoquímica em sarcomas de aplicação em felinos

## LISTA DE ABREVIATURAS

SAF- Sarcoma de Aplicação em Felino  
FeLV - Vacina contra leucemia felina  
RE - Receptores de estrógeno  
RP - Receptores de progesterona  
FPV - Vacina panleucopenia felina  
FHV-1 - Vacina herpes virus felino  
FCV - Vacina calicivírus felino  
PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas  
FGF-b- Fator de crescimento de fibroblasto básico  
TGF-alpha - Fator transformador do crescimento alfa  
MMP-2 e MMP-9 - Metaloproteinases de matriz  
TIMP-2- Inibidor de metaloproteinases de matriz  
TC - Tomografia computadorizada  
RNM - Ressonância nuclear magnética  
GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos felinos  
IL-2 - Interleucina 2  
INF- $\gamma$  - Interferon- $\gamma$   
PIF - Peritonite infecciosa felina  
IHQ - Imuno-histoquímica  
Ki67 - Índice de proliferação celular  
CEUA - Comissão de Ética para o Uso de Animais

## SUMÁRIO

1	Introdução .....	14
2	Revisão de Literatura .....	16
	2.1 Histórico de Epidemiologia .....	16
	2.2 Patogenia.....	17
	2.3 Características Clínicas, Histopatológicas e Imuno-histoquímicas.....	19
	2.4 Diagnóstico e Tratamento.....	22
	2.5 Fatores Prognósticos e Prevenção.....	24
3	Objetivo geral.....	27
	3.1 Objetivos Específicos.....	27
4	Material e Métodos.....	28
	4.1 Tipo de Estudo e amostra .....	28
	4.2 Histopatologia .....	28
	4.3 Imuno-histoquímica.....	29
	4.4 Análises Estatísticas .....	32
	4.5 Aspectos Éticos.....	33
5	Resultados.....	34
6	Discussão .....	43
7	Conclusão.....	47
8	Referências Bibliográficas .....	48
9	Apêndice .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

A incidência de tumores subcutâneos em gatos, em sítios de injeção, aumentou na década de noventa nos Estados Unidos (HENDRICK & DUNAGAN, 1991). Isto coincidiu com o aumento do uso da vacina antirrábica e da leucemia felina (FeLV), ambas com vírus mortos e adjuvantes da base de alumínio (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991). Esses tumores, identificados como sarcomas, passaram a ser chamados "fibrossarcomas associados a vacinas" ou "sarcomas pós-vacinais" ( HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991; HENDRICK; WANG, 1992). Outros estímulos, como injeção de material estranho, trauma, administração parenteral de medicamentos e implantação de microchip poderiam induzir reação inflamatória subcutânea ou intramuscular e acarretar transformação neoplásica com o surgimento dos sarcomas. Por isto, este nome foi considerado inadequado e esses tumores passaram a ser denominados sarcoma de aplicação felino (SAF) (CARMINATO *et al.*, 2001; DALY *et al.*, 2008; LADLOW, 2013).

Reações inflamatórias em resposta à administração de vacinas, medicamentos e corpo estranho, com maiores riscos com as primeiras, levam a proliferação descontrolada de fibroblastos e miofibroblastos resultando, conseqüentemente, no desenvolvimento dos SAF (LAWRENCE *et al.*, 2012; HARTMANN *et al.*, 2015).

Os SAF podem se desenvolver no subcutâneo ou compartimento intramuscular e, raramente, na derme, geralmente, como tumores firmes, indolores, bem circunscritos e móveis (HARTMANN *et al.*, 2015; PORCELLATO *et al.*, 2017). São neoplasias com rápido crescimento, alta agressividade local e capacidade para infiltrar tecidos adjacentes. Isto aumenta a necessidade de tratamentos cirúrgicos radicais, muitas vezes mutilantes e, mesmo assim, com altas taxas de recorrência ( MARTANO *et al.*, 2005; KLICZKOWSKA *et al.*, 2015).

A prevalência dos SAF é de 1 a 1,3 por 1000 gatos vacinados (COYNE & REEVES, 1992; LIPTAL & FOREST, 2007), mas esse índice pode ser maior, pois as estimativas baseiam-se apenas em tumores submetidos a análise histológica (MCENTEE & PAGE 2001; KIRPENSTEIJN, 2006). Esses tumores surgem entre alguns meses a cinco anos após a aplicação da injeção, mas o número e o local exato das mesmas são difíceis de serem estabelecidos na maioria dos casos (KLICZKOWSKA *et al.*, 2015). Os sarcomas de aplicação acometem, frequentemente, felinos (EGGERS CARROLL; DUBIELZIG; SCHULTZ, 2002),

embora tumores semelhantes foram relatados em furões (MUNDAY; STEDMAN; RICHEY, 2003) e, muito ocasionalmente, em cães (VASCELLARI *et al.*, 2003).

Os SAF são neoplasias mesenquimais de baixa prevalência, mas são, ainda, um problema na prática veterinária devido a sua agressividade local, caráter iatrogênico, alto índice de recidiva e possibilidade de metástases. Para uma melhor conduta terapêutica e preventiva dos mesmos, é necessário entender a patogênese, aspectos anatomo-clínicos e moleculares dessa doença (KIRPENSTEIJN, 2006). O reduzido número de opções terapêuticas para pacientes com tumores inoperáveis, doença residual, recidivante ou metastática, aumenta a necessidade de se estudar marcadores imuno-histoquímicos para terapias alvo, manejo adequado e melhoria do prognóstico dos SAF.

A expressão de receptores esteróides é um bom preditor para o prognóstico do câncer de mama (FISHER *et al.*, 1981;1983). A positividade para receptores de estrógeno tem sido, por mais de três décadas, o biomarcador mais importante, já que a terapêutica hormonal aumenta a sobrevida (SHAGUFTA; AHMAD, 2018). Estudos avaliaram também a expressão de receptores de estrógeno (RE) e receptores de progesterona (RP) em sarcomas de partes moles em humanos (VALKOV *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013), a maioria avaliando o impacto prognóstico e terapêutico desta expressão em sarcomas uterinos (IOFFE *et al.*, 2009; THANOPOULOU *et al.*, 2014). No entanto, a expressão dos receptores hormonais em sarcomas cutâneos, é pouco conhecida tanto na medicina humana quanto na veterinária.

O desenvolvimento de abordagens terapêuticas eficazes, com custo acessível e com menos efeitos colaterais que os tratamentos habituais é necessário. Isto poderá beneficiar pacientes com doença recorrente, residual ou metastática, onde a excisão cirúrgica não pode ser realizada e os tratamentos adjuvantes, como radioterapia e quimioterapia não são eficientes. O estudo da positividade e valor prognóstico da expressão dos RE e RP, nos SAF, é importante pela possibilidade de se utilizar inibidores da aromatase ou moduladores dos receptores de esteróides (terapia hormonal) como terapêutica alternativa e com menores efeitos colaterais, para os casos com RE e/ou RP positivos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por imuno-histoquímica (IHQ), a expressão de RE e RP em SAF correlacionando-a com aspectos clínicos, histopatológicos e expressão de Ki67.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Histórico e Epidemiologia

O aumento na incidência de sarcomas cutâneos em felinos a partir de 1987, no nordeste dos Estados Unidos, coincidiu com a obrigatoriedade da administração da vacina antirrábica e da FeLV, produzidas a partir de vírus inativado com adjuvantes a base de alumínio. Isto levou ao desenvolvimento de pesquisas sobre possíveis reações adversas pós vacinação em gatos, sendo os sarcomas as consequências mais graves (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991; HENDRICK & DUNAGAN, 1991). Esses sarcomas foram, também, diagnosticados após injeções de outras substâncias além das vacinas, logo, passaram a ser chamados sarcomas de aplicação em felinos (SAF) (CARMINATO *et al.*, 2001).

A incidência dos SAF varia entre os estudos, o que tem sido atribuído à dificuldades em se estudar tumores raros, diferença nos protocolos de vacinação entre países e reduzido entendimento dos fatores de risco associados ao desenvolvimento desses tumores (DEAN; PFEIFFER; ADAMS, 2013). Na Polônia, a prevalência geral de SAF em felinos foi de 0,16%, porém, 13% das amostras histopatológicas de gatos e 45% dos tumores subcutâneos, nos mesmos, eram SAF (KLICZKOWSKA *et al.*, 2015). A prevalência de 6,8 a 21,1% dos tumores ressecados submetidos a exame histopatológico foi relatada no Canadá em estudos com amostras coletadas durante vinte anos (WILCOCK; WILCOCK; BOTTOMS, 2012). No Brasil, uma incidência de 2,8% foi observada levando-se em conta amostras histopatológicas de felinos encaminhadas para análise (CECCO *et al.*, 2019). No entanto, a incidência no Reino Unido é, relativamente, baixa, um caso por 16.000-50.000 gatos registrados e um por 5000-12.500 gatos vacinados, o que pode ser devido ao fato da vacinação antirrábica não ser um procedimento de rotina nesse país (DEAN; PFEIFFER; ADAMS, 2013). Uma taxa de 1,2 casos e 1,5 casos de SAF por 10.000 felinos vacinados contra o vírus da leucemia felina (FeLV) e raiva, respectivamente, foi relatada (KASS *et al.* 1993). A prevalência da doença em felinos não diminuiu, mesmo com mudanças no protocolo de vacinação que padronizou frequência e locais anatômicos de aplicação dos tipos de vacina (VACCINE-ASSOCIATED FELINE SARCOMA TASK FORCE. 2005).

A idade dos gatos afetados varia de oito a 11 anos sem diferenças entre raça ou sexo (WILCOCK; WILCOCK; BOTTOMS, 2012).

## 2.2 Patogenia

A causalidade entre a patogênese dos SAF e sua relação direta com a vacinação ou outras injeções não está definida. A hipótese mais aceita é que uma reação inflamatória no local da injeção desencadeie um gatilho para expressar fatores de crescimento envolvidos na regulação da angiogênese, proliferação descontrolada de fibroblastos e miofibroblastos levando à transformação maligna (NIETO *et al.*, 2003; HARTMANN *et al.*, 2015). Os SAF são mais comuns em locais típicos de aplicação de vacinas e injeções, como região interescapular, lombar, parede torácica lateral e abdominal (HARTMANN *et al.*, 2015).

A vacina antirrábica e FeLV foram as únicas, inicialmente, relacionadas ao desenvolvimento desses sarcomas (HENDRICK *et al.*, 1994). No entanto, outras vacinas como contra a panleucopenia felina (FPV), herpesvírus-1 felino (FHV-1) e calicivírus felino (FCV) (BURTON; MASON, 1997; DE MAN; DUCATELLE, 2007) e medicamentos como, glicocorticoides de ação prolongada, penicilina (ESPLIN *et al.*, 1999; GAGNON, 2000; KASS *et al.*, 2003), cisplatina (MARTANO; MORELLO; BURACCO, 2011) e meloxicam (MUNDAY *et al.*, 2011) podem, também, estar envolvidas na patogênese. Gatos que receberam injeções de glicocorticoides com maior frequência na região interescapular desenvolveram mais sarcomas no local se comparado ao grupo controle (SRIVASTAV *et al.*, 2012).

Sarcomas subcutâneos foram, também, relatados em local de sutura não absorvível em um gato (BURACCO *et al.*, 2002) e adjacente ao local de implantação de microchip em dois felinos (DALY *et al.*, 2008; CARMINATO *et al.*, 2011). Associação entre a administração de vacinas e outros produtos injetáveis foi encontrada no desenvolvimento de SAF (SRIVASTAV *et al.*, 2012). A dificuldade em se colher a história patológica pregressa do felino não permite descartar vacinação prévia no local de aplicação das substâncias injetáveis. Assim, a implicação de outros agentes como causadores dos SAF, além das vacinas, pode ser infundada (WILCOCK; WILCOCK; BOTTOMS, 2012).

Vacinas com adjuvantes, como o alumínio encontrado em amostras de biópsia de SAF no interior de macrófagos e células gigantes (HENDRICK; WANG, 1992), parecem ser mais ligadas ao desenvolvimento desses sarcomas pela inflamação local mais intensa desencadeada por esses produtos (HENDRICK; WANG, 1992; MADEWELL *et al.*, 2001; SRIVASTAV *et al.*, 2012). Esse adjuvante é incorporado a vacinas inativadas para desencadear uma inflamação local necessária

para uma resposta imunológica adequada. No entanto, essa inflamação pode, potencialmente, gerar um descontrole na proliferação e morte celular resultado em transformação maligna (HARTMANN *et al.*, 2015).

Um modelo multifatorial de carcinogênese, incluindo fatores genéticos, iatrogênicos e locais pode explicar a patogênese dos SAF, ou seja, a resposta inflamatória individual do gato e as características da vacina (ou material injetado) são fundamentais no desenvolvimento desses tumores (HENDRICK, 1999). O fato de que nem todos os gatos desenvolvem SAF após a vacinação, a maior incidência em irmãos de gatos afetados e que alguns animais tendem a desenvolver mais de um sarcoma corroboram essa teoria (HARTMANN *et al.*, 2015). Hiperplóidia (KALAT M, MAYR B, SCHLEGER W, 1991), translocações (MAYR *et al.*, 1996) e mutações do gene supressor tumoral p53 foram encontrados em SAF (MAYR *et al.*, 1998; HERSHEY *et al.*, 2005). A expressão anormal dos fatores de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b) e fator transformador do crescimento alfa (TGF-alpha) são alterações genéticas que vêm sendo implicadas na patogênese dessa doença (HENDRICK; BROOKS, 1994; KIRPENSTEIJN, 2006).

Metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9), enzimas proteolíticas envolvidas na remodelação da matriz e facilitadoras da invasão tumoral e o inibidor de metaloproteinases de matriz (TIMP-2) não foram relacionados com o prognóstico dos SAF. Nesse estudo, a recidiva foi de 41%, mas nenhuma metástase foi relatada em dois anos de acompanhamento (PORCELLATO *et al.*, 2017).

Oncogenes virais poderiam facilitar o desenvolvimento acelerado de sarcomas em locais de aplicação, mas papilomavírus, herpes vírus e poliomavírus não foram correlacionados com a patogênese dos SAF (KIDNEY *et al.*, 2000; 2001; 2001a; 2001b).

Um estudo retrospectivo, com 345 gatos que apresentaram SAF, demonstrou um risco 50% maior de desenvolver sarcoma naqueles que receberam uma aplicação de vacina na região interescapular (local não indicado atualmente para vacinação) que os não vacinados. Esse risco aumentava para 127% para aqueles com duas aplicações e para 175% com três ou mais aplicações no local (KASS *et al.*, 1993).

### 2.3 Características Clínicas, Histopatológicas e Imuno-histoquímicas

Os sarcomas de aplicação são, geralmente, tumores firmes, bem circunscritos, parcialmente móveis, podendo apresentar necrose e ulceração (Figura 1) (HARTMANN *et al.*, 2015; KANG; SOUTHARD; HUME, 2017). Ocorrem, mais comumente, no subcutâneo, podendo estender-se para a musculatura, enquanto que os não relacionados à aplicação ocorrem com maior frequência na derme (PORCELLATO *et al.*, 2017). Na maioria das vezes, os SAF se aderem a planos profundos com rápido crescimento, invadindo estruturas adjacentes com projeções digitiformes (SÉGUIN, 2002).

O período de latência dos SAF é variável, podendo ser longo, dificultando a correlação entre o surgimento do tumor e história de vacinação, trauma ou injeção de outros agentes (GOBAR & KASS, 2002; MARTANO; MORELLO; BURACCO, 2011).



Figura 1. Sarcoma de Aplicação em Felino. Nódulo subcutâneo circunscrito localizado na região lateral do abdômen.

A maioria dos SAF são fibrossarcomas (72%), mas variantes histológicas como rabdomyossarcoma, myxossarcoma, lipossarcomas, leiomyossarcomas e sarcoma histiocítico foram relatadas (HARTMANN *et al.*, 2015; KLICZKOWSKA *et al.*, 2015). O tipo histopatológico do SAF é importante do ponto de vista morfológico, mas não difere com relação ao prognóstico da doença (ROMANELLI *et al.*, 2008; GIUDICE *et al.* 2010).

Os sarcomas são caracterizados, histopatologicamente, pela proliferação de células fusocelulares atípicas e uma quantidade variável de células gigantes

multinucleadas. Células inflamatórias (predominantemente linfócitos), áreas centrais de necrose e, em alguns casos, material azul acinzentado nos macrófagos, consistente com adjuvante de vacinas à base de alumínio podem ser encontrados. Áreas granulomatosas podem ser identificadas nas zonas de transição para sarcoma, sugerindo fortemente que a resposta inflamatória à vacinação antecede o desenvolvimento dos sarcomas nos gatos (HENDRICK *et al.*, 1994).

As características histológicas dos SAF, com evidente infiltrado perivascular linfo-histiocitário, necrose central e infiltração de células tumorais diferem dos sarcomas não relacionados à aplicação (MADEWELL *et al.*, 2001). Além disso, apresentam comportamento mais agressivo com rápido crescimento, invasão local e taxa de metástases se comparado aos demais sarcomas (HENDRICK *et al.*, 1994).

A técnica IHQ permite identificar receptores celulares e moléculas relacionadas à progressão tumoral e caracterizar o imunofenótipo das células neoplásicas, constituindo fatores prognósticos importantes (RAMOS-VARA *et al.*, 2005). Nessa técnica anticorpos antivimentina são específicos para proteína do filamento celular mesenquimal e todos os casos de SAF foram positivos para esse anticorpo (CARNEIRO *et al.*, 2019).

Outros marcadores foram analisados nos SAF. A expressão de c-kit (receptor de tirosino-quinase) nesses sarcomas foi baixa (26%) e sem associação com grau histológico e sobrevida. Além disso, a imunorreatividade para c-kit entre SAF e outros tipos de sarcoma foi semelhante (SMITH; NJAA; LAMM, 2009). Também foi avaliada a expressão aberrante de p53 nos SAF, pois células com ausência ou mutação desse gene sofrem desregulação do ciclo celular, dando origem a clones aberrantes com potencial de transformação maligna. A positividade citoplasmática anormal para p53 foi associada à recorrência mais precoce em relação a positividade anormal nuclear, porém com sobrevida semelhante (HERSHEY *et al.*, 2005).

A expressão de STAT3 (Signal transducers and activators of transcription) foi correlacionada com pior grau histológico dos SAF e o tratamento com doxorrubicina reduziu o grau de expressão do STAT3 (PETTERINO *et al.*, 2006).

Com relação à expressão de Cox-2, os resultados envolvendo sarcomas em felinos divergem. Não foi observado positividade desse marcador, por isto, o uso de inibidores de ciclooxigenase não estaria indicado nessa neoplasia (BEAM *et al.*,

2003), por outro lado a positividade desse marcador e a correlação positiva com grau do tumor sugerem relação com progressão tumoral (PEREIRA, 2014).

Receptores para hormônios esteroides regulam a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular e apoptose (FISHBEIN *et al.*, 2007). RE, ativados pelo hormônio 17 $\beta$ -estradiol (estrógeno), são responsáveis pelo crescimento e diferenciação das células alvo. RP tem ação antagonista, mas em condições experimentais contribuem para a proliferação celular epitelial (VALKOV *et al.*, 2011; PATT & HAINES, 2016). O significado prognóstico da expressão de RE e RP em neoplasias mamárias de cães (MILLANTA *et al.*, 2005; MILLANTA *et al.*, 2006) e gatos (AKKOC; INAN; SONMEZ, 2012) e adenocarcinomas endometriais em felinos (SARAIVA *et al.*, 2015) foi avaliado. Oitenta casos de sarcomas cutâneos em cães foram avaliados quanto a expressão de RE e RP sendo todos positivos para RP e negativos para RE. A positividade do primeiro foi correlacionada com o grau do tumor, atividade mitótica e índice de proliferação celular apontando para uma possível participação da progesterona no desenvolvimento desses tumores (LOURES *et al.*, 2020).

Em humanos, a expressão de receptores de esteroides em sarcomas uterinos e extrauterinos aumentou a sobrevida em caso de positividade dos mesmos (IOFFE *et al.*, 2009; VALKOV *et al.*, 2011; THANOPOULOU *et al.*, 2014). A sobrevida de paciente com leiomiossarcoma retroperitoneal metastático com RE positivo e uso de tamoxifeno foi maior que a usual (LI *et al.*, 2013). A positividade de RE e RP em leiomiossarcomas uterinos e extrauterinos nas mulheres foram altas, porém a expressão desses receptores nos sarcomas extrauterinos nos homens foi baixa (CARVALHO; THOMAS; LUCAS, 2009). A expressão de receptores de esteroides se correlacionou com um melhor prognóstico nesses sarcomas (CARVALHO; THOMAS; LUCAS, 2009; IOFFE *et al.*, 2009). A expressão de receptores de esteroides em sarcomas cutâneos em humanos (dermatofibrossarcoma) não teve associação com características clínicas (KREICHER *et al.*, 2016), apenas a associação entre RP e localização do tumor foi encontrada (MENG *et al.*, 2018).

Com relação ao osso, sabe-se que os osteoblastos expressam, fisiologicamente, RE. A expressão desse receptor é perdida nos osteossarcomas sugerindo que o estrógeno possa se comportar como um supressor tumoral. A reversão desse silenciamento epigenético dos RE com uso de inibidores da metiltransferase é uma opção terapêutica nesses sarcomas por promover a

diferenciação, inibir fatores de crescimento e proliferação celular (LILLO OSUMA *et al.*, 2019).

Não há estudos avaliando a expressão de RE e RP em sarcomas subcutâneos em gatos nem o impacto do uso de moduladores de receptores de esteroides ou inibidores da aromatase no prognóstico desses sarcomas.

#### **2.4 Diagnóstico e Tratamento**

O diagnóstico definitivo de SAF é feito por biópsia e exame histopatológico da massa subcutânea que pode ser guiada por exames de imagem (LADLOW, 2013). A citologia, realizada por punção com agulha fina, tem menor acurácia diagnóstica porém, pode excluir diagnósticos diferenciais como abscessos (SABA, 2017).

O SAF é, geralmente, diagnosticado em estágios avançados, com mais de 35% dos tumores tendo diâmetro maior que cinco centímetros e, apenas, 25% dos casos menores que dois centímetros (KLICZKOWSKA *et al.*, 2015). Em 2015, um *guideline* europeu propôs uma diretriz para realizar biópsia de qualquer massa que persistir após três meses da vacinação (após a vacinação há um processo inflamatório esperado com formação de nódulo em 100% dos casos necessário a estimulação imunológica, mas que deve regredir em até três meses), for maior que dois centímetros ou com crescimento progressivo após um mês da vacinação (HARTMANN *et al.*, 2015).

Os critérios para o diagnóstico dos SAF incluíam a visualização de material da vacina fagocitado pelos macrófagos, história de administração de vacinas e localização em sítios da vacinação. Esses critérios, muito rigorosos, subestimavam os casos de SAF que eram considerados muito raros, de 1 a 13 por 10.000 gatos (HENDRICK *et al.*, 1992, HENDRICK *et al.* 1994). O número de sarcomas, em um universo de 31.671 gatos, associado ao sítio da vacina foi ainda menor, 0,63 por 10.000 animais (GOBAR; KASS, 2002). A história de injeção local e a vacina administrada são de difícil determinação além de raramente ser encontrado material acinzentado no interior dos macrófagos (KLICZKOWSKA *et al.*, 2015). Por isto, passou-se a considerar a presença de dois critérios para o diagnóstico de SAF: caráter histopatológico de tumor mesenquimal maligno e topografia em local onde as injeções são rotineiramente realizadas (KLICZKOWSKA *et al.*, 2015). Desta forma, a prevalência de SAF na população de gatos aumentou e toda massa que preencher

esses critérios deve ser tratada como SAF, ou seja, de forma agressiva (SABA, 2017).

O tamanho real e limites da neoplasia devem ser determinados com tomografia computadorizada (TC) ou ressonância nuclear magnética (RNM), pois o tamanho tumoral geralmente é maior que o estimado pelo exame físico (TRAVETTI *et al.*, 2013). Isso aumenta a chance de uma excisão total e sobrevida livre da doença (LADLOW, 2013). Além disso, esses métodos de imagem são úteis no diagnóstico de metástases (HARTMANN *et al.*, 2015) e no pós-operatório, fornecendo informações sobre a área que precisa ser reabordada ou guiando o campo de radiação (MCENTEE; PAGE, 2001).

O exame físico completo com palpação de linfonodos além da solicitação de hemograma completo, bioquímica sérica, urinálise, radiografia de tórax (três incidências) e ultrassonografia da cavidade abdominal são necessários para o estadiamento dos SAF (SÉGUIN, 2002).

A taxa de metástase dos SAF varia entre 10-28% (HERSHEY *et al.*, 2000), sendo o pulmão o local mais comum, seguido de linfonodos regionais, rim, baço, intestino e fígado (SANDLER; TEEGER; BEST, 1997; KOBAYASHI *et al.*, 2002).

A terapia de primeira linha para os SAF é a cirurgia radical agressiva com margens laterais e profundas de cinco e dois centímetros respectivamente, para evitar a recorrência do tumor (PHELPS *et al.*, 2011). Casos em que se tenha acometimento de estruturas ósseas, como escápula, processo espinhoso ou pelve devem ser removidos durante a cirurgia (SÉGUIN, 2002). Exame histopatológico das margens cirúrgicas, após a excisão do tumor, é obrigatório para garantir sua excisão completa (ZABIELSKA-KOCZYWAŚ; WOJTALEWICZ; LECHOWSKI, 2017). No entanto, a relação entre tamanho das margens e as taxas de recorrência, em 24 casos de SAF, não foi demonstrada, mas os tumores devem ser ressecados com margens livres (PORCELLATO *et al.*, 2017). A recidiva ocorreu, geralmente, nos primeiros seis meses após a cirurgia (HENDRICK *et al.*, 1994), em 19-22% dos tumores com margens livres a microscopia comparado com 58-69% para aqueles excisados com margens comprometidas (GIUDICE *et al.*, 2010; PHELPS *et al.*, 2011).

As complicações mais comuns no pós-operatório são seroma, deiscência e infecções (ROMANELLI *et al.*, 2008; PHELPS *et al.*, 2011). A duração da cirurgia foi

o único fator envolvido em complicações com a ferida operatória após exérese dos SAF (CANTATORE *et al.*, 2014).

A associação de tratamentos neo e adjuvantes como radioterapia, quimioterapia e/ou imunoterapia, dependendo do estadiamento do paciente, melhora o prognóstico dos SAF (ZABIELSKA-KOCZYWAŚ; WOJTALEWICZ; LECHOWSKI, 2017). Radiação pré-operatória ou pós-operatória diminui as taxas de recorrência e prolonga os tempos de remissão (CRONIN *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 2000). Já os benefícios da quimioterapia são controversos. Um estudo mostrou resultados semelhantes para gatos controle (tratamento cirúrgico apenas) e tratados com cirurgia e doxorrubicina (MARTANO *et al.*, 2005), porém outro estudo apresentou benefícios da quimioterapia neo e adjuvante (BRAY; POLTON, 2014). A quimioterapia é utilizada, principalmente, como tratamento paliativo em gatos com SAF irressecável ou sem condições cirúrgicas (HARTMANN *et al.*, 2015).

