Ana Cristina Ochôa Fernandes Carvalho

Sarcomas das Partes Moles no Gato

Contributo para a sua caracterização biopatológica e na pesquisa de factores de prognóstico

MESTRADO EM ONCOLOGIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

LNIV
Laboratório Nacional
de Investigação Veterinária

Jefferson
Medical
College

Instituto Português de Oncologia
Francisco Gentil

CBAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Ana Cristina Ochôa Fernandes Carvalho

Sarcomas das Partes Moles no Gato

Contributo para a sua caracterização biopatológica e na pesquisa de factores de prognóstico

MESTRADO EM ONCOLOGIA
1999-2001

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO
PORTO, 2004

Dissertação de Candidatura do Grau de Mestre, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Ao meu pai, por desde cedo me incentivar nos estudos, exemplo de força de vontade, pois ingressou no Ensino Superior com 52 anos de idade.

À minha mãe, pela paciência inesgotável e grande carinho no cuidado dos meus meninos.

À Marlene, pela grande amizade, apoio e carinho.

Ao Nando, pelo incentivo, compreensão e apoio.

Ao Rui e à Martinha, meus filhos, pela cedência do tempo que por direito lhes pertence e pelos inúmeros momentos em que estive ausente.

AGRADECIMENTOS

Para que este trabalho se tornasse uma realidade, muitas foram as pessoas que de alguma forma contribuíram, com o seu conhecimento, a sua amizade, apoio e compreensão.

Ao Professor Doutor Carlos Lopes exprimimos a nossa gratidão pela disponibilidade na orientação científica deste trabalho, pelos sapientes conhecimentos que nos transmitiu e facilidades concedidas na execução de técnicas existentes no laboratório de Anatomia Patológica do IPO-Porto, pela amizade com que nos distinguiu e honrou e que vivamente retribuímos.

Aos Professores Doutores Guimarães dos Santos, Fernando Oliveira Torres e João Amado, coordenadores do mestrado em Oncologia, exprimimos a nossa gratidão pelos sábios conhecimentos que nos transmitiram e pela forma dinâmica com que organizaram este mestrado.

Ao Professor Doutor Manuel José de Azevedo Ramos, Director do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária-Delegação do Porto e Chefe de Departamento de Histopatologia, o nosso agradecimento pelas facilidades concedidas à realização deste trabalho, pelo apoio, confiança e incentivo demonstrados.

À Professora Doutora Conceição Peleteiro, vice-reitora da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, pela sugestão do tema, pela disponibilidade demonstrada e pela cedência das amostras, sem as quais, este trabalho não teria sido possível.

Ao Dr. Carlos Palmeira não podíamos deixar de reconhecer a simpatia com que nos recebeu, pela colaboração prestada na realização da técnica de Citometria de Imagem, pelas sugestões sempre pertinentes e pelo incentivo na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Júlio Carvalheira, pela simpatia e pela colaboração prestada na análise estatística dos dados.

À Professora Doutora Fátima Gärtner, pela simpatia e prontidão com que nos recebeu, pelas valiosas sugestões nos procedimentos técnicos e pela revisão do texto.

À Professora Doutora Helena Vala, não podemos deixar de lhe agradecer a forma amiga da sua permanente disponibilidade, pelo incentivo constante e pelas importantes sugestões na revisão do texto.

À Dra. Tânia por toda a amizade dispensada e pela colaboração prestada na recolha dos dados clínicos dos animais e pelas preciosas dicas técnicas.

Á Dra. Paula Oliveira e ao Dr. Aureliano Dias pelo incentivo, pela forma amiga com que nos facultaram alguma bibliografia essencial para a realização desta tese e por todas as sugestões apresentadas.

Ao Dr. França Mota pela sua disponibilidade de transmitir os seus conhecimentos na área da Patologia, pela motivação e incentivos constantes.

À Dra. Carla Lima, nossa colega de trabalho, agradecemos toda a ajuda na realização desta dissertação e todas as palavras de ânimo nos momentos mais críticos.

Aos colegas clínicos pela colaboração prestada na recolha de informações dos gatos.

À D. Fernanda Veríssimo pelas palavras amigas e pela força que sempre nos transmitiu.

Às Técnicas de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, pela simpatia e por toda a colaboração prestada na reunião das amostras.

À Fátima Falcão e à Carolina Camati por toda a simpatia, amizade e palavras de incentivo, à Cláudia Capela pelo interesse, abertura e preciosa colaboração nas metodologias.

A todos os colegas e funcionários do LNIV pelas palavras de incentivo nos momentos críticos, apoio e amizade que transformaram o nosso local de trabalho na nossa segunda casa.

RESUMO

A incidência dos sarcomas das partes moles cutâneos no gato tem vindo a aumentar. Estas neoplasias aparecem sobretudo em áreas anatómicas de eleição para a administração de vacinas, tendo sido descritos vários estudos epidemiológicos que relacionam o acto de vacinação com fenómenos de carcinogénese.

Neste trabalho foram avaliados sessenta e dois sarcomas das partes moles do gato, através de estudos de histopatologia convencional, histoquímica, imunohistoquímica e de citometria de imagem. Foram estudadas algumas variáveis clínicas bem como a sobrevida dos animais, desenvolvendo esforços para a identificação de factores de prognóstico.

Os gatos apresentaram, na altura do primeiro diagnóstico, a idade média de 8,9 anos, ocorrendo em ambos os sexos (48,4% fêmeas e 51,6% machos) maioritariamente de raça Europeu Comum (79,0%). A localização anatómica das neoplasias mais frequentemente observada foi a parede costal (83,9%). O valor da mediana para o tempo de sobrevida total foi de 277 dias e para o tempo de sobrevida livre de doença de 198 dias.

O tipo histológico mais observado foi o sarcoma miofibroblástico (45,2%), tendo também ocorrido o fibrossarcoma (16,1%), mixofibrossarcoma (14,5%), sarcoma com células gigantes (12,9%), condrossarcoma mesenquimatoso extra-esquelético (4,2%), tumor maligno das bainhas nervosas (3,2%), um sarcoma rabdóide (1,6%) e um lipossarcoma desdiferenciado (1,6%). A maioria dos sarcomas estudados apresentou grau 3 (82,3%). A média do índice de proliferação para todas as neoplasias foi de 49%.

Das neoplasias do nosso estudo, foi possível avaliar a imunorreactividade ao marcador p53 em quarenta e oito casos (77,4%) da nossa amostragem. Ocorreu expressão de proteína p53 em 20,8% dos casos analisados.

Os sarcomas felinos apresentaram aneuploidia de ADN em trinta e quatro (82,9%) das neoplasias estudadas. Apenas 17,1% dos casos analisados apresentaram conteúdo de ADN diplóide. Dentro da categoria dos aneuplóides de ADN, onze neoplasias destacaram-se pela presença de clones múltiplos, tendo sido considerados multiplóides de ADN.

A raça dos gatos, o tamanho, o padrão de crescimento e a necrose das neoplasias revelaram-se importantes factores de prognóstico.