O uso de inibidores da tirosino-quinase (mesilato de masitinibe) nos SAF tiveram efeito anti-proliferativo (LAWRENCE *et al.*, 2012), porém a eficácia do masitinib deve ser melhor estudada pois outro inibidor de tirosino-quinase, o toceranib, não apresentou o mesmo efeito (HOLTERMANN; KIUPEL; HIRSCHBERGER, 2016). O toceranib é consolidado no tratamento de mastocitomas em cães (HAHN *et al.*, 2008) e o masitinib em tumores sólidos em humanos (SORIA *et al.*, 2009).

A imunoterapia parece ser promissora (JAHNKE *et al.*, 2007; HÜTTINGER *et al.*, 2008; JAS *et al.*, 2014). O uso de terapia genética neoadjuvante com um vetor não viral, expressando fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos felinos (GM-CSF) ou uma combinação dos genes felinos GM-CSF, interleucina (IL-2) e interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), foi bem tolerado por gatos e mostrou resultados promissores (JAHNKE *et al.*, 2007; HÜTTINGER *et al.*, 2008). A imunoterapia estimula células T anti-tumorais e é injetada no subcutâneo na cicatriz cirúrgica. A IL-2 felina recombinante está disponível na Europa para tratamento do SAF combinada com tratamento cirúrgico e radioterapia (JAS *et al.*, 2014).

## 2.5 Fatores Prognósticos e Prevenção

A aplicação das vacinas em locais anatômicos que acarretariam menores complicações cirúrgicas, caso o sarcoma de aplicação se desenvolvesse no local, foi recomendada nos Estados Unidos (VACCINE-ASSOCIATED FELINE SARCOMA

TASK FORCE, 2005). Isto mudou a localização dos SAF e as injeções passaram a ser dadas em locais onde a cirurgia, provavelmente, levaria a uma cura completa, ou seja, a região interescapular passou a ser evitada (HARTMANN *et al.*, 2015). Os SAF, antes de 1996, eram cinco vezes mais frequentes na região interescapular que em outro local. A localização desses tumores mudou para os membros torácicos e pélvicos com redução de 53,4% para 39,5% na região interescapular e aumento de 1,1% para 9,5% no membro pélvico direito (recomendado para vacinação antirrábica) e no membro pélvico esquerdo (recomendado para vacinação contra leucemia) (SHAW *et al.*, 2009). No Reino Unido, a região interescapular é, ainda, o sítio mais afetado (84%), seguido da femoral (6%), flanco (5%), regiões lombares (3%) e glúteas (2%) (KASS *et al.*, 2003). Na Polônia, sarcomas na região interescapular são, ainda, comuns (KLICZKOWSKA *et al.*, 2015) aumentando a importância do monitoramento pós-vacinação (HARTMANN *et al.*, 2015).

As orientações para prevenção dos SAF, além da administração de injeções em locais onde a cirurgia levaria a cura completa com menos complicações (como amputação de um membro) incluem; reduzir a reação inflamatória no local de aplicação, evitando a administração de substâncias irritantes e vacinar com a frequência necessária ou seja, de acordo com as Diretrizes atuais de vacinação (SCHERK *et al.*, 2013; HARTMANN *et al.*, 2015) As vacinas devem ser divididas em essenciais e não essenciais. As primeiras são recomendadas para todos os gatos e incluem panleucopenia felina, herpesvírus felino-1, calicivírus felino e antirrábica, em áreas endêmicas ou onde exigido por lei. Vacinas não essenciais incluem as FeLV, Chlamydia felis, Bordetella bronchiseptica, peritonite infecciosa felina (PIF) e anti-dermatófitas que só devem ser administradas após avaliação individual de risco/benefício considerando hábitos de vida, idade e ambiente em que os animais vivem (SCHERK *et al.*, 2013).

A *American Association of Feline Practitioners* (SCHERK *et al.*, 2013) recomenda a padronização dos locais anatômicos para a aplicação das vacinas. Vacinas contra panleucopenia felina (FPV), herpes vírus tipo 1 (FHV-1) e calicivírus felino (FCV) devem ser administradas na região distal do membro torácico direito; FeLV na região distal do membro pélvico esquerdo; e vacinas antirrábica distalmente no membro pélvico direito (SCHERK *et al.*, 2013). A vacinação na cauda foi bem tolerada, com os gatos desenvolvendo resposta imunológica comparável a aplicação em outros locais (HENDRICKS *et al.*, 2014).

O desenvolvimento dos sarcomas não variou com o tamanho da agulha, velocidade de injeção e aplicação de pressão manual após injeção. Por outro lado, temperaturas mais baixas das vacinas foram associadas a um maior risco de desenvolvimento de SAF. Por isto, as vacinas devem ser retiradas da geladeira 15 minutos antes da injeção para reduzir o risco de desenvolvimento dos sarcomas sem reduzir a eficácia vacinal (KASS *et al.*, 2003).

Vacinas inativadas com adjuvantes foram mais associadas ao desenvolvimento do sarcoma em um estudo de caso-controle (SRIVASTAV *et al.*, 2012). Por isto, aquelas sem adjuvantes ou recombinantes devem ser preferidas. Para o rastreio e diagnóstico precoce dos SAF é importante o registro correto nos prontuários médicos do paciente como locais das injeções, tipos de vacinas e medicamentos administrados, data da aplicação, acompanhamento pós-vacinação (HARTMANN *et al.*, 2015) e seguimento das recomendações internacionais dos locais preferenciais de aplicação (KLICZKOWSKA *et al.*, 2015).

### **3. OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de RE e RP em SAF e correlacioná-las com a taxa de crescimento do tumor (Ki67), grau histológico (somatório dos escores diferenciação, necrose e índice mitótico) e outras variáveis histopatológicas (infiltração nos tecidos, presença de células gigantes, infiltrado linfocitário, pleomorfismo) e aspectos clínicos (idade, sexo, localização e tamanho das lesões).

#### **3.1. Objetivos específicos**

- 3.1.1. Realizar uma análise descritiva das variáveis clínicas, histopatológicas e IHQ nos SAF;
- 3.1.2. Avaliar a expressão IHQ dos RE e RP nos SAF;
- 3.1.3. Categorizar a expressão IHQ dos RE e RP nos SAF;
- 3.1.4. Associar a expressão de RE e RP com outras variáveis histopatológicas além do grau histológico;
- 3.1.5. Categorizar o tamanho tumoral e realizar testes de associação com variáveis clínicas, histopatológicas e IHQ.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Tipo de Estudo e amostra

Este estudo foi retrospectivo com arquivos de blocos de parafina e lâminas histológicas do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa e de laboratórios veterinários privados que encaminharam material para análise e diagnóstico histopatológico, no período de 2009 a 2018. Os espécimes estudados foram coletados por biópsia cutânea (punch, incisional ou excisional).

Um sarcoma subcutâneo em felino é considerado de aplicação se tiver caráter histopatológico de tumor mesenquimal maligno e topografia em local onde as injeções são rotineiramente realizadas (KLICZKOWSKA *et al.*, 2015). Foram selecionados 56 casos de sarcomas, porém três casos foram excluídos do estudo pois estavam em topografia não compatível com aplicação de injeções (um na orelha e dois na pálpebra), totalizando 53 casos. Desta forma, foram selecionados os casos de sarcomas subcutâneos em felinos em locais compatíveis com aplicação de substâncias e com características histomorfológicas compatíveis com tais sarcomas (HENDRICK *et al.*, 1994).

Dados demográficos e clínicos, incluindo a idade no momento do diagnóstico, sexo, localização e tamanho do tumor foram obtidos dos formulários de requisição do exame dermatopatológico ou por contato telefônico ou e-mail com os médicos veterinários assistentes.

### 4.2 Histopatologia

Os espécimes, provenientes do arquivo, foram fixados em formalina, processados, incluídos em parafina e corados em hematoxilina e eosina. Estes foram reexaminados sob microscopia óptica de luz e reavaliados histologicamente em relação ao diagnóstico, grau histológico, infiltração nos tecidos adjacentes, infiltrado linfocitário, pleomorfismo e presença de células gigantes.

Os casos foram revisados por dois patologistas e, em caso de desacordo, reavaliados por um terceiro. O grau histológico dos SAF foi classificado de acordo com o sistema de classificação dos sarcomas de partes moles (TROJANI *et al.*, 1984) que leve em conta a somatória dos escores: grau de diferenciação, taxa mitótica e porcentagem de necrose (Tabela 1).

**Tabela 1.** Sistema de Graduação para Sarcomas de Partes Moles (TROJANI *et al.*, 1984)

---

 Escore de diferenciação

1. Sarcomas que lembram o tecido mesenquimal maduro normal
  2. Sarcomas com o tipo histológico determinado, mas de forma menos evidente
  3. Sarcomas indiferenciados
- 

Escore de índice mitótico (nº de figuras de mitose/10 campos de grande aumento - 400x)

1. 0-9
  2. 10-19
  3. >19
- 

Escore de necrose tumoral

0. Ausente
  1. ≤ 50% de necrose
  2. > 50% de necrose
- 

Grau histológico e escore total (somatório dos escores da diferenciação, índice mitótico e necrose tumoral)

- I ≤ 3
  - II 4 ou 5
  - III ≥ 6
- 

### 4.3 Imuno-histoquímica

A técnica de IHQ envolve a aplicação de substâncias químicas resultando em reações diretas antígeno-anticorpo que resultam na marcação da proteína pesquisada com um cromógeno de um tecido.

Os blocos de parafina foram cortados com três micra de espessura e distendidos sobre lâminas silanizadas carregadas eletricamente (Starfrost®). A técnica e os anticorpos utilizados seguiram o protocolo definido pelo Laboratório de Patologia Comparada da Universidade Federal de Minas (UFMG) (Tabela 2).

A origem mesenquimal dos tumores fusocelulares de partes moles foi confirmado com anticorpos anti-vimentina. O índice de proliferação celular (Ki67) foi utilizado para avaliar a fração de crescimento dos tumores (CARNEIRO *et al.*, 2019).

**Tabela 2.** Anticorpos primários (Primário), marca, clone, diluição (Dil.), método de recuperação antigênica (Recuperação), tempo de incubação ( $\Delta T$ ), anticorpo secundário (Secundário) e cromógeno (Crom.) utilizados nas reações imunohistoquímicas para imunomarcção dos SAF:

Primário	Marca	Clone	Dil.	Recuperação	$\Delta T$	Secundário	Crom.
ER- Estrogen Receptor (NCL-ER-6F11)	Novocastra	6F11	1:20	Citrato pH6 + Pascal	18h	Novolink	DAB
Progesterone (NCL-L-PGR)	Novocastra	1A6	1:50	Citrato pH6 + Pascal	18h	Novolink	DAB
Monoclonal Mouse anti-Human Ki67 Antigen	Dako, Glostrup, Denmark	MIB-1	1:50	Citrato pH6 + Pascal	18h	Novolink	DAB
Monoclonal Mouse Vimentin Antibody	Novus Bio	SPM 576	1:50 0	Citrato pH6 + Pascal	18h	Novolink	DAB

As lâminas foram colocadas em estufa por 30 minutos a 70°C, para a realização da técnica de IHQ e, após, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, hidratadas em álcool etílico em diluições decrescentes e submetidos a dez lavagens com água destilada. A recuperação antigênica foi feita em calor úmido pressurizado a 125°C (*Pascal® Pressure Cooker*; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) com *Target Retrieval Solution Citrate* - pH 6,0 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). As lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos e lavadas em PBS (tampão fosfato-salino ou phosphatebuffered saline) três vezes por 5 minutos. O tampão de lavagem PBS é uma solução salina utilizada entre os passos da reação de IHQ para ajudar a manter o pH constante entre 7,4 – 7,6 (pH próximo ao do corpo humano) durante a reação, facilitando a ligação antígeno-anticorpo.

O bloqueio da peroxidase endógena com o KIT NovoLink "Bloqueio da Peroxidase" foi realizado por duas vezes de cinco minutos para se evitar a interferência de enzimas endógenas e a ligação inespecífica dos anticorpos (marcadores) com proteínas do tecido. Após lavagem com PBS, foi colocado o "Bloqueio de proteína" do KIT NovoLink por quinze minutos e adicionado o anticorpo primário e as lâminas foram mantidas na geladeira a 4°C durante 18 horas (*overnight*). Após incubação *overnight*, três lavagens com tampão PBS, durante cinco minutos cada, foram realizadas e então, utilizado o sistema de polímero com

anticorpo secundário ligado a peroxidase (*Novolink Polymer Detection Sistem*; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK) de acordo com as recomendações do fabricante. As preparações histológicas foram lavadas com tampão PBS e o complexo revelado com cromógeno 3'3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+Substrate Chromogen system*; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA), contra-coradas com hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente por cinco minutos. Após este processamento, as amostras foram desidratadas em álcool etílico em diluições crescentes, diafanizadas em xilol e as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Meyer e montadas com resina e lamínula (Figura 2).

Diluentes foram utilizados no lugar do anticorpo primário para os controles negativos (*Dako EnVision FLEX Antibody Diluent*) em amostra de sarcoma proveniente do estudo. O controle positivo foi mama felina para receptores de progesterona e estrógeno e pele peritumoral para os demais anticorpos (Ki67 e vimentina). Os materiais utilizados no controle positivo (mama e pele peritumoral) foram obtidos de blocos de parafina de arquivo histopatológico.

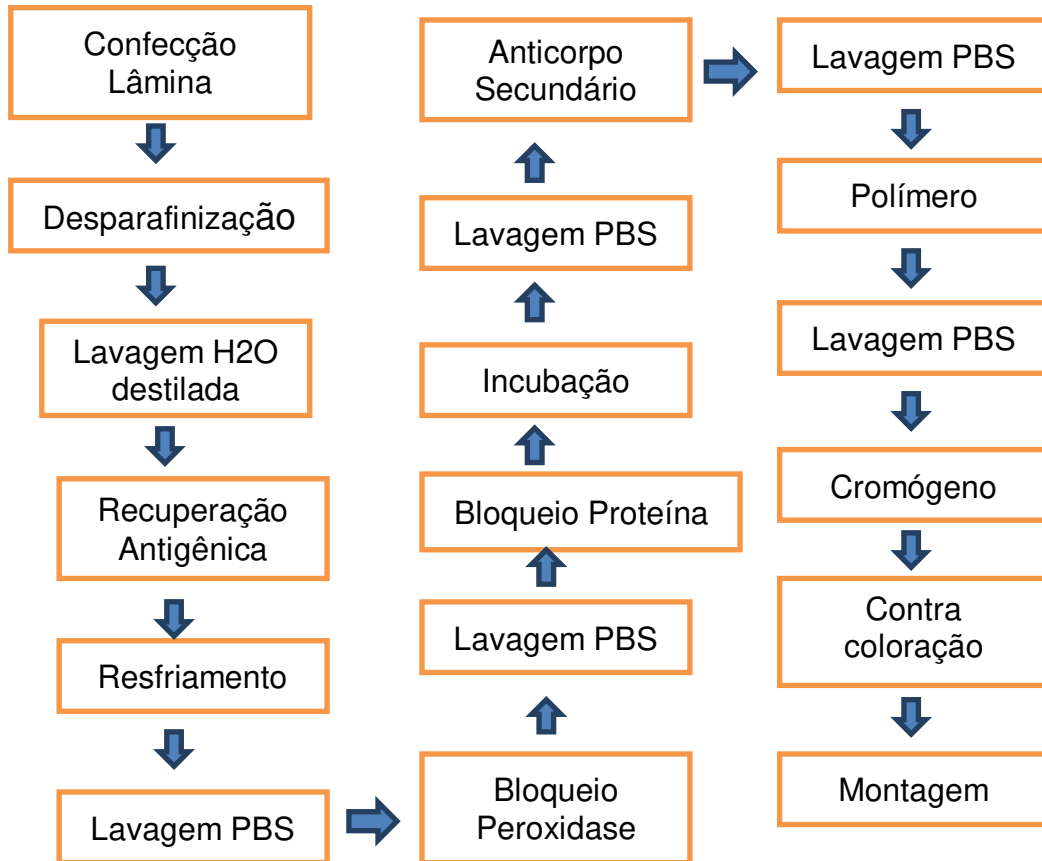
O tecido adjacente peritumoral foi analisado quanto à expressão de RE e RP para se avaliar o comportamento da expressão hormonal do tecido normal e neoplásico.

A interpretação IHQ foi realizada sob microscopia óptica de luz com as neoplasias examinadas em menor aumento para identificar as áreas de maior intensidade de coloração. Áreas com intensa inflamação ou necrose foram evitadas, pois células inflamatórias podem ser positivas para Ki67.

A análise da expressão do Ki67 foi realizada por dois observadores e calculada a porcentagem de núcleos positivos em 500 células neoplásicas contadas manualmente, em cinco campos de grande aumento (40x), em áreas de imagem de melhor marcação (*hot spots/zonas quentes*).

A imunorreatividade para RE e RP foi avaliada seguindo o consenso da Sociedade Americana de Oncologia e Colégio Americano de Patologia que, considera positivo, casos com pelo menos 1% das células coradas por tais marcadores (HAMMOND *et al.*, 2010) e foi estratificada de acordo com a porcentagem de núcleos imunorreativos após análise de dois observadores: 0, negativo; 1+ (1 a 25%); 2+ (26 a 50%); e 3+ (51 a 75%); 4+ (76 a 100%) (KELLEY *et al.*, 2004).

O diagnóstico de tumores mesenquimais foi confirmado com anticorpos anti-vimentina (CARNEIRO *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Fluxograma da imuno-histoquímica do Laboratório de Patologia Comparada da UFMG.

#### 4.4. Análises Estatísticas

Os dados das características clínicas (sexo, idade, localização e tamanho dos tumores), histopatológicas (diferenciação, número de mitoses, necrose, grau, infiltrado linfocitário, infiltração nos tecidos, presença de células gigantes e pleomorfismo) e imuno-histoquímicas (marcação para receptores de estrógeno, progesterona e Ki67) foram submetidos à análise descritiva para se conhecer a natureza e orientar a abordagem das análises. Os escores, para expressão de receptores de estrógeno e progesterona e tamanho tumoral, foram relacionados à fração de crescimento (Ki67), características histopatológicas dos tumores e aos parâmetros clínicos supracitados.

Os dados foram tabulados no software Microsoft Excel 2016 e processados em software *IBM SPSS Statistics 20* com nível de significância de 5%. O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado em todas as variáveis quantitativas para verificar o padrão de normalidade de seus dados. Os dados das variáveis paramétricas foram submetidos ao teste T para amostras independentes. As variáveis não paramétricas foram analisadas com o teste de *Mann-Whitney*. As variáveis categóricas foram analisadas com o teste de *Qui-Quadrado de Pearson e Teste Exato de Fisher*. As correlações foram avaliadas com o teste de *Spearman*.

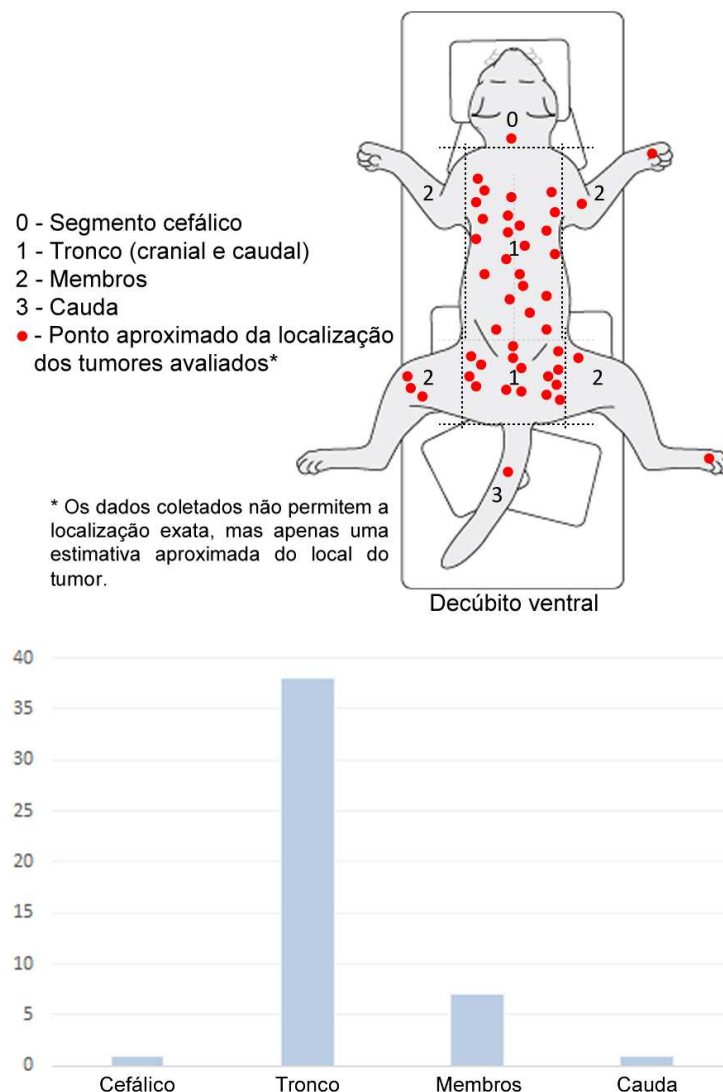
#### **4.5. Aspectos éticos**

Nesse estudo não foram utilizados animais vivos e sim material biológico (blocos de parafina) de arquivos de laboratórios de patologia. A metodologia empregada foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (nº 41/2018).

## 5. RESULTADOS

Dos 53 casos de sarcomas subcutâneos em gatos, 29 (55%) eram fêmeas e 24 (45%) machos, com relação macho/fêmea de 1:1,2. A idade média dos gatos foi de 10,7 anos  $\pm$  4,2 e a mediana do tamanho dos tumores (n= 33) foi de 3cm (1,9-5,3).

A localização dos tumores foi referida em 47 casos, sendo mais da metade, 38 (81%) no tronco, sete (15%) nos membros, um (2%) na cauda, e um (2%) na região cervical (Figura 3).



**Figura 3.** Distribuição e localização anatômica dos sarcomas de aplicação em felinos (n= 47).

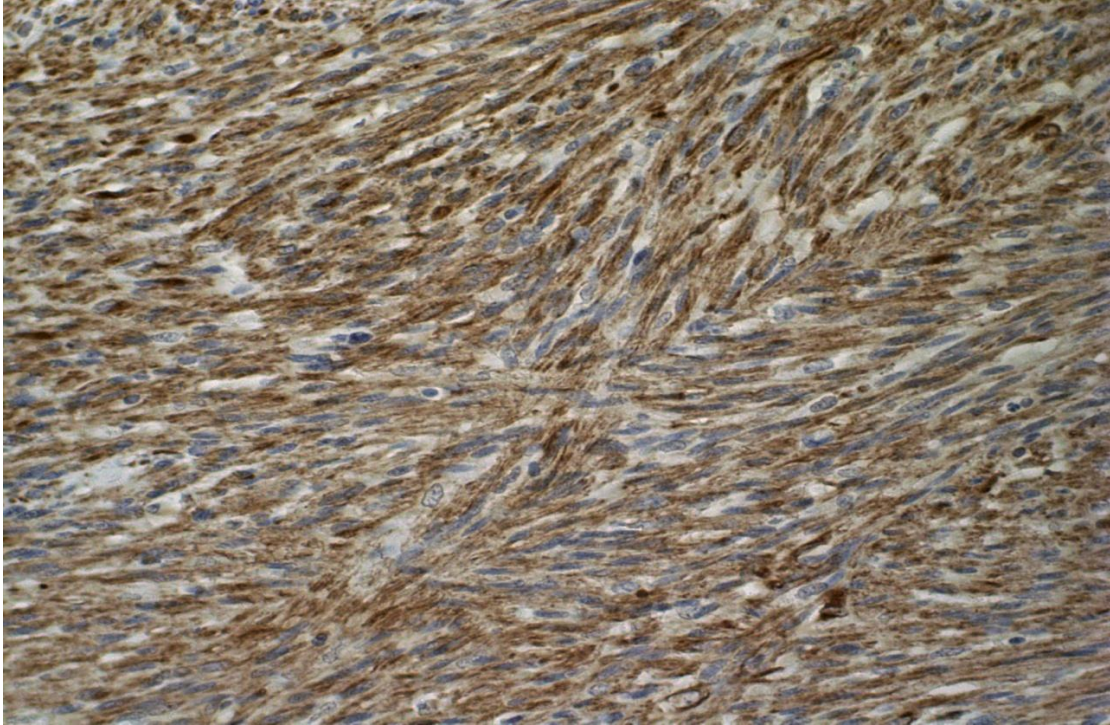
A maioria dos casos foi histologicamente compatível com fibrossarcoma 32 (60%), seguido do fibromixossacoma 12 (22%). Dois casos foram sarcomas

indiferenciados e sete (13%) demais apresentaram duas variantes histológicas (leiomiossarcomas, sarcoma anaplásico de células gigantes e lipossarcoma). O escore da maioria dos SAF foi 2 para a diferenciação (77,3%), 3 para índice mitótico (50,9%) e 1 para porcentagem de necrose (54,7%). A maioria dos casos, baseado na somatória desses escores, foi histologicamente classificada como grau III (56,6%). Outros parâmetros como infiltração nos tecidos, presença de células gigantes, infiltrado linfocitário e pleomorfismo foram avaliados (Tabela 3).