SUMMARY

The incidence of cutaneous sarcomas in cats has risen. These neoplasms arise especially in proper sites to vaccine administration and several epidemiological studies have been reported, relating the vaccination act with carcinogenesis events.

In this study, sixty-two feline's soft tissue sarcomas have been evaluated by conventional histopathology, histochemistry, immunohistochemistry and image cytometry. We have also evaluated some clinical variables and cats' survival, having developed efforts to identify prognostic factors.

Cats' average of age, at the first diagnosis, was 8,9 years affecting both sexes (48,4% females and 51,6% males), mainly Short Haired breed (79,0%). The most frequent anatomic location observed was the thoracic wall (83, 9%). The median for time of global survival was 277 days and for the time of survival disease free was 198 days.

The most frequent histological type observed was the myofibroblastic sarcoma (45,2%). Moreover, fibrosarcoma (16,1%), myxofibrosarcoma (4,5%), sarcoma with giant cells (12,9%), mesenchimal extra skeletical condrosarcoma (4,2%), malignant nervous sheath tumour (3,2%), a rhabdoide sarcoma (1,6%) and a dedifferentiated liposarcoma (1,6%) also occurred. The majority of the sarcomas presented histological grade 3. The average for the proliferative index was 49%.

Based on the neoplasms studied, forty-eight cases (77,4%) have been evaluated for p53 immunorreactivity. Protein p53 has been expressed in 20,8% of the analysed cases.

The feline's sarcomas showed DNA aneuploidy in thirty-four (82,9%) of the analysed cases. Only 17,1% presented diploid DNA content. On the DNA aneuploid category, eleven neoplasms showed multiple clones and have been considered DNA multiploid.

Cats' breed, tumour size, growth patterns and necrosis showed important prognostic values.

ÍNDICE

RESUMO VI
SUMMARY VII
1- INTRODUÇÃO 1
2- OBJECTIVOS 8
3- MATERIAL E MÉTODOS 9
3.1 – AMOSTRAS 9
3.2-MÉTODOS 9
3.2.1- Dados clínicos 9
3.2.2- Estudo da sobrevida 9
3.2.3- Estudo anatomopatológico 10
3.2.4- Estudo histopatológico 10
3.2.4.1- Características histopatológicas 10
3.2.4.2- Graduação histológica 10
3.2.4.3- Avaliação do infiltrado inflamatório 12
3.2.5- Estudo histoquímico 12
3.2.6- Estudo imunohistoquímico 13
3.2.6.1-Metodologia 13
3.2.6.2- Lâminas de controlo 15
3.2.6.3- Métodos de interpretação 15
3.2.6.3.1- Métodos semi-quantitativos 16
3.2.6.3.2- Métodos quantitativos 16
3.2.6.3.3- Métodos qualitativos 16
3.2.7- Classificação histológica 16
3.2.8- Citometria de imagem 17
3.2.8.1- Metodologia 17
3.2.8.2- Quantificação do conteúdo de ADN nuclear 18
3.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA 20
4- RESULTADOS 21
4.1- ESTUDO DOS ANIMAIS PORTADORES DAS NEOPLASIAS 21
4.1.1- Dados clínicos 21
4.1.2- Localização das neoplasias 21
4.1.3- Estudo da sobrevida 22

4.2- ESTUDO DAS NEOPLASIAS 22
4.2.1- Exame anatomopatológico 22
4.2.2- Exame microscópico 23
A - Sarcoma miofibroblástico (SM) 24
B - Fibrossarcoma (FSA) 27
C - Mixofibrossarcoma (MFSA) 27
D - Sarcoma com células gigantes (SCG) 29
E - Condrossarcoma mesenquimatoso extra-esquelético (CME) 33
F – Tumor maligno das bainhas nervosas (TMBN) 35
G - Sarcoma rabdóide (SRB) 36
H - Lipossarcoma desdiferenciado (LPSA) 38
4.2.2.1- Caracterização da imunorreactividade das células neoplásicas aos filamentos intermédios e proteína S-100. 40
4.2.2.2- Graduação histológica 42
4.2.2.3- Caracterização do infiltrado inflamatório 43
4.2.2.4- Avaliação da actividade proliferativa 46
4.2.2.5- Expressão da proteína p53 48
4.3- ANÁLISE DE CITOMETRIA DE IMAGEM 49
4.3.1- Ploidia de ADN 49
4.3.2- Índice de ADN (IA) 51
4.3.3- Fracção de células com conteúdo superior a 2,5c, 5c e 9c 51
4.4- ESTUDO DE FACTORES DE PROGNÓSTICO 52
4.4.1- Variáveis clínicas 52
4.4.2- Variáveis patológicas 54
4.4.3- Variáveis citométricas 57
5- DISCUSSÃO 59
6- CONCLUSÕES 83
7- ESTUDOS FUTUROS 84
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 85
9- ANEXOS 102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição anatómica das neoplasias observadas. 21
Figura 2- Proporção de sobrevida de cinquenta e um gatos com sarcomas das partes moles. 23
Figura 3- SM. Feixes multidireccionais de células neoplásicas fusiformes. Anisocitose e hemorragia. H&E.100x. 25
Figura 4- SM. Padrão de marcação difuso para a vimentina. ABComplex-HRP, 200x. 25
Figura 5- SM. Padrão de marcação difuso para a α - actina. ABComplex-HRP, 200x. 26
Figura 6- SM. Ausência de expressão ao antigénio desmina pelas células neoplásicas. ABComplex-FA, 40x. 26
Figura 7- FSA. Feixes multidireccionais de células neoplásicas fusiformes. H&E.100x. 28
Figura 8- FSA. Padrão de crescimento infiltrativo com invasão e dissociação de fibras musculares esqueléticas e tecido adiposo. H&E.100x. 28
Figura 9- MFSA. Estroma mixóide moderado. Anisocitose e anisocariose das células neoplásicas. H&E.100x. 30
Figura 10- MFSA. Condensação perivascular de células neoplásicas- padrão vascular curvilinear. H&E.100x. 30
Figura 11- SCG. Células gigantes multinucleadas do tipo ostoclasto. H&E.100x. 31
Figura 12- SCG.Focos de hemorragia e depósitos de hemosiderina.H&E,100x. 32
Figura 13- SCG. Presença de vacúolos intracitoplasmáticos, hemorragia e depósitos de hemosiderina. H&E,200x. 32
Figura 14-CME. Ilhotas de cartilagem hialina. H&E, 200x. 34
Figura 15- CME. Imunorreactividade ao marcador proteína S-100 Intensa marcação das células de diferenciação condróide. ABComplex-HRP, 100X. 34
Figura 16- TMBN. Células neoplásicas justapostas em paliçada. H&E.100x. 35
Figura 17- TMBN. Imunorreactividade ao marcador proteína S-100. ABComplex-HRP, 100X. 36
Figura 18- SRB. Células neoplásicas redondas de acentuada anisocitose e anisocariose. H&E.200x. 37
Figura 19- SRB. Imunorreactividade ao marcador vimentina. Intensa marcação citoplasmática. ABComplex-HRP, 200X. 37
Figura 20- LPSA. Transição entre uma área de elevada celularidade e outra área menos densa, de matriz do tipo mixóide, com células de características fusiformes a poligonais. H&E.40x. 38
Figura 21- LPSA. Estroma de natureza mixóide moderado, células estreladas e contendo vacúolos lipídicos. H&E.100x. 39
Figura 22- LPSA. Imunorreactividade ao marcador proteína S-100. Intensa marcação das células de diferenciação lipoblástica. ABComplex-HRP, 200X. 39
Figura 23- SM localizado na mama, ausência de imunorreactividade ao marcador citoqueratina 14 pelas células neoplásicas e positividade difusa das células epiteliais. ABComplex-HRP, 40X. 41
Figura 24- Caracterização dos tipos histológicos observados e o grau histológico. 42
Figura 25- Associação do grau histológico e a idade dos gatos (p=0,01). 42
Figura 26 - Associação da localização anatómica das neoplasias e o grau histológico (p=0,02). 43
Figura 27 - Associação do infiltrado inflamatório peritumoral e o grau histológico (p=0,04). 43