**Tabela 3** – Características histopatológicas dos Sarcomas de Aplicação em Felinos (n=53)

Variável	N	%
<b>Diferenciação (n=53)</b>		
Sarcoma que lembra tecido normal	9	17%
Sarcoma com tipo histológico indeterminado e diferenciação menos evidente	41	77%
Sarcoma indiferenciado	3	6%
<b>Necrose (n=53)</b>		
Ausente	4	7%
≤ 50% de necrose	29	55%
> 50% de necrose	20	38%
<b>Índice mitótico (n=53)</b>		
0-9	9	17%
10-19	17	32%
> 19	27	51%
<b>Grau histológico (n=53)</b>		
I	3	6%
II	20	38%
III	30	57%
<b>Infiltração nos tecidos (n=51)</b>		
Derme	1	2%
Hipoderme	33	65%
Derme + Hipoderme	17	33%
<b>Células gigantes (intensidade) (n=53)</b>		
Ausente	33	62%
Leve	9	17%
Moderado	6	11%
Alta	5	9%
<b>Infiltrado linfocitário (n=53)</b>		
Ausente (0/3+)	4	8%
Leve (+/3+)	17	32%
Moderado (++/3+)	17	32%
Alta (+++/3+)	15	28%
<b>Pleomorfismo (n=53)</b>		
Leve	8	15%
Moderado	25	47%
Alto	20	38%

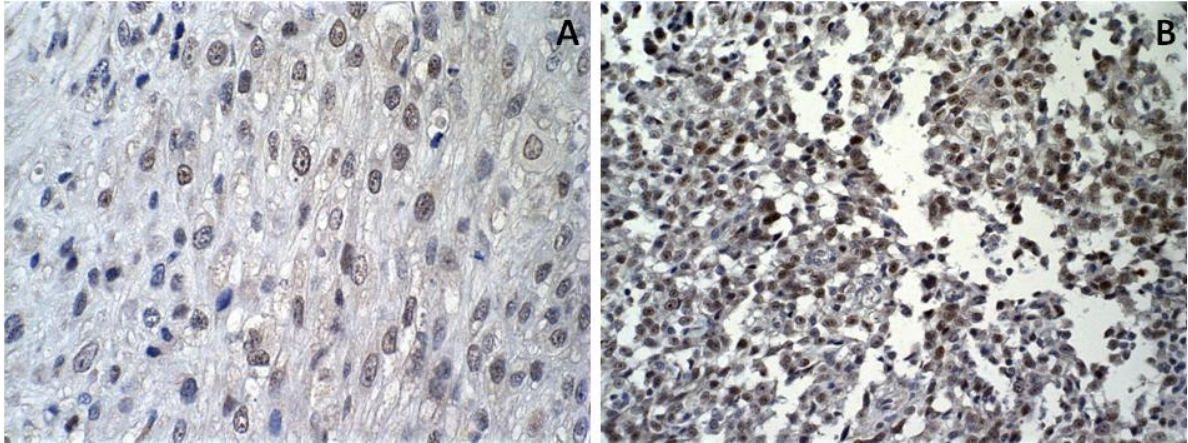
Todos os casos, na imuno-histoquímica, foram positivos para o anticorpo anti-vimentina, confirmando a origem mesenquimal desses tumores (Figura 4).



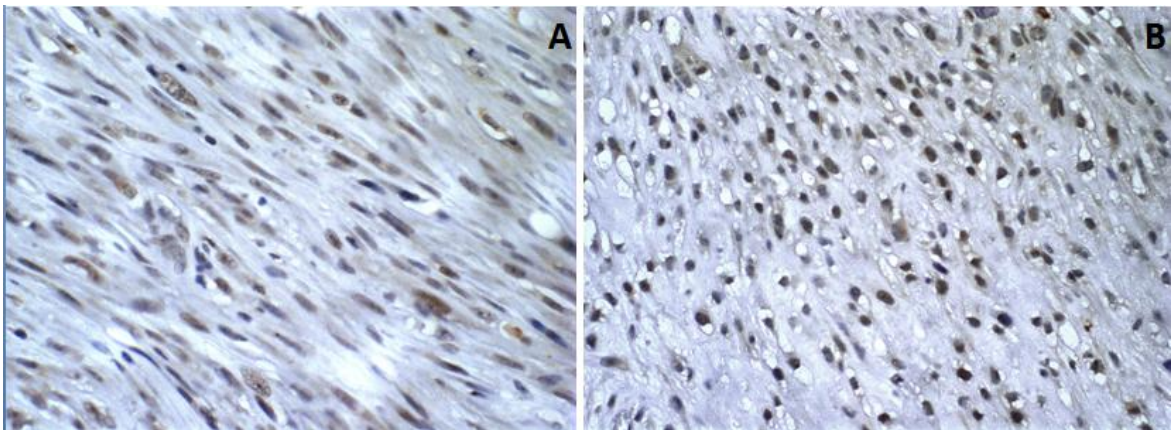
**Figura 4.** Imunomarcacão para Vimentina em Sarcoma de Aplicacão em Felino (20x).

A expressão de RE (Figura 5) foi ausente em 19 (36%) dos casos, 1+ em 28 (53%), 2+ em 3 (6%), 3+ em 3 (6%) e nenhum apresentou reatividade para 4+. Em relacão aos RP (Figura 6), foram negativos em 33 (62%) casos, 1+ em 12 (23%), 2+ em 8 (14%) e nenhum teve imunomarcacão de 3 ou 4+. O índice de proliferaçao celular (ki67) apresentou mediana de 0,12 (0,07 – 0,23). Na Figura 7 pode-se observar imunomarcacão para Ki67 (Figura 7) e no apêndice A uma descriçao da expressao IHQ nos SAF.

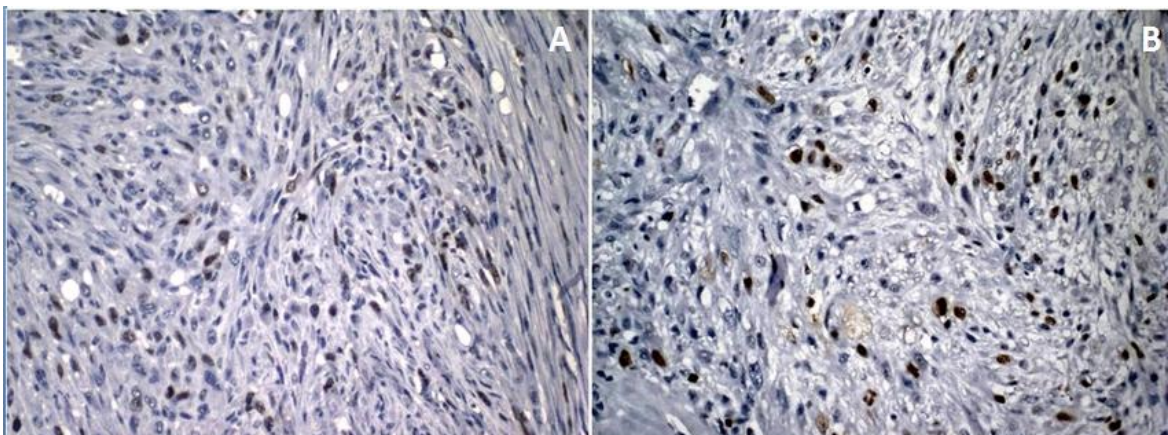
O tecido peritumoral não apresentou reatividade para RE e RP.



**Figura 5.** Imunomarcção para estrógeno em Sarcoma de Aplicação em Felino. Imunorreatividade de 3+. Aumento de 60x (A) e 40x (B).



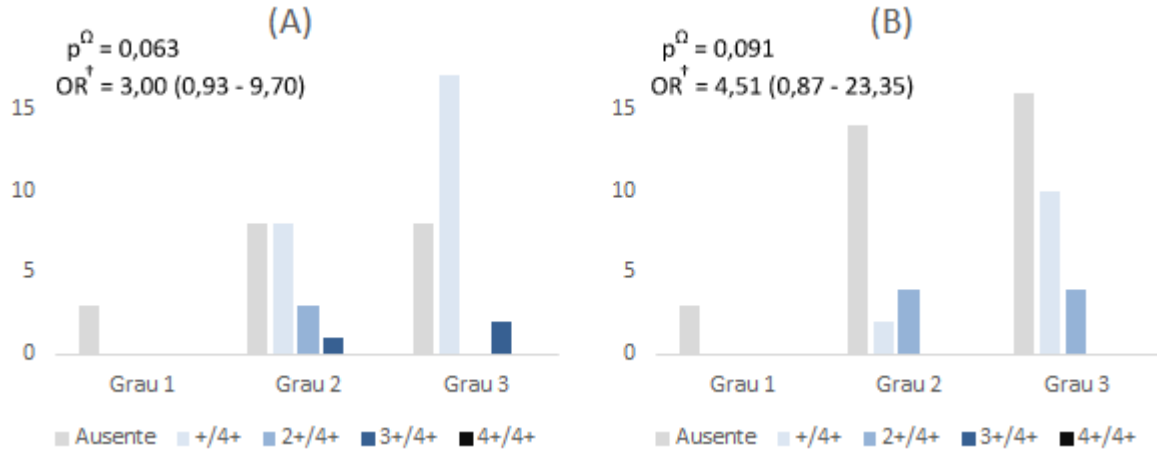
**Figura 6.** Imunomarcção para progesterona em Sarcoma de Aplicação em Felino. Imunorreatividade de 2+. Aumento de 60x (A) e 40x (B).



**Figura 7.** Imunomarcção para Ki67 em Sarcoma de Aplicação em Felino. Índice de proliferação celular de 44,6% (A) e 14,4% (B). Aumento de 40x.

A expressão dos RE e RP foram estratificadas, de acordo com a porcentagem de núcleos imunorreativos e, associada ao grau histológico. Sarcomas grau 1 não

foram positivos para RE ou RP. A expressão de RE e RP não diferiram entre os graus (Figura 8).



**Figura 8.** Estratificação da intensidade de expressão de receptores de estrogênio (A) e progesterona (B) em ausente, +/4+, 2+/4+, 3+/4+, 4+/4+, em função do grau histológico dos sarcomas de aplicação em felinos com testes de associação considerando os graus 2 e 3. (n=53)  $\Omega$ Teste Exato de Fisher;  $\dagger$ OR= Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%.

Foi realizado teste de associação entre ausência ou presença de expressão de RE e RP e as variáveis clínicas, histopatológicas e IHQ. A expressão de RE se associou significativamente com a atividade mitótica. A expressão de RE nos tumores com escore 1, para atividade mitótica, foi menor que naqueles com escore 3 ( $P=0,046$ ), ou seja, a probabilidade de tumores com escore 3 de índice mitótico expressar RE é 5,7 vezes maior que aqueles com escore 1. A intensidade de pleomorfismo se associou com RE ( $P=0,019$ ) (Tabela 4). Não houve associação significativa entre RP e as variáveis clínicas, histopatológicas e demais IHQ estudadas (Tabela 5). Os casos que apresentaram expressão positiva para RE, 18 (53%) e 16 (47%) foram negativos e positivos para RP respectivamente. Por outro lado, os casos negativos para RE, 15 (79%) foram negativos para RP e 4(21%) foram positivos para esse receptor.

O tamanho tumoral foi estratificado, considerando, 3cm como ponto de corte (mediana do tamanho tumoral do estudo). O tamanho tumoral se correlacionou (n=33,  $P=0,008$ ,  $r=0,455$ ) e se associou, significativamente, com a presença de células gigantes ( $P=0,049$ ) (Tabela 6).

Tabela 4 – Características clínicas, histológicas e imuno-histoquímicas associadas à ausência ou presença de receptores de estrogênio em Sarcomas de Aplicação em Felinos (n= 53)

	Receptores de estrogênio (RE)		OR <sup>†</sup> (IC <sup>‡</sup> 95%)	p
	Ausência (n=19)	Presença (n=34)		
<b>Dados clínicos</b>				
<b>Sexo</b>				
Macho	8 (42%)	16 (47%)	1	0,780 <sup>Ω</sup>
Fêmea	11 (58%)	18 (53%)	0,82 (0,26 – 2,54)	
<b>Histologia</b>				
<b>Diferenciação</b>				
Diferenciado	6 (32%)	3 (9%)	1	0,067 <sup>ΩΩ</sup> 0,182 <sup>ΩΩ</sup>
Mal diferenciado	13 (68%)	28 (82%)	4,31 (0,93 – 19,98)	
Indiferenciado	0 (0%)	3 (9%)		
<b>Grau histológico</b>				
I (≤3)	3 (16%)	0 (0%)	1	0,093 <sup>ΩΩ</sup>
II (4-5)	8 (42%)	12 (35%)	1	0,322 <sup>Ω</sup>
III (≥6)	8 (42%)	22 (65%)	1,83 (0,55 – 6,13)	
<b>Número de mitoses</b>	15 (6 – 25)	21 (13 – 25)		0,190 <sup>μ</sup>
<b>Índice mitótico*</b>				
0-9	6 (32%)	3 (9%)	1	0,218 <sup>ΩΩ</sup> <b>0,046<sup>ΩΩ*</sup></b>
10-19	6 (32%)	11 (32%)	3,67 (0,67 – 20,19)	
>19	7 (37%)	20 (59%)	5,71 (1,12 – 29,21)	
<b>Necrose</b>				
Ausente	1 (5%)	3 (9%)	1	1,000 <sup>ΩΩ</sup> 1,000 <sup>ΩΩ</sup>
<50%	11 (58%)	18 (53%)	0,55 (0,50 – 5,92)	
>50%	7 (37%)	13 (38%)	0,62 (0,54 – 7,12)	
<b>Células gigantes</b>				
Ausente	12 (63%)	21 (62%)	1	0,920 <sup>Ω</sup>
Presente	7 (37%)	13 (38%)	1,06 (0,33 – 3,38)	
<b>Infiltrado Linfocitário</b>				
Ausente	1 (5%)	3 (9%)	1	1,000 <sup>ΩΩ</sup>
Presente	18 (95%)	31 (91%)	0,57 (0,06 – 5,94)	
<b>Pleomorfismo*</b>				
Leve	6 (32%)	2 (6%)	1	<b>0,019<sup>ΩΩ*</sup></b>
Moderado/Alto	13 (68%)	32 (94%)	7,39 (1,32–41,46)	
<b>Imuno-histoquímica</b>				
<b>RP</b>				
Ausente	15 (79%)	18 (53%)	1	0,061 <sup>Ω</sup>
Presente	4 (21%)	16 (47%)	3,33 (0,92 – 12,13)	
<b>Ki67<sup>‡</sup></b>	0,1 (0,06 – 0,17)	0,14 (0,08 – 0,26)		0,207 <sup>μ</sup>

<sup>Ω</sup>Qui quadrado; <sup>ΩΩ</sup>Fisher; <sup>μ</sup>Mann-Whitney; <sup>†</sup>Odds Ratio; <sup>‡</sup>Intervalo de Confiança; RE = receptor de estrogênio; RP = receptor de progesterona; <sup>‡</sup>mediana (primeiro quartil – terceiro quartil). \*diferença significativa entre ausência e presença de RE (p<0,05).

Tabela 5 – Características clínicas, histológicas e imuno-histoquímicas associadas à ausência ou presença de receptores de progesterona em Sarcomas de Aplicação em Felinos (n=53).

	Receptores de progesterona (RP)		OR <sup>†</sup> (IC <sup>‡</sup> 95%)	p
	Ausência (n=33)	Presença (n=20)		
<b>Dados clínicos</b>				
<b>Sexo</b>				
Macho	16 (48%)	8 (40%)	1	0,547 <sup>Ω</sup>
Fêmea	17 (52%)	12 (60%)	1,41 (0,46 – 4,35)	
<b>Histologia</b>				
<b>Diferenciação</b>				
Diferenciado	7 (21%)	2 (10%)	1	0,452 <sup>ΩΩ</sup>
Mal diferenciado	24 (73%)	17 (85%)	2,48 (0,46–13,43)	
Indiferenciado	2 (6%)	1 (5%)	1,75 (0,10–30,84)	
<b>Grau histológico</b>				
I (≤3)	3 (9%)	0 (0%)	-	0,539 <sup>ΩΩ</sup>
II (4-5)	14 (42%)	6 (30%)	1	0,239 <sup>Ω</sup>
III (≥6)	16 (48%)	14 (70%)	2,04 (0,61 – 6,75)	
<b>Número de mitoses<sup>‡</sup></b>	17 (10 – 25)	21 (14 – 26)		0,243 <sup>μ</sup>
<b>Índice mitótico</b>				
0-9	7 (21%)	2 (10%)	1	0,667 <sup>ΩΩ</sup>
10-19	11 (33%)	6 (30%)	1,91 (0,29–12,26)	
>19	15 (45%)	12 (60%)	2,80 (0,49–16,04)	
<b>Necrose</b>				
Ausente	3 (9%)	1 (5%)	1	1,000 <sup>ΩΩ</sup>
<50%	17 (52%)	12 (60%)	2,12 (0,20–22,90)	
>50%	13 (39%)	7 (35%)	1,62 (0,14–18,58)	
<b>Células gigantes</b>				
Ausente	19 (58%)	14 (70%)	1	0,366 <sup>Ω</sup>
Presente	14 (42%)	6 (30%)	0,58 (0,18 – 1,89)	
<b>Infiltrado</b>				
<b>Linfocitário</b>				
Ausente	2 (6%)	2 (10%)	1	0,627 <sup>ΩΩ</sup>
Presente	31 (94%)	18 (90%)	0,58 (0,08 – 4,48)	
<b>Pleomorfismo</b>				
Leve	7 (21%)	1 (5%)	1	0,234 <sup>ΩΩ</sup>
Moderado/Alto	26 (79%)	19 (95%)	5,12 (0,58–45,13)	
<b>Imuno-histoquímica</b>				
<b>RE</b>				
Ausente	15 (45%)	4 (20%)	1	0,061 <sup>Ω</sup>
Presente	18 (55%)	16 (80%)	3,33 (0,91–12,13)	
<b>Ki67<sup>‡</sup></b>	0,11 (0,06- 0,22)	0,13 (0,09 - 0,27)		0,247 <sup>μ</sup>

<sup>Ω</sup>Qui quadrado; <sup>ΩΩ</sup>Fisher; <sup>μ</sup>Mann-Whitney; <sup>†</sup>Odds Ratio; <sup>‡</sup>Intervalo de Confiança; RE = receptor de estrogênio; RP = receptor de progesterona; <sup>‡</sup>mediana (primeiro quartil – terceiro quartil) (p<0,05).

Tabela 6 – Características clínicas, histológicas e imuno-histoquímicas em função do tamanho clínico do tumor. (n=33)

	Tamanho		OR <sup>†</sup> (IC <sup>‡</sup> 95%)	p
	≤ 3cm (n=19)	> 3cm (n=14)		
<b>Dados clínicos</b>				
<b>Sexo</b>				
Macho	10 (53%)	4 (29%)	1	0,167 <sup>Ω</sup>
Fêmea	9 (47%)	10 (71%)	2,78 (0,64 – 12,06)	
<b>Histologia</b>				
<b>Diferenciação</b>				
Diferenciado	3 (16%)	2 (14%)	1	1,000 <sup>ΩΩ</sup> 0,429 <sup>ΩΩ</sup>
Mal diferenciado	16 (84%)	10 (71%)	0,94 (0,13 – 6,64)	
Indiferenciado	0 (0%)	2 (14%)	-	
<b>Grau histológico</b>				
I (≤3)	1 (5%)	0 (0%)	-	1,000 <sup>ΩΩ</sup>
II (4-5)	7 (37%)	5 (36%)	1	0,854 <sup>Ω</sup>
III (≥6)	11 (58%)	9 (64%)	1,15 (0,27 – 4,87)	
<b>Número de mitoses<sup>‡</sup></b>	17 (11 – 23)	23 (18 – 25)		0,768 <sup>μ</sup>
<b>Índice mitótico</b>				
0-9	2 (11%)	1 (7%)	1	1,000 <sup>ΩΩ</sup> 1,000 <sup>ΩΩ</sup>
10-19	8 (42%)	3 (21%)	0,78 (0,05 – 11,64)	
>19	9 (47%)	10 (71%)	2,22 (0,17 – 28,86)	
<b>Necrose</b>				
Ausente	3 (16%)	0 (0%)		0,257 <sup>ΩΩ</sup>
<50%	10 (53%)	8 (57%)	1	0,765 <sup>Ω</sup>
>50%	6 (32%)	6 (43%)	1,25 (0,29 – 5,41)	
<b>Células gigantes*</b>				
Ausente	12 (63%)	4 (29%)	1	<b>0,049<sup>Ω*</sup></b>
Presente	7 (37%)	10 (71%)	4,29 (0,97 – 18,97)	
<b>Infiltrado Linfocitário</b>				
Ausente	1 (5%)	1 (7%)	1	1,000 <sup>ΩΩ</sup>
Presente	18 (95%)	13 (93%)	0,72 (0,04 – 12,64)	
<b>Pleomorfismo</b>				
Leve	1 (5%)	1 (7%)	1	1,000 <sup>ΩΩ</sup>
Moderado/Alto	18 (95%)	13 (93%)	0,72 (0,04 – 12,64)	
<b>Imuno-histoquímica</b>				
<b>RE</b>				
Ausente	4 (21%)	6 (43%)	1	0,257 <sup>ΩΩ</sup>
Presente	15 (79%)	8 (57%)	0,36 (0,08 – 1,64)	
<b>RP</b>				
Ausente	12 (63%)	9 (64%)	1	1,000 <sup>ΩΩ</sup>
Presente	7 (37%)	5 (36%)	0,95 (0,23 – 4,01)	
<b>Ki67<sup>‡</sup></b>	0,140 (0,070–0,250)	0,160 (0,098 – 0,320)		0,557 <sup>μ</sup>

<sup>Ω</sup>Qui quadrado; <sup>ΩΩ</sup>Fisher; <sup>μ</sup>Mann-Whitney; <sup>†</sup>Odds Ratio; <sup>‡</sup>Intervalo de Confiança; RE = receptor de estrogênio; RP = receptor de progesterona; <sup>‡</sup>mediana (primeiro quartil – terceiro quartil). \*diferença significativa com tamanho clínico do tumor (p<0,05).

A expressão de RE se correlacionou, positivamente, com as variáveis diferenciação ( $n= 53$ ,  $P=0,009$ ,  $r=0,357$ ); presença de pleomorfismo ( $n=53$ ,  $P=0,019$ ,  $r=0,322$ ); e expressão de RP ( $n=53$ ,  $P=0,034$ ,  $r=0,292$ ). O antígeno Ki67 se correlacionou, positivamente, com o número de mitoses ( $n=53$ ,  $P=0,009$ ,  $r=0,354$ ) e presença de pleomorfismo ( $n=53$ ,  $P=0,004$ ,  $r=0,388$ ). A correlação entre as demais variáveis não foi significativa.

## 6. DISCUSSÃO

Este é primeiro estudo avaliando a expressão de RE e RP em sarcomas de aplicação em felinos, comprovando a capacidade de expressão dos receptores hormonais nesses tumores.

A prevalência de SAF, semelhante por sexo, concorda com o relatado para esses tumores em estudos com maior número de casos (DODDY *et al.*, 1996; MARTANO *et al.*, 2005). Porém, a idade média dos gatos, no momento do diagnóstico do sarcoma, foi maior que a relatada em outros estudos que mostram um acometimento de gatos mais jovens (DODDY *et al.*, 1996; CARNEIRO *et al.*, 2019), mas semelhante a estudo Brasileiro com média de 10 anos (CECCO *et al.*, 2019). A mediana do tamanho dos tumores de 3cm, aponta um diagnóstico mais precoce, já que foi menor que o mostrado em uma revisão onde mais de 35% dos casos teve diâmetro maior que cinco centímetros no diagnóstico e, apenas, 25% foram menores que dois centímetros (KLICZKOWSKA *et al.*, 2015). Em razão do rápido crescimento dos SAF, um *guideline* europeu propôs a realização de biopsia de qualquer massa que persistir após três meses da vacinação, tiver mais de dois centímetros ou com crescimento progressivo após um mês da vacinação (HARTMANN *et al.*, 2015), favorecendo o diagnóstico mais precoce dos SAF como no nosso estudo.

Os SAF se desenvolvem mais frequentemente no subcutâneo, podendo estender-se para a musculatura, enquanto que, os não relacionados à aplicação ocorrem, com maior frequência na derme (SÉGUIN, 2002). A maioria dos casos 33 (65%) estavam localizados nos subcutâneo e apenas um caso restrito a derme.

A localização de mais da metade dos casos de SAF no tronco, discorda do proposto no consenso Vaccine Associated Feline Sarcoma Task Force (VAFSTF), publicado em 1996 e atualizado em 2005, em resposta ao aumento da incidência de sarcomas em felinos. O intuito foi padronizar a aplicação das vacinas e medicamentos nos membros pélvicos e torácicos para reduzir as complicações cirúrgicas e aumentar as chances de ressecção completa caso um SAF se desenvolvesse (VACCINE-ASSOCIATED FELINE SARCOMA TASK FORCE, 2005). Após este consenso, houve uma redução da incidência desses tumores na região interescapular (SHAW *et al.*, 2009). Porém no nosso estudo, o surgimento mais comum dos SAF no tronco, principalmente na região interescapular, mostra ainda

ser o sítio mais comum de aplicação de vacinas e medicamentos. Isso gera uma maior dificuldade terapêutica em caso de surgimento dos mesmos no local, aumentando a importância do monitoramento pós-vacinação para diagnóstico precoce dos casos. Apenas um caso de SAF estava localizado na cauda, um sítio pouco comum de aplicação de vacinas e medicamentos, mas com potencial para se tornar um local anatômico de referência para aplicação dos mesmos. A vacinação neste local é bem tolerada, com resposta imunológica comparável a aplicação em outros locais do corpo de gatos e a amputação da cauda é o tratamento de escolha caso um sarcoma se desenvolva nesse local, com menor morbidade e maiores chances de cura. Outro ponto que reforça a escolha da cauda e membros como locais anatômicos de referência para aplicação de vacinas é o fato de permitir um diagnóstico mais precoce, pelo abaulamento da região, se comparado ao tronco, caso um sarcoma se desenvolva (HENDRICKS *et al.*, 2014).

A classificação histológica grau III (56,6%) (TROJANI *et al.*, 1984), na maioria dos casos, reafirma o comportamento mais agressivo dos SAF comparado àqueles não relacionados à aplicação (DODDY *et al.*, 1996; MADEWELL *et al.*, 2001). A presença de infiltrado linfocitário predominou em nossos casos, se comparada ao infiltrado macrófágico e de células gigantes. Não foi visualizado material acinzentado intracitoplasmático nos macrófagos reforçando a raridade da presença desse achado (COUTO *et al.*, 2002; HENDRICK, 2017; KLICZKOWSKA *et al.*, 2015). Apenas quatro casos em um total de 89 mostraram material da vacina fagocitado nos macrófagos (CECCO *et al.*, 2019). A presença de material fagocitado dentro dos macrófagos passou a não ser obrigatório para o diagnóstico (KLICZKOWSKA *et al.*, 2015), aumentando a prevalência desse tumor (SABA, 2017). Ou seja, passou-se a considerar a presença de apenas dois critérios para o diagnóstico de SAF: caráter histopatológico de tumor mesenquimal maligno e topografia em local onde as injeções são rotineiramente realizadas.