Figura 28- Caracterização do infiltrado inflamatório peritumoral nos tipos histológicos observados. 44
Figura 29- Agregado linfocitário peritumoral. H&E,100x. 45
Figura 30- SM. Infiltrado linfocitário intratumoral. H&E, 100x..... 45
Figura 31- Associação da presença de infiltrado inflamatório e a localização anatómica das neoplasias (p=0,000001)..... 46
Figura 32- Associação do infiltrado inflamatório e o grau histológico dos sarcomas felinos observados (p=0,03)..... 46
Figura 33- Associação do índice de PCNA e a contagem das mitoses (p=0,01). 47
Figura 35- SM. Imunorreactividade nuclear à p53 (Ip53=55%). ABComplex-FA (200x) 48
Figura 36- Histograma diplóide de ADN. 50
Figura 37- Histograma aneuplóide de ADN..... 50
Figura 38- Histograma multiplóide de ADN..... 50
Figura 39-Curva de sobrevida e o efeito da raça (p=0,05)..... 53
Figura 40- Curva de sobrevida e o efeito do tamanho das neoplasias (p=0,02)..... 54
Figura 41- Curva de sobrevida e o efeito da variável patológica padrão de crescimento (p=0,04). 56
Figura 42- Curva de sobrevida e o efeito da variável patológica necrose (p=0,05) 56
Figura 43- Curva de sobrevida e o efeito da variável patológica expressão de p53 (p=0,05). 56
Figura 44- Curva de sobrevida e o efeito da variável citométrica >2,5 c. 58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Sistema de Graduação da FNCLCC: Definição de parâmetros (Adaptado de Fletcher *et al.*, 2002a)..... 11
Tabela 2- Avaliação da intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório peritumoral (Adaptado de Couto *et al.*, 2002)..... 12
Tabela 3- Anticorpos primários utilizados, diluições e tempos de exposição..... 15
Tabela 4- Classificação histológica dos sarcomas observados..... 23
Tabela 5- Expressão dos marcadores desmina, α-actina e proteína S-100 nos diferentes tipos histológicos..... 41
Tabela 6- Valores das varáveis citométricas > 2,5c,> 5c e> 9c 51
Tabela 7- Características clínicas e análise univariada com os tempos de sobrevida total em 51 gatos com sarcomas das partes moles. 53
Tabela 8- Características patológicas das neoplasias e análise univariada com os tempos de sobrevida total 55
Tabela 9- Características citométricas das neoplasias e análise univariada com os tempos de sobrevida total.. 57
Tabela 10- Variáveis clínicas e patológicas observadas. 103
Tabela 11-Caracterização das variáveis clínicas e os tipos histológicos observados. .. 104
Tabela 12- Caracterização das variáveis patológicas e os tipos histológicos observados. 104
Tabela 13- Associação entre a variável grau histológico e as variáveis clínicas e patológicas. 105
Tabela 14- Associação entre a variável infiltrado inflamatório e as variáveis clínicas e patológicas. 106
Tabela 15- Associação entre a variável índice de proliferação e as variáveis clínicas e patológicas. 107
Tabela 16-Associação entre a variável expressão de p53 e as variáveis clínicas e patológicas. 108
Tabela 17- Variáveis citométricas observadas. 109
Tabela 18- Associação entre a variável ploidia e as variáveis clínicas e patológicas... 110
Tabela 19- Associação entre a variável índice de ADN e as variáveis clínicas e patológicas. 111
Tabela 20-Associação entre as variáveis citométricas >2,5c, >5c e >9c e as variáveis clínicas e patológicas..... 112

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABComplex- Método indirecto avidina-biotina
ADN- Ácido desoxirribonucleico
CD3- "Cluster differentiation 3"
CD20 - "Cluster differentiation 20"
CME - Condrossarcoma mesenquimatoso extra-esquelético
CNM- Células neoplásicas multinucleadas
CV - Coeficiente de variação
DAB - Tetrahidrocloreto de 3´3 diaminobenzidina
FA- Fosfatase alcalina
FeLV - Vírus da Leucemia Felina
FeSV - Vírus do Sarcoma Felino
FHM- Fibrohistiocitoma maligno
FSA - Fibrossarcoma
H&E- Coloração de hematoxilina e eosina
HRP- Peróxidase
IA - Índice de ADN
IHQ - Imunohistoquímica
IM - Índice mitótico
IP- Índice de proliferação
Ip53- Ìndice de p53
LPSA - Lipossarcoma desdiferenciado
n - Número total de observações
OMS - Organização Mundial de Saúde
MFSA - Mixofibrossarcoma
PCNA - Antigénio de proliferação nuclear
PCR- Reacção em cadeia de Polimerases
PDGF- Factor de crescimento derivado das plaquetas
SCG - Sarcoma com células gigantes
sd - Desvio padrão
SM - Sarcoma miofibroblástico
SPM- Sarcomas das partes moles
SRB - Sarcoma rabdóide
TBS - Tampão Tris salino
TMBN - Tumor maligno das bainhas nervosas
TPR- Tempo da primeira recidiva
TST- Tempo de sobrevida total

1- INTRODUÇÃO

O cancro afecta milhares de pessoas em todo o mundo (Garner, 1998; Ferlay, *et al.*, 2001) e faz parte de um grupo de doenças cuja incidência não parece diminuir, apesar dos grandes avanços científicos das últimas décadas (Huff, 1994; Tomatis, 1995; Trichoupoulus *et al.*, 1996).

Em Portugal, a importância do cancro como causa de morbilidade e mortalidade não tem cessado de aumentar. Em 1960 a causa da morte por cancro era de 9% aumentando em 1998 para 20%, representando um quinto de todas as causas de morte. O cancro, como causa de morte, é mais importante nos homens (22%) do que nas mulheres (17%) tendo ocorrido entre 1988 e 1998, aumentos consideráveis da taxa de mortalidade por cancro da próstata, cólon e recto, pulmão, cavidade oral, linfoma não Hodgkin, mieloma múltiplo, rim e fígado, para o sexo masculino. No sexo feminino, e no mesmo período, a taxa de mortalidade baixou para o cancro do estômago e do útero, aumentando para o cancro do ovário, linfoma não Hodgkin, pulmão e do cólon e recto (Pinheiro *et al.*, 2002).

De todos os tipos de cancro os sarcomas das partes moles (SPM) são considerados de rara ocorrência no adulto (Pape *et al.*, 1992; Pollock, 1994; Calonje & Fletcher, 2000; Casparie *et al.*, 2001; Fletcher *et al.*, 2002a; Hasegawa *et al.*, 2002), sendo mais frequentes nas crianças, representando cerca de 6,5% das neoplasias em jovens de idade inferior a quinze anos, constituindo a quinta causa de morte por cancro, nesta faixa etária. As partes moles compreendem todos os tecidos extra-esqueléticos que suportam, delimitam e interrelacionam outras estruturas anatómicas. Estes tecidos constituem mais de 50% do peso corporal e incluem músculos e tendões assim como tecido adiposo, sinovial e fibroso (Lewis & Brennan, 1998). A maioria dos SPM têm origem na mesoderme, embora alguns sarcomas derivam da ectoderme e outros partilham algumas características epiteliais, como a expressão de filamentos intermédios do tipo citoqueratina (Folpe & Gown, 2001)

A etiologia destas neoplasias é desconhecida na maioria dos casos, parecendo surgir "*de novo*" sem qualquer causa aparente. No entanto em alguns casos foi possível associá-los a radiações, infecções víricas, deficiências imunológicas, factores genéticos e ambientais. Na literatura está descrita a sua localização próximo de cicatrizes, locais de fractura e implantes cirúrgicos (Huang & Mackillop, 2001; Weiss & Goldblum, 2001; Fletcher *et al.*, 2002a; Yoo *et al.*, 2002).

Os SPM, apesar de clinicamente semelhantes, constituem um grupo complexo e variado na observação microscópica, podendo evidenciar grande capacidade de diferenciação (Jensen *et al.*, 1998; Fletcher, 2000). O conceito de histogénese para estas neoplasias nem sempre está bem definido e salvo raras excepções, não existem evidências suficientes para considerar que estas lesões se originam a partir de tecidos bem diferenciados (Calonje & Fletcher, 1995; Fletcher, 2000). A constatação de que a maioria dos lipossarcomas ocorre em locais desprovidos de tecido adiposo, a maioria dos rabdomiossarcomas ocorre em locais desprovidos de tecido muscular esquelético, e a ocorrência de osteossarcomas extra-esqueléticos, ilustra este ponto de vista. O conceito da existência de uma célula mesenquimatosa primitiva, progenitora deste tipo neoplásico, parece academicamente conveniente, apesar de não existirem evidências deste tipo celular para além do estádio de embriogénese intra-uterina (Fletcher, 2000).

O estudo das neoplasias que ocorrem espontaneamente nos animais, quer de companhia quer nos de interesse pecuário, pode revelar-se de grande importância no estudo da complexa dinâmica do cancro. Os animais de companhia, em especial os citadinos, acabam por estabelecer ligações íntimas com os seus donos, partilhando no seu dia a dia de "agressões" comuns, tais como hábitos alimentares, exposição a agentes poluentes de diversa natureza, modos de vida e até, por vezes, estados de "stress" emocional. Para além disso, atingem maior longevidade, tendo maior probabilidade de apresentarem neoplasias durante a sua vida, constituindo por isso, modelo potencial de estudo comparado.

Os SPM aparecem com relativa frequência nos animais de companhia. Num estudo descritivo, realizado no Norte do nosso país, as neoplasias mesenquimatosas da pele e das partes moles representaram 29,9% de todas as neoplasias observadas no cão, logo a seguir ao cancro da mama (Pires *et al.*, 2003). Nos gatos, representam aproximadamente 7% de todas as neoplasias da pele e do tecido subcutâneo (Brown *et al.*, 1978; Pulley & Stannard, 1990; Mauldin, 1997; Ryan, 1998) ocorrendo variações de prevalência consoante o país (Bostock, 1986; Miller *et al.*, 1991). Nesta espécie, o fibrossarcoma constitui o tipo histológico mais comum (Brown *et al.*, 1978; Bostock & Dye, 1979; Hendrick & Goldschmidt, 1991; Hendrick *et al.*, 1992, Esplin *et al.*, 1993; Kass *et al.*, 1993; Hendrick & Brooks, 1994; Hendrick *et al.*, 1994b; Doddy *et al.*, 1996; Cronin *et al.*,. 1998; Hershey *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001; Madewell *et al.*, 2001; Couto *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2002). Classicamente, observam-se dois tipos distintos de apresentação clínica: a forma multicêntrica dos gatos jovens (geralmente

com menos de 4 anos de idade), causado pelo Vírus do Sarcoma Felino (FeSV), um Oncornavírus da família *Retroviridae*, e uma forma solitária tanto nos jovens como nos adultos, em que o FeSV não parece estar implicado (Snyder, 1969; Brown *et al.*, 1978; Hoover & Mullins, 1991; Pereira & Tavares, 1998).

Mais recentemente (em 1990), observou-se aumento dos sarcomas solitários em gatos de várias faixas etárias, na derme e no tecido subcutâneo, na porção dorsal do pescoço e na região interescapular (Hendrick & Goldschmidt, 1991). Estes sarcomas diferem das formas clássicas pela presença de infiltrado inflamatório peritumoral linfo-granulomatoso, semelhante ao descrito em reacções inflamatórias pós vacinais por Hendrick e Dunagan (1991). A partir de 1988 estes autores observaram aumento da incidência de reacções inflamatórias pós vacinais em gatos, associada à administração subcutânea e intramuscular de vacinas. Este facto coincidiu com a vacinação anti-rábica compulsiva obrigatória por lei no Estado Americano da Pensilvânia (1987), imposta devido ao aumento da raiva felina naquele Estado (Macy & Bergman, 1995). Para estes investigadores, os dois fenómenos estavam relacionados e em 1992, Hendrick e seus colaboradores, baseados em dados epidemiológicos, designaram estas neoplasias de "sarcomas pós vacinais", termo que ainda hoje é utilizado na literatura. Outros autores propuseram a designação de "Complexo fibrossarcoma felino" para englobar os diferentes subtipos histológicos de sarcomas, observados em locais anatómicos de administração de vacinas (Devauchelle *et al.*, 1997). Os protocolos de vacinação variam de acordo com a localização geográfica, mas essencialmente os gatos estão sujeitos à imunização para o Vírus da Raiva, Vírus da Leucemia Felina, Herpesvirus Felino tipo 1 (agente etiológico da rinotraqueíte felina), Calicivirus Felino, Parvovírus Felino (agente etiológico da panleucopénia) e Clamídia. Para além da vacinação, a inoculação parentérica de outras substâncias como a penicilina, metilprednisolona e lufenurona ou outros procedimentos terapêuticos, como a utilização de material de sutura, já foram associadas à formação dos sarcomas no gato (Gagnon, 2000; Cohen *et al.*, 2001).

Para alguns autores, os sarcomas em locais de vacinação têm origem em mecanismos oncogénicos diferentes dos observados para os sarcomas clássicos, constituindo uma entidade patológica distinta (Kass *et al.*, 1993; Hendrick *et al.*, 1994b; Doddy *et al.*, 1996). Nesta hipótese, a vacinação induziria a inflamação crónica com transformação neoplásica das células mesenquimatosas participantes no processo de reparação, os fibroblastos e miofibroblastos, fundamentando-se nos seguintes pressupostos (Hendrick & Dunagan, 1991; Hendrick & Goldschmidt, 1991; Dubielzig

et al., 1993; Esplin *et al.*, 1993; Kass *et al.*, 1993; Hendrick & Brooks, 1994; Hendrick *et al.*, 1994a; Hendrick *et al.*, 1994b; Doddy *et al.*, 1996; Macy & Hendrick, 1996; Schultze *et al.*, 1997):

- o aumento da frequência dos sarcomas do gato associado ao aumento de vacinações (sobretudo anti-rábica);
- aparecimento de sarcomas em gatos mais jovens e alteração das localizações anatómicas clássicas, cabeça e extremidades, que passaram a ser preferencialmente os locais de vacinação;
- o facto de não serem reconhecidos em países onde a vacinação para o FeLV (Vírus da Leucemia Felina) ou para a raiva não é utilizada regularmente, como o Japão, a Austrália, a Holanda, entre outros;
- o aumento da frequência de reacções inflamatórias pós vacinais (paniculite focal granulomatosa);
- a presença de tecido de granulação periférico, frequentemente associado a este tipo de lesões;
- a identificação de alumínio (utilizado como adjuvante vacinal) nas células macrofágicas;
- as características histopatológicas de maior malignidade, com comportamento biológico mais agressivo relativamente aos clássicos, recidivando mais frequentemente e por vezes metastizando.

Os mecanismos da carcinogénese associados às injecções, vacinais ou não, são complexos. A compreensão destes mecanismos é importante não só no que respeita ao problema de saúde felina, mas também pelas suas implicações na saúde humana. O FeLV é um retrovirus felino com grandes homologias com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). A forte associação destes sarcomas com a vacinação para o FeLV pode ser relevante no desenvolvimento e na utilização das vacinas contra o HIV em humanos (Hendrick *et al.*, 1994a; Hendrick, 1999). A informação obtida na investigação destes sarcomas no gato pode aumentar o conhecimento geral do papel dos carcinogénios e dos promotores de carcinogénese e podem especificamente contribuir para o desenvolvimento de vacinas apropriadas, implantes e próteses para uso na Medicina Veterinária e Humana (Hendrick *et al.*, 1994a; McNiel, 2001).

O componente da vacina que tem sido mais associado a reacções pós vacinais é o adjuvante vacinal (Hendrick *et al.*, 1992; Couto & Macy, 1998). Os únicos adjuvantes

vacinais aprovados para uso humano são os adjuvantes alumínicos (Eickhoff & Myers, 2002; Hunter, 2002), sendo largamente utilizados tanto em vacinas humanas como veterinárias. Estima-se que sejam utilizados em 20% das vacinas do gato (Hendrick & Brooks, 1994). Existem três tipos de adjuvantes vacinais contendo alumínio: Hidróxido de Alumínio, Alúmen (Sulfato de Potássio Alumínio) e Fosfato de Alumínio (Hogenesch, 2002).

Em Medicina Humana têm sido descritas várias reacções adversas às vacinas que contêm adjuvantes alumínicos. Tratam-se geralmente de reacções locais de fácil resolução clínica, como abcessos estéreis, eritemas, nódulos subcutâneos, inflamação granulomatosa e hipersensibilidade por contacto (Clements & Griffiths, 2002). Estão descritos sintomas de mialgia, atralgia e fadiga em pacientes que receberam vacinas contendo alumínio. Quando sujeitos a biópsias no músculo deltóide todos os pacientes revelaram imagens histopatológicas de miofascite macrofágica caracterizada por extensa infiltração macrofágica em torno das fibras musculares, com alguns linfócitos T CD8+. A maioria dos macrófagos continham estruturas cristalinas PAS positivas que foram subsequentemente identificadas como sais de alumínio (Brenner, 2002).

Em meados dos anos 80, antes do aumento da incidência dos sarcomas felinos, houve a introdução, no mercado veterinário, de vacinas mortas para a raiva e para a leucemia felina contendo alumínio como adjuvante, em substituição das vacinas vivas modificadas utilizadas até à data (Hendrick *et al.*, 1994b; Couto & Macy, 1998; Ryan, 1998; Madewell *et al.*, 2001). A maioria destas vacinas é monovalente e requere elevados teores de antigénio ou adjuvantes para produzir uma resposta imunológica mais eficaz. Embora mais potentes que as suas precedentes, são mais irritantes (Hendrick *et al.*, 1994b; Esplin *et al.*, 1996). Revisões histopatológicas de reacções inflamatórias pós vacinais e de fibrossarcomas em gatos revelaram focos bem demarcados de paniculite granulomatosa, com presença de linfócitos e macrófagos (Hendrick *et al.*, 1992). Dentro dos macrófagos, foi possível identificar a presença de material estranho composto por alumínio. Este composto poderá induzir reacções inflamatórias e imunológicas persistentes, causando reparação aberrante do tecido conjuntivo (Hendrick *et al.*, 1994b; Macy & Hendrick, 1996; Couto & Macy, 1998; Hendrick, 1998). Contudo, é possível que o alumínio seja simplesmente marcador do local de injecção, ou promotor da resposta inflamatória permitindo a acção de factores cocarcinogénicos, uma vez que, os sarcomas em local de vacinação continuam a ser

descritos após a introdução de vacinas livres de adjuvantes aluminícos (Kass *et al.*, 1993; Esplin *et al.*, 1993; Macy & Hendrick, 1996).

O conceito de carcinogénese associada a inflamação surgiu a partir do momento em que a infecção crónica, foi reconhecida como factor de risco, para o cancro humano (Ohshima & Bartsch, 1994). Infecções crónicas com o vírus da Hepatite B, parasitas e bactérias como o *Helicobacter pylori*, estão profundamente associadas ao cancro (Tiollais *et al.*, 1985; Rosin *et al.*, 1994; Houben & Stockbrugger, 1995). Os osteossarcomas foram relacionados com a presença de material de osteossíntese, os sarcomas do esófago com a presença do parasita *Spirocerca lupi* e os sarcomas oculares com traumatismos e presença de corpos estranhos persistentes (Harms & Mäusle, 1979; Woog *et al.*, 1983; Dubielzig, 1984; Ryu, 1987; Dubielzig *et al.* 1990; Hankanson *et al.*, 1990). Os sarcomas localizados em áreas anatómicas de vacinação apresentam características morfológicas e imunohistoquímicas semelhantes aos sarcomas oculares felinos pós traumáticos, com a participação de fibroblastos e miofibroblastos na reparação fibrosa durante o processo de cicatrização (Hankanson *et al.*, 1990; Dubielzig *et al.*, 1993, Hendrick *et al.*, 1994b). Estas células parecem estar envolvidas na formação do tecido reparador fibroso, que ocorre em inflamações crónicas, e participam provavelmente na produção da cápsula fibrosa, presente na maioria dos sarcomas felinos localizados em áreas anatómicas de vacinação. Podem estar envolvidas citoquinas libertadas pelas células inflamatórias, alteração nos factores de crescimento e os seus receptores, o Vírus do Sarcoma Felino (FeSV), oncogenes, genes supressores tumorais e genes envolvidos na apoptose (Hendrick & Brooks, 1994). Estes eventos, interrelacionados com as características genéticas do gato, produzirão efeitos mitogénicos e perda da homeostasia celular, aumentando a possibilidade de transformação neoplásica de células tão lábeis e heterógeneas como os miofibroblastos (Bergman, 1998; Hendrick, 1998a). Outros autores relacionam a carcinogénese com a libertação crónica de radicais livres oxidantes pelas células inflamatórias recrutadas para o local de injecção, os quais parecem participar em alterações importantes na molécula de ADN, a cronicidade do fenómeno conduziria à perda da capacidade das enzimas reparadoras do ADN (Doliger & Devauchelle, 1998).

A relação potencial entre um acto clínico e o aparecimento de neoplasias levantou um problema de saúde felina emergente, estabelecendo-se em Novembro de 1996 o grupo de estudo designado por "VAFSTF – Vaccine Associated Feline Sarcoma Task Force" composto pelos esforços conjuntos das entidades "AVMA- American

Veterinary Medical Association", "AAHA- American Animal Hospital Association" , "AAFP- American Association of Feline Practitioners" e "VCS- Veterinary Cancer Society" (Esplin,1997; Starr, 1998; Morrison & Starr, 2001). Em 1997 surgiu o grupo francês de estudo do fibrossarcoma felino, constituído por membros de dois grupos, o "GEO – Groupe d'Etude en Oncologie" e o "GEDAC – Groupe d'Etude e Dermatologie des Animaux de Compagnie", juntamente com o laboratório produtor de vacinas, Mérial (Devauchelle *et al.*, 1997). Os dois grupos propuseram-se a estudar mais profundamente a origem destes sarcomas e os seus aspectos epidemiológicos, etiológicos, imunológicos, genéticos, histológicos e terapêuticos (Esplin, 1997; Starr, 1998; Morrison & Starr, 2001; Devauchelle *et al.*, 1997).

O estudo dos sarcomas do gato constitui tema em aberto e apesar do empenho da comunidade científica veterinária a sua abordagem permanece delicada, tanto para o patologista, como para o clínico e proprietário. O acto de vacinação e os seus benefícios, na prevenção de doenças, assim como na defesa da saúde pública, não foram no entanto, colocados em causa, já que estes sarcomas ocorrem num baixo número de gatos quando comparado com o grande número de animais vacinados (Kass *et al.*, 1993).

Este trabalho não teve como objectivo principal o estudo da etiopatogenia dos sarcomas das partes moles no gato, pois compreendemos que são necessários estudos multidisciplinares concertados, mas pretende ser um contributo na pesquisa de factores de prognóstico e na compreensão da sua biopatologia, numa tentativa de aprofundar os conhecimentos das neoplasias animais, para além dos caracteres tradicionais de malignidade.

2- OBJECTIVOS

Através deste trabalho pretendemos contribuir para a clarificação dos seguintes aspectos:

1- Caracterização mais aprofundada dos sarcomas das partes moles no gato:

1.1- Estudar as variáveis clínicas dos animais portadores das neoplasias;

1.2- Estudar as características histopatológicas das neoplasias;

1.3- Estudar a distribuição de marcadores celulares nas células neoplásicas, filamentos intermédios e proteína S-100, através de técnicas de imunohistoquímica, auxiliando a classificação histopatológica;

1.4- Determinar o índice de proliferação tumoral pela expressão de um marcador específico, o PCNA;

1.5- Estudar a expressão do gene p53;

1.6- Caracterizar a ploidia de ADN das células neoplásicas, através da técnica de citometria de imagem.

2- Averiguação de possíveis associações entre os parâmetros estudados e a sobrevida, valorizando os factores que possam ter interesse prognóstico.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – AMOSTRAS

Neste trabalho estudaram-se sessenta e dois sarcomas das partes moles de gatos, recorrendo a amostras do arquivo histológico do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (n=58) e do Serviço de Histopatologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária-Delegação (n=4).

As neoplasias, diagnosticadas nos anos de 1999, 2000 e 2001, estavam disponíveis em blocos de parafina. Foram eliminadas do estudo todas as neoplasias cujas peças apresentavam tamanho insuficiente, limites periféricos mal definidos e localização anatómica incerta, pelo que as preparações histológicas utilizadas eram representativas do tumor, continham margens tumorais definidas e áreas de pele íntegra para posterior controlo interno.

A partir dos blocos de parafina, efectuaram-se cortes de 4 μm em micrótomo rotativo para o estudo histopatológico, histoquímico, imunohistoquímico e cortes de 6 μm para o estudo do conteúdo de ADN.

3.2-MÉTODOS

3.2.1- Dados clínicos

Os dados clínicos considerados, tais como a idade à data da primeira cirurgia, o sexo, a raça e a localização das neoplasias, descritas nas folhas de requisição para análise, foram confirmados com os clínicos assistentes por telefone. Foram também recolhidas informações sobre o historial de vacinação e a evidência de reacções pós vacinais.

3.2.2- Estudo da sobrevida

Os animais do estudo foram sujeitos a excisão cirúrgica para extirpação do tumor primário, sem tratamento adicional. Num dos casos, a recolha do tumor coincidiu com o acto de necrópsia. O seguimento clínico foi possível para cinquenta e um animais

e a data do final do estudo foi 31 de Dezembro de 2002. Foram registadas as datas da cirurgia, da primeira recidiva e a eventual data da morte eutanásica ou natural através de contacto telefónico com o clínico veterinário assistente. Quando alguma destas informações não estavam disponíveis, e sempre que possível, foram contactados os proprietários dos animais. Os resultados ambíguos ou incompletos foram eliminados do estudo. Estas informações foram utilizadas para a determinação dos seguintes parâmetros:

Tempo da primeira recidiva (TPR) ou tempo de sobrevida livre de doença – o intervalo de tempo (em dias) desde a data da primeira excisão até à data declarada da primeira recidiva;

Tempo de sobrevida total (TST) – o intervalo de tempo (em dias) desde a data da primeira excisão até à data da morte do animal ou à data final do estudo.

3.2.3- Estudo anatomopatológico

Para o estudo das características macroscópicas das neoplasias estudadas, foram consultados os registos do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa e do Serviço de Histopatologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária-Delegação, relativamente às características da superfície de corte e ao tamanho das neoplasias.

3.2.4- Estudo histopatológico

As preparações histológicas foram coradas pela coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E), pelo procedimento de rotina. Procedeu-se à avaliação histológica das neoplasias, determinação do grau histológico e à avaliação do infiltrado inflamatório.

3.2.4.1- Características histopatológicas

Foram avaliadas as seguintes características histopatológicas, para além da morfologia citonuclear das células neoplásicas:

Padrão de crescimento: Infiltrativo; Expansivo; Misto

Células neoplásicas multinucleadas: Presente/Ausente

Hemorragia: Presente/Ausente

Calcificação: Presente/Ausente

3.2.4.2- Graduação histológica

A graduação dos sarcomas foi realizada de acordo com um dos sistemas de graduação mais utilizados em Oncologia Humana, o sistema FNCLCC (French Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer) (Fletcher *et al.*, 2002a) que tem sido adaptada em Oncologia Veterinária (Couto *et al.*, 2002; Bettini *et al.*, 2003). O sistema FNCLCC baseia-se em pontuações obtidas pela avaliação de três parâmetros seleccionados a partir da análise multivariada de vários parâmetros histopatológicos: diferenciação tumoral, contagem de mitoses e a quantidade de necrose tumoral. É atribuída uma pontuação independente a cada parâmetro e o grau é obtido adicionando os três valores, como esquematizado na tabela 1. Consoante a sua pontuação no parâmetro "contagem de mitoses", as neoplasias foram categorizadas em índice mitótico (IM) 1, 2 e 3.

Diferenciação Tumoral:
Pontuação 1: Sarcomas compostos por células semelhantes ao tecido mesenquimatoso normal Pontuação 2: Sarcoma compostos por células pouco diferenciadas, mas com alguma semelhança com tecido mesenquimatoso normal Pontuação 3: Sarcomas embrionários, indiferenciados, sem semelhança com tecido mesenquimatoso normal
Contagem de Mitoses:
Pontuação 1: 0-9 Mitoses por 10 campos (400x), índice mitótico 1 Pontuação 2: 10-19 Mitoses por 10 campos (400x), índice mitótico 2 Pontuação 3: ≥20 Mitoses por 10 campos (400x), índice mitótico 3
Necrose Tumoral:
Pontuação 0: ausente Pontuação 1: <50% Necrose Pontuação 2: ≥ 50% Necrose
Grau Histológico:
Grau 1: Total pontuação: 2,3 **Grau 2: Total de pontuação: 4,5** **Grau 3: Total de pontuação: 6,7,8**

Tabela 1- Sistema de Graduação da FNCLCC: Definição de parâmetros (Adaptado de Fletcher *et al.*, 2002a).

3.2.4.3- Avaliação do infiltrado inflamatório

Quando presente, o infiltrado inflamatório intra e peritumoral foi avaliado em relação à sua intensidade, à sua distribuição e ao tipo celular constituinte. A intensidade do infiltrado foi avaliada pela observação dos agregados inflamatórios nos campos peritumorais em fraca ampliação (40x), tendo-se atribuído uma pontuação subjectiva, de acordo com a escala representada na tabela 2, à semelhança do realizado em outro estudo (Couto *et al.*, 2002).

Abundante (3)	Agregados ou folículos inflamatórios em mais de 50% dos campos peritumorais
Moderado (2)	Linfócitos difusamente distribuídos ou em pequenos folículos presentes em pelo menos 50% dos campos peritumorais
Baixo (1)	Baixa quantidade de linfócitos, com formação folicular mínima ou ausente
Negativo (0)	Ausência de infiltrado inflamatório

Tabela 2- Avaliação da intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório peritumoral (Adaptado de Couto *et al.*, 2002).

3.2.5- Estudo histoquímico

Neste trabalho foram avaliados os mucopolissacáridos em nove neoplasias com maior quantidade de estroma de natureza mixóide. Fizeram-se dois cortes de 4 µm em micrótomo rotativo e as preparações histológicas foram submetidas em simultâneo à coloração Azul Alcião, a pH 1 e a pH 2,5 utilizando um "kit" de coloração (Bioóptica, 161802). Os corantes alcião unem-se aos polianiões constituidos por radicais sulfúricos e carboxilicos dos mucopolissacáridos, só reagindo com as mucinas ácidas. Para o procedimento de coloração seguiram-se as indicações do fabricante.

3.2.6- Estudo imunohistoquímico

Neste trabalho utilizou-se a técnica de imunohistoquímica com o seguinte objectivo:

- Caracterização da expressão dos filamentos intermédios do citoesqueleto (vimentina, α-actina, desmina e citoqueratinas) e proteína S-100 das células neoplásicas;
- Determinação do índice de proliferação (IP) utilizando marcadores de proliferação, associados ao ciclo celular PCNA e Ki67;
- Avaliação da expressão da proteína p53;
- Determinação da densidade de microvascularização, utilizando um marcador das células endoteliais vasculares (anti-CD31);
- Caracterização dos subtipos de linfócitos do infiltrado inflamatório associado aos tumores, utilizando os anticorpos anti- CD3 e anti-CD20.

Os anticorpos utilizados são específicos para Medicina Humana e foram inicialmente testados numa das nossas amostras, para a verificação da existência de reacção cruzada no gato e para a determinação da diluição, dos tempos de incubação e dos pré-tratamentos mais adequados. O anticorpo monoclonal anti-CD31 (clone JC70, Dako, N1596) não apresentou imunorreactividade nas nossas amostras e o anticorpo anti-Ki67 (clone MIB-1, Dako, M7240) apresentou imunorreactividade de fraca intensidade, inviabilizando uma contagem segura, pelo que a metodologia descrita no ponto seguinte diz respeito à utilização de todos os outros anticorpos.

3.2.6.1-Metodologia

Foram efectuados cortes de 4 µm e colocados em lâminas revestidas em Poli-L-Lisina a 0,1% (Sigma).

Utilizou-se o método indirecto de Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC) usando como cromogéneo o Tetrahidrocloreto de 3´3 Diaminobenzina (DAB) para a maioria dos anticorpos, com excepção dos soros desmina e p53, em que o método indirecto Avidina-Biotina-Fosfatase Alcalina, com cromogéneo Fucsina, revelou redução considerável da marcação inespecífica, possibilitando assim, melhor interpretação dos

resultados. As incubações foram realizadas em câmara húmida e as lavagens foram efectuadas numa solução de Tampão Tris Salino (TBS).

Após terem sido desparafinados e hidratados, os cortes foram incubados durante 30 minutos numa solução aquosa de Peróxido de Hidrogénio a 3% (Merck) para a inibição da peróxidase endógena dos tecidos. Esta reacção foi bloqueada com água destilada sendo, no entanto, dispensada para os soros desmina e p53.

O tratamento térmico foi utilizado na recuperação antigénica, procedimento comum para todos os anticorpos. Os cortes foram colocados numa "cuvette" de plástico contendo Tampão Citrato de Sódio a 0,01 M (pH 6,0) e colocados em banho-maria a 99ºC durante 20 minutos. Em seguida foram arrefecidos, durante 20 minutos, e colocados em TBS.

Posteriormente para bloqueio de reacções inespecíficas, as preparações foram incubadas em soro normal, diluído a 1/5 em TBS. Utilizou-se soro normal de coelho (Dako, X0902) para os anticorpos monoclonais e soro normal de suíno (Dako, X0901) para os anticorpos policlonais. Seguiram-se as incubações com os anticorpos primários, de acordo com o descrito na tabela 3.

Após a exposição ao anticorpo primário, os cortes foram incubados durante 30 minutos com o anticorpo secundário biotinilado adequado, soro de coelho anti-ratinho (Dako, E0354) a diluído 1/400 (anticorpos monoclonais) ou soro de suíno anti-coelho (Dako, E0353) a diluído 1/500 (anticorpos policlonais).

Os cortes foram incubados 30 minutos com o soro complexo Avidina- Biotina-Peroxidase (Dako, K0377) para amplificar o reconhecimento dos epítopes e utilizou-se o cromógeneo Tetrahidrocloreto de 3'3 Diaminobenzidina (DAB) (Dako, K0391) durante 8 minutos para visualizar a reacção. A reacção foi interrompida com água destilada e as preparações foram contrastadas com Hematoxilina de Gill, durante 5 minutos, desidratadas, clarificadas e montadas com Entellan ® (Merck).

Nos soros desmina e p53, após a incubação com o anticorpo secundário biotinilado, os cortes foram incubados com o soro complexo Avidina-Biotina-Fosfatase Alcalina (Dako, K0391), durante 30 minutos e utilizou-se como cromógeneo, uma solução de Fucsina (Dako, K0624) e de Levamisole a 0,2mM, inibidor da fosfatase alcalina endógena (Dako, X3021), durante 8 minutos. A reacção foi interrompida com água destilada e as preparações foram contrastadas com Hematoxilina de Gill, durante 5 minutos e em seguida montadas em meio aquoso, glicergel (Dako, C0563)

Os estudos foram realizados para a totalidade da amostra para os soros vimentina, desmina, α-actina, proteína S-100 e PCNA. Devido à escassez de material histológico, a avaliação da expressão da p53 apenas foi possível em quarenta e oito neoplasias deste estudo. A citoqueratina 14 foi estudada apenas nos sarcomas localizados na mama (n=4) e a marcação dos anticorpos CD3 e CD20 foi avaliada em oito neoplasias, seleccionadas por possuírem infiltrado inflamatório abundante.

Anticorpo	Tipo	Referência	Diluição	Tempo de Incubação
Vimentina (Clone V9)	Monoclonal	Dako, M0725	1/50	60 minutos
Desmina (Clone D33)	Monoclonal	Dako, M0760	1/50	60 minutos
α-Actina de músculo liso (Clone 1A4)	Monoclonal	Dako, M0851	1/50	60 minutos
S-100	Policlonal	Dako, Z0311	1/200	60 minutos
Citoqueratina 14 (Clone LL002)	Monoclonal	Serotec, MCA890H	1/10	Durante a noite
CD3	Policlonal	Dako, A0452	1/50	60 minutos
CD20 (Clone L26)	Monoclonal	Dako, M0755	1/50	60 minutos
PCNA (Clone PC10)	Monoclonal	Dako, M0879	1/50	60 minutos
p53	Policlonal	Novocastra, NCL-CM1	1/1000	Durante a noite

Tabela 3- Anticorpos primários utilizados, diluições e tempos de exposição.

3.2.6.2- Lâminas de controlo

Controlo positivo:

Para os soros vimentina, desmina, α-actina, proteína S-100 e citoqueratina, utilizou-se um controlo interno, tendo-se avaliado a imunorreactividade específica em áreas de pele íntegra, músculo esquelético e nervos periféricos associados aos tumores.

Para o soro PCNA foi utilizado como controlo, um linfoma humano (Dako, T1058), para os anticorpos CD3 e CD20, amígdala humana (Dako, T1075) e para a proteína p53, um carcinoma da mama de gata positivo à proteína p53.

Controlo negativo:

As preparações foram submetidas ao procedimento habitual referido anteriormente, tendo-se substituído o anticorpo primário por TBS.

3.2.6.3- Métodos de interpretação

3.2.6.3.1- Métodos semi-quantitativos (vimentina, desmina, α-actina, proteína S-100 e citoqueratina 14)

Foi considerada imunorreactividade positiva quando a marcação ocorria no citoplasma das células neoplásicas, com excepção para a proteína S-100 em que a marcação nuclear também foi considerada, independentemente do grau de intensidade. Após a confirmação da marcação, a neoplasia foi observada em fraca ampliação (objectiva de 10x) e avaliada de acordo com a seguinte escala:

(-) - Marcação ausente
(+) - 0 a 25% células neoplásicas marcadas
(++) - 25 a 50% células neoplásicas marcadas
(+++) -≥ 50% células neoplásicas marcadas

3.2.6.3.2- Métodos quantitativos (PCNA e p53):

Foi considerada imunorreactividade positiva quando a marcação ocorria no núcleo das células neoplásicas, independentemente do grau de intensidade.

A quantificação da marcação foi realizada pela contagem de núcleos positivos em quinhentas células neoplásicas em cinco ou mais campos de grande ampliação (objectiva de 40x). Para efectuar a contagem recorremos ao auxílio do sistema de análise de imagem, Dp-Soft da Olympus (Labocontrole). Os valores obtidos foram expressos pela relação percentual das células marcadas e o número total de células. Consideramos índice de proliferação (IP) para o marcador de PCNA e índice de p53 (Ip53) para o marcador p53. As neoplasias foram consideradas com expressão de p53 quando revelavam valores de Ip53 superiores ou iguais a 10%, à semelhança de estudos realizados na mama da mulher (Krishnamurthy & Sneige, 2002).

3.2.6.3.3- Métodos qualitativos (CD3 e CD20):

Consideraram-se linfócitos T os linfócitos com marcação citoplasmática forte ao CD3 e linfócitos B os linfócitos com marcação citoplasmática forte ao CD20.

3.2.7- Classificação histológica

As neoplasias foram agrupadas em sarcomas miofibroblásticos, fibrossarcomas, mixofibrossarcomas, sarcomas com células gigantes, condrossarcomas mesenquimatosos extraesqueléticos, tumores malignos das bainhas nervosas, sarcoma rabdóide e lipossarcoma desdiferenciado, pelos