A positividade para RE em mais da metade dos casos (64%) e de 38% para RP indica possível participação desses hormônios no desenvolvimento desses sarcomas, como relatado em estudos em felinos para a expressão desses receptores em adenocarcinomas mamários (AKKOC; INAN; SONMEZ, 2012; CAMPOS *et al.*, 2015), adenocarcinomas uterinos (SARAIVA *et al.*, 2015) e hiperplasia fibroepitelial mamária (MARTÍN DE LAS MULAS *et al.*, 2000). A expressão desses receptores, nos adenocarcinomas e seu impacto prognóstico, é

consolidado na medicina humana, inclusive com uso de moduladores seletivos de receptores hormonais e inibidores da aromatase (FISHER *et al.*, 1981; 1983; SHAGUFTA; AHMAD, 2018). A expressão de receptores hormonais em sarcomas uterinos, em humanos, aumentou a sobrevida nos casos RE positivo e naqueles tratados com inibidores de aromatase (IOFFE *et al.*, 2009; THANOPOULOU *et al.*, 2014). Sarcomas uterinos apresentaram uma maior positividade de RE e RP se comparado a sarcomas extrauterinos (KELLEY *et al.*, 2004). No entanto, os resultados em relação ao prognóstico, em casos de sarcomas extrauterinos (VALKOV *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013) e cutâneos, são controversos (KREICHER *et al.*, 2016; MENG *et al.*, 2018).

Ao graduar o grau de expressão dos RE e RP com grau histológico não houve associação significativa. A Sociedade Americana de Oncologia Clínica/Colégio Americano de Patologistas determina o valor de corte no câncer de mama de 1% de positividade para RE e RP (HAMMOND *et al.*, 2010), mas isso pode variar para sarcomas devido a diferenças na linhagem celular e biologia molecular dos mesmos. Não há um critério padronizado para a positividade de RE e RP para os sarcomas, podendo gerar divergência nos resultados dos estudos.

A associação significativa da expressão de RE com atividade mitótica e pleomorfismo aponta uma possível participação do estrógeno na progressão desses tumores. Receptores para hormônios esteroides regulam a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular e apoptose e o estrógeno induz, fisiologicamente, a proliferação celular e o crescimento tecidual (FISHBEIN *et al.*, 2007). O estrogênio se liga a, pelo menos, três classes principais de receptores, ER- $\alpha$ , ER- $\beta$  e GPR30. O 17 $\beta$ -estradiol é o hormônio ligante mais ativo, estimulando fatores de crescimento e protooncogenes responsáveis pelo crescimento e diferenciação das células alvo (LESLIE *et al.*, 2013). A mama e endométrio, em condições fisiológicas, expressam RE e, por isto, tumores de mama e uterinos que expressam esse marcador, tem melhor prognóstico com fenótipo semelhante ao tecido normal (FISHER *et al.*, 1981; 1983). O tecido peritumoral mesenquimal não apresentou imunomarcagem para os receptores hormonais logo, a expressão desses receptores nos tecido neoplásico seria um marcador de indiferenciação e comportamento biológico mais agressivo.

A falta de relação entre a expressão de RP com as variáveis estudadas (clínicas, histopatológicas e IHQ) difere do relatado para sarcomas cutâneos em cães, que mostrou correlação entre a expressão dessa variável com grau do tumor e

índice de proliferação celular com possível impacto da progesterona no desenvolvimento desses tumores (LOURES *et al.*, 2020). Isto sugere diferenças no perfil imuno-histoquímico, dos receptores hormonais, nos sarcomas cutâneos entre cães e gatos.

A correlação positiva entre o tamanho tumoral e a presença de células gigantes se deve a produção de quimiocinas pelos macrófagos facilitando a migração e invasão celular (WYCKOFF *et al.*, 2007). Uma sinalização do microambiente tumoral promove a infiltração de macrófagos polarizados M2 estimulando o crescimento tumoral, formação de estroma e angiogênese (MANTOVANI *et al.*, 2002). Isto mostra a importância de se estudar a correlação de células gigantes e tamanho tumoral para se entender um dos mecanismos de crescimento tumoral nos sarcomas de aplicação. A falta de associação significativa entre os demais parâmetros e o tamanho tumoral, provavelmente, se deve ao fato do tamanho tumoral ter sido obtido por exame físico, em alguns casos, em valores aproximados sem mensuração com paquímetro. O ideal seria mensurar o tamanho, dos mesmos, por métodos de imagem como tomografia computadorizada (TC) ou ressonância nuclear magnética (RNM), os quais determinam o tamanho tumoral, geralmente, maior que o obtido por exame físico (TRAVETTI *et al.*, 2013).

Este estudo é retrospectivo, com arquivos de blocos de parafina, de casos de sarcoma de aplicação em felinos de 2009 a 2018, sendo assim, o levantamento de alguns dados clínicos como recidiva, sobrevida, ocorrência de metástase e condição reprodutiva dos animais não foi possível devido à dificuldade de contato com médicos veterinários assistentes ou pelo não registro desses dados nos prontuários. Por isto, as análises dos marcadores IHQ, com esses dados clínicos, não foram realizados. O conhecimento da condição reprodutiva dos animais poderia facilitar a compreensão do estímulo hormonal no desenvolvimento dos SAF, pois o crescimento e a agressividade dos dermatofibrossarcomas em humanos são maiores durante a gravidez (WALKER *et al.*, 2016). Isto ainda não foi avaliado na medicina veterinária.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados apontados ainda mostram um predomínio da aplicação de vacinas na região interescapular, local com menor chance de cura, caso um sarcoma de aplicação se desenvolva.

Este é o primeiro trabalho avaliando a presença de RE e RP em SAF e comprovando a capacidade de expressão desses receptores nesses sarcomas. A falta de padronização do grau de expressão de RE e RP, nesses sarcomas, dificulta a realização de estudos e pode afetar a comparação de resultados. Estudos futuros, estabelecendo consensos de análise, poderão contribuir para uma melhor padronização dos dados. A relação entre a expressão de RE, número de mitoses e pleomorfismo aponta uma possível participação desse hormônio na evolução desses tumores e o resultado encontrado pode ser útil na previsão da sensibilidade do uso de moduladores de receptores de estrogênio e inibidores da aromatase no tratamento dos SAF, principalmente nos casos não responsivos aos tratamentos habituais. Essas drogas, com baixo custo e poucos efeitos colaterais tem o potencial de ser uma terapêutica alternativa para tumores irrecorríveis, recidivantes, residuais, metastáticos e RE positivos. Estudos futuros avaliando a relação entre expressão hormonal, fatores prognósticos e uso da terapia hormonal são necessários. A correlação entre tamanho tumoral e células gigantes mostra um possível envolvimento do microambiente tumoral na patogênese desses tumores.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKOC, A.; INAN, S.; SONMEZ, G. Matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and steroid receptor expressions in feline mammary tumors. *Biotechnic & Histochemistry*, v. 87, n. 4, p. 312–319, 2012.
- BEAM, S. L. *et al.* An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in various feline neoplasms. *Veterinary pathology*, v. 40, p. 496–500, 2003.
- BRAY, J.; POLTON, G. Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy combined with anatomical resection of feline injection-site sarcoma : results in 21 cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 14, n. 2, p. 147–160, 2014.
- BURACCO, P. *et al.* Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat. *Veterinary Journal*, v. 163, n. 1, p. 105–107, 2002.
- BURTON, G.; MASON, K. V. Do postvaccinal sarcomas occur in Australian cats? *Australian veterinary journal*, v. 75, n. 2, p. 102–6, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9066965>>.
- CAMPOS, C. B. *et al.* Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 18, n. 12, p. 1003–1012, 2016.
- CANTATORE, M. *et al.* Factors influencing wound healing complications after wide excision of injection site sarcomas of the trunk of cats. *Veterinary Surgery*, v. 43, n. 7, p. 783–790, 2014.
- CARMINATO, A. *et al.* Microchip-associated fibrosarcoma in a cat. *Veterinary Dermatology*, v. 22, p. 565–569, 2011.
- CARNEIRO, C. S. *et al.* Feline injection site sarcoma: immunohistochemical characteristics. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 21, n. 4, p. 314–321, 2019.
- CARVALHO, J. C.; THOMAS, D. G.; LUCAS, D. R. Cluster analysis of immunohistochemical markers in leiomyosarcoma delineates specific anatomic and gender subgroups. *Cancer*, v. 115, n. 18, p. 4186–4195, 2009.
- CECCO, B.S. *et al.* Epidemiological and Pathological Characterization of Feline Injection Site Sarcomas in Southern Brazil. *Journal of Comparative Pathology*, v.172, p.31-36, 2019.
- COUTO, S. S. *et al.* Feline Vaccine-associated Fibrosarcoma: Morphologic Distinctions. *Veterinary Pathology*, v. 39, n. 1, p. 33–41, 2002. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.39-1-33>>.

COYNE, M.J.; REEVES N.C.; ROSEN D.K. Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 210, n. 2, p. 249-51, 1997.

CRONIN, K. I. M. *et al.* Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v. 39, n. 1, p. 51–56, 1998.

DALY, M. K. *et al.* Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 10, n. 2, p. 202–205, 2008.

DE MAN, M. M. G.; DUCATELLE, R. V. Bilateral subcutaneous fibrosarcomas in a cat following feline parvo-, herpes- and calicivirus vaccination. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 9, n. 5, p. 432–434, 2007.

DEAN, R. S.; PFEIFFER, D. U.; ADAMS, V. J. The incidence of feline injection site sarcomas in the United Kingdom. *BMC Veterinary Research*, v. 9, n. 1, p. 17, 2013.

DODDY, F. D. *et al.* Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *Journal of Comparative Pathology*, v. 114, n. 2, p. 165–174, 1996.

EGGERS CARROLL, 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. *Veterinary Pathology*, v. 39, n. 2, p.216–227, 2002.

ESPLIN, D.G. *et al.* Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat. *Veterinary Cancer Society Newsletter*, v. 23, p. 8–9, 1999.

FISHBEIN, L. *et al.* In vitro studies of steroid hormones in neurofibromatosis 1 tumors and Schwann cells. *Molecular Carcinogenesis*, v.46, p.512-523, 2007.

FISHER, B. *et al.* Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 1,p. 227-41, 1983.

FISHER, B. *et al.* Treatment of primary breast cancer with chemotherapy and tamoxifen. *The New England Journal of Medicine*, v. 305, p. 1-6, 1981.

GAGNON, A. Drug injection-associated fibrosarcoma in a cat. *Feline Practitioners*,v. 28, p.18–21, 2000.

GIUDICE, C. *et al.* Feline injection-site sarcoma: Recurrence, tumour grading and surgical margin status evaluated using the three-dimensional histological technique. *Veterinary Journal*, v. 186, n. 1, p. 84–88, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.07.019>>.

- GOBAR, G.M.; KASS, P.H. World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 220, p.1477-82, 2002.
- HAMMOND, M. E. H. *et al.* American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 16, p. 2784–2795, 2010.
- HAHN, K. A *et al.* Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 22, n. 6, p. 1301–9, 2008.
- HARTMANN, K. *et al.* Feline injection-site sarcoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 17, n. 7, p. 606–613, 2015. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1098612X15588451>>.
- HENDRICK, M. J. Mesenchymal tumors of the skin and soft tissues, in: Meuten, DJ (ed): *Tumors in Domestic Animals* (ed 5). John Wiley & Sons, Ames, 2017, pp. 142–175.
- HENDRICK, M. J. Feline Vaccine-Associated Sarcomas. *Cancer Investigation*, v. 17, n. 4, p. 273–277, 1999.
- HENDRICK, M. J.; WANG, Y. Y. Postvaccinal Sarcomas in the Cat: Epidemiology and Electron Probe Microanalytical Identification of Aluminum. *Cancer Research*, v. 52, n. 19, p. 5391–5394, 1992.
- HENDRICK M.J.; BROOKS J.J. Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, v. 31, p. 126-129, 1994.
- HENDRICK M.J. *et al.* Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at non -vaccination sites in cats: 239 cases (1991–1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 205, p. 1425–1429, 1994.
- HENDRICK M.J.; DUNAGAN C.A. Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988–1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 198, p. 304–305, 1991.
- HENDRICK M.J.; GOLDSCHMIDT M.H. Do injection site reactions induce fibrosarcoma in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 199, n.8, p. 968, 1991.
- HENDRICKS, C. G. *et al.* Tail vaccination in cats: a pilot study. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 16, n. 4, p. 275–280, 2014. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1098612X13505579>>.
- HERSHEY, A. E. H. *et al.* Aberrant p53 Expression in Feline Vaccine-associated

Sarcomas and Correlation with Prognosis. *Veterinary Pathology*, v. 42, p. 805–811, 2005.

HERSHEY A.E. et al. Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases(1986–1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 216, p. 58–61, 2000.

HOLTERMANN, N.; KIUPEL, M.; HIRSCHBERGER, J. The tyrosine kinase inhibitor toceranib in feline injection site sarcoma: efficacy and side effects. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 15, n. 2, p. 632–640, 2016.

HÜTTINGER, C. et al. Neoadjuvant gene delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: A phase I trial. *Journal of Gene Medicine*, v. 10, n. 6, p. 655–667, 2008.

IOFFE, Y. J. et al. Hormone receptor expression in uterine sarcomas: Prognostic and therapeutic roles. *Gynecologic Oncology*, v. 115, n. 3, p. 466–471, 2009. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.08.014>>.

JAHNKE, A. et al. Intra-tumoral gene delivery of feline IL-2, feline IFN- $\gamma$  and feline GM-CSF using magnetofection as a neoadjuvant treatment option for feline fibrosarcomas: A phase-I study. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, v. 54, n. 10, p. 599–606, 2007.

JAS, D. et al. Adjuvant immunotherapy of feline injection-site sarcomas with the recombinant canarypox virus expressing feline interleukine-2 evaluated in a controlled monocentric clinical trial when used in association with surgery and brachytherapy. *Trials in Vaccinology*, v. 4, p. 1–8, 2014. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trivac.2014.11.001>>.

KALAT M, MAYR B, SCHLEGER W, W. B. Chromosomal hyperdiploidy in a feline sarcoma. *Research in Veterinary Science*, v. 51, p. 227–228, 1991.

KANG, S.; SOUTHARD, T.; HUME, K. R. DNA damage is a feature of feline injection-site sarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 15, n. 2, p. 518–524, 2017.

KASS, P.H. et al. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 23, n. 3, p.396-405, 1993.

KASS, P. H. et al. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 223, n. 9, p. 1283–+, 2003.

KELLEY, T.W.; BORDEN, E.C.; GOLDBLUM, J.R. Estrogen and progesterone receptor expression in uterine and extrauterine leiomyosarcomas: an immunohistochemical study. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, v. 12, p. 338-41, 2004.

- KIDNEY, B.A. *et al.* Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. *American Journal of Veterinary Research*, v. 61, p.1037–1041, 2000.
- KIDNEY, B.A. *et al.* Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas. *American Journal of Veterinary Research*, v.62, p.1990–1994, 2001.
- KIDNEY, B.A. *et al.* Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for polyomavirus DNA and antigen. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, p. 828–832, 2001a.
- KIDNEY, B.A. *et al.* Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, p. 833–839, 2001b.
- KIRPENSTEIJN, J. Feline injection site-associated sarcoma: Is it a reason to critically evaluate our vaccination policies? *Veterinary Microbiology*, v. 117, n. 1, p. 59–65, 2006.
- KLICZKOWSKA, K. *et al.* Epidemiological and morphological analysis of feline injection site sarcomas. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 18, n. 2, p. 313–322, 2015.
- KOBAYASHI, T. *et al.* Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v. 43, n. 5, p. 473–479, 2002.
- KREICHER, K. L. *et al.* Hormone receptor expression in patients with dermatofibrosarcoma protuberans. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 75, n. 6, p. 1205–1209, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2016.07.011>>.
- LADLOW, J. Injection Site-Associated Sarcoma in the Cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 15, n. 5, p. 409–418, 2013. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1098612X13483239>>.
- LAWRENCE, J. *et al.* Masitinib demonstrates anti-proliferative and pro-apoptotic activity in primary and metastatic feline injection-site sarcoma cells. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 10, n. 2, p. 143–154, 2012.
- LESLIE, K. K. *et al.* The Estrogen Receptor Joins Other Cancer Biomarkers as a Predictor of Outcome. *Obstetrics and Gynecology International*, v. 2013, p. 1–5, 2013.
- LI, L. *et al.* Potential benefit of hormonal therapy for non-uterine soft tissue sarcoma (STS). *Springerplus*, v. 2, p. 536–539, 2013.
- LILLO OSUMA, M.A. *et al.* Activation of estrogen receptor alpha by decitabine inhibits osteosarcoma growth and metastasis. *Cancer Research*, v. 79, p.1054–68, 2019.

LOURES, F.H. *et al.* Progesterone and estrogen receptor expression by canine cutaneous soft tissue sarcomas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.40, n. 4, p.284-288, 2020.

MADEWELL, B. R. *et al.* Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999). *Veterinary pathology*, v. 38, n. 2, p. 196–202, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11280376>>.

MANTOVANI, A. *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, v. 23, n. 11, p. 549-555, 2002.

MARTANO, M. *et al.* Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: A report on 69 cases. *Veterinary Journal*, v. 170, n. 1, p. 84–90, 2005.

MARTANO, M.; MORELLO, E.; BURACCO, P. Feline injection-site sarcoma: Past, present and future perspectives. *Veterinary Journal*, v. 188, n. 2, p. 136–141, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.025>>.

MARTÍN DE LAS MULAS, J. *et al.* Oestrogen and progesterone receptors in feline fibroadenomatous change: An immunohistochemical study. *Research in Veterinary Science*, v. 68, n. 1, p. 15–21, 2000.

MAYR, B. *et al.* Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. *Veterinary Research Communication*, v.22, n.4, p.249-255, 1998.

MAYR B, BOCKSTAHLER B, LOUPAL G, R. M.; REIFINGER, M.; SCHLEGER, W. Cytogenetic variation between four cases of feline fibrosarcoma. *Research in Veterinary Science*, v. 61, p. 268–270, 1996.

MCENTEE, M. C.; PAGE, R. L. Feline Vaccine-Associated Sarcomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 15, n. 3, p. 176-182, 2001. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1892/0891-6640\(2001\)015%3C0176:FVS%3E2.3.CO;2](http://doi.wiley.com/10.1892/0891-6640(2001)015%3C0176:FVS%3E2.3.CO;2)>.

MENG, T. *et al.* Hormone receptors analysis in Chinese patients with dermatofibrosarcoma protuberans. *Journal of Surgical Oncology*, v. 118, n. 1, p. 157–166, 2018.

MILLANTA, F. *et al.* Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, v.79, p.225-232, 2005.

MILLANTA, F. *et al.* Steroid hormone receptors in normal, dysplastic and neoplastic feline mammary tissues and their prognostic significance. *Veterinary Record*, v.158, p.821-824, 2006.

- MUNDAY, J. S.; STEDMAN, N. L.; RICHEY, L. J. Histology and Immunohistochemistry of Seven Ferret Vaccination-site Fibrosarcomas. *Veterinary Pathology*, v. 40, n. 3, p. 288–293, 2003. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/lookup/doi/10.1354/vp.40-3-288>>.
- MUNDAY, J.S., *et al.* Development of an injection site sarcoma shortly after meloxicam injection in an unvaccinated cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 13, p. 988–991, 2011.
- NIETO, A. *et al.* Immunohistochemical Expression of p53, Fibroblast Growth Factor- $\beta$ , and Transforming Growth Factor- $\alpha$  in Feline Vaccine-associated Sarcomas. *Veterinary Pathology*, v. 40, n. 6, p. 651–658, 2003. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.40-6-651>>.
- PATT, J.C.; HAINES, N. Soft tissue sarcomas in skin: presentations and management. *Seminars in Oncology*, v.43, n.3, p.413-8, 2016.
- PEREIRA, S. *Sarcoma de aplicação felino: avaliações histomorfológica, imunofenotípica e tratamento quimioterápico*. 2014. Dissertação (livre docência) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PETTERINO, C. *et al.* Immunohistochemical study of STAT3 expression in feline injection-site fibrosarcomas. *Journal of Comparative Pathology*, v. 134, p. 91–100, 2006.
- PHELPS, H. A. *et al.* Radical excision with five-centimeter margins for treatment of feline injection-site sarcomas: 91 cases (1998–2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 239, n. 1, p. 97–106, 2011. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.239.1.97>>.
- PORCELLATO, I. *et al.* Feline Injection-Site Sarcoma. *Veterinary Pathology*, v. 54, n. 2, p. 204–211, 2017.
- RAMOS-VARA, J.A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, v.42, n.4, p.405-426, 2005.
- ROMANELLI, G. *et al.* Analysis of prognostic factors associated with injection-site sarcomas in cats: 57 cases (2001-2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 232, n. 8, p. 1193–9, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18412533>>.
- SABA, C. Vaccine-associated feline sarcoma: current perspectives. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, v. 8, p. 13–20, 2017. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/vaccine-associated-feline-sarcoma-current-perspectives-peer-reviewed-article-VMRR>>.
- SANDLER, I.; TEEGER, M.; BEST, S. Metastatic vaccine associated fibrosarcoma in a 10-year-old cat. *Canadian Veterinary Journal*, v. 38, n. 6, p. 374, 1997.
- SARAIVA, A. L. *et al.* An immunohistochemical study on the expression of sex steroid receptors, Ki67 and cytokeratins 7 and 20 in feline endometrial

adenocarcinomas. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 204-217, 2015. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/11/204>>.

SCHERK, M. A. *et al.* 2013 AAFP feline vaccination advisory panel report. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 15, p. 785–808, 2013. Disponível em: <<http://jfm.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/1098612X13519377>>.

SÉGUIN, B. Feline injection site sarcomas. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v. 32, n. 4, p. 983–995, 2002.

SHAGUFTA; Ahmad, I. Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.143, p. 515-31, 2018.

SHAW, S. C. *et al.* Temporal changes in characteristics of injection-site sarcomas in cats: 392 cases (1990-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 234, n. 3, p. 376–80, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210260>>.

SMITH, A. J.; NJAA, B. L.; LAMM, C. G. Immunohistochemical expression of c-KIT protein in feline soft tissue fibrosarcomas. *Veterinary Pathology*, v. 46, n. 5, p. 934–939, 2009. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.08-VP-0219-L-FL>>.

SORIA, J. C. *et al.* Phase 1 dose-escalation study of oral tyrosine kinase inhibitor masitinib in advanced and/or metastatic solid cancers. *European Journal of Cancer*, v. 45, n. 13, p. 2333–2341, 2009.

SRIVASTAV, A. *et al.* Comparative vaccine-specific and other injectable-specific risks of injection-site sarcomas in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 241, n. 5, p. 595–602, 2012.

THANOPOULOU, E. *et al.* Treatment of hormone positive uterine leiomyosarcoma with aromatase inhibitors. *Clinical Sarcoma Research*, v.4, p.1-8, 2014. Disponível em: <https://clinicalsarcomaresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-3329-4-5>

TRAVETTI, O. *et al.* Computed tomography characteristics of fibrosarcoma — a histological subtype of feline injection-site sarcoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 15, n. 6, p. 488–493, 2013. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1098612X12472174>>.

TROJANI, M. *et al.* Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Internacional Journal of Cancer*, v. 33, n. 1, p. 37–42, 1984.

VACCINE-ASSOCIATED FELINE SARCOMA TASK FORCE. The current understanding and management of vaccine-associated sarcomas in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 226, p. 1821-1842, 2005.

VALKOV, A. et al. Estrogen receptor and progesterone receptor are prognostic factors in soft tissue sarcomas. *International Journal of Oncology*, v.38, p.1031-1040, 2011.

VASCELLARI, M. et al. Fibrosarcomas at presumed sites of injection in dogs: Characteristics and comparison with non-vaccination site fibrosarcomas and feline post-vaccinal fibrosarcomas. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, v. 50, n. 6, p. 286–291, 2003.

WALKER, J. L. et al. Cutaneous tumors in pregnancy. *Clinics in Dermatology*, v. 34, n. 3, p. 359–367, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.008>>.

WILCOCK, B.; WILCOCK, A.; BOTTOMS, K. Feline postvaccinal sarcoma: 20 years later. *Canadian Veterinary Journal*, v. 53, n. 4, p. 430–434, 2012.

WYCKOFF, J.B. et al. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Research*, v. 15, p. 2649–2656, 2007.

ZABIELSKA-KOCZYWAŚ, K.; WOJTALEWICZ, A.; LECHOWSKI, R. Current knowledge on feline injection-site sarcoma treatment. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 59, n. 1, p. 47-53, 2017. Disponível em: <<http://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13028-017-0315-y>>.

## 9. APÊNDICE

**Apêndice A.** Expressão imuno-histoquímica em sarcomas de aplicação em felinos (n=53).

Identificação	Vimentina	Estrógeno	Progesterona	Ki67
1	>90%	+/4+	Ausente	0.08
2	>90%	+/4+	Ausente	0.02
3	>90%	+/4+	++/4+	0.11
4	>90%	+/4+	++/4+	0.01
5	>90%	+/4+	+/4+	0.38
6	>90%	Ausente	Ausente	0.05
7	>90%	Ausente	Ausente	0.07
8	>90%	Ausente	Ausente	0.18
9	>90%	Ausente	Ausente	0.30
10	>90%	Ausente	Ausente	0.14
11	>90%	+/4+	Ausente	0.07
12	>90%	++/4+	Ausente	0.11
13	>90%	Ausente	+/4+	0.09
14	>90%	+/4+	Ausente	0.25
15	>90%	++/4+	++/4+	0.10
16	>90%	+/4+	Ausente	0.06
17	>90%	+/4+	++/4+	0.12
18	>90%	Ausente	Ausente	0.10
19	>90%	Ausente	Ausente	0.10
20	>90%	Ausente	Ausente	0.18
21	<90%	++/4+	Ausente	0.04
22	>90%	+/4+	+/4+	0.34
23	>90%	+++/4+	++/4+	0.15
24	>90%	+/4+	Ausente	0.45
25	>90%	Ausente	Ausente	0.30
26	>90%	Ausente	Ausente	0.09
27	<90%	Ausente	Ausente	0.05
28	>90%	Ausente	Ausente	0.04
29	<90%	+/4+	Ausente	0.16
30	>90%	+++/4+	++/4+	0.39
31	>90%	+/4+	Ausente	0.20
32	>90%	+/4+	+/4+	0.07

33	>90%	+/4+	+/4+	0.14
34	>90%	+/4+	+/4+	0.27
35	>90%	Ausente	+/4+	0.17
36	>90%	+/4+	+/4+	0.07
37	>90%	Ausente	Ausente	0.06
38	>90%	+/4+	Ausente	0.23
39	>90%	+/4+	Ausente	0.13
40	>90%	+/4+	+/4+	0.27
41	>90%	+/4+	Ausente	0.11
42	>90%	+++/4+	Ausente	0.24
43	>90%	+/4+	Ausente	0.14
44	>90%	Ausente	Ausente	0.06
45	>90%	+/4+	Ausente	0.44
46	>90%	+/4+	+/4+	0.09
47	>90%	Ausente	+/4+	0.12
48	>90%	+/4+	Ausente	0.23
49	>90%	Ausente	Ausente	0.09
50	>90%	+/4+	++/4+	0.08
51	>90%	+/4+	Ausente	0.01
52	>90%	+/4+	+/4+	0.43
53	>90%	Ausente	++/4+	0.17

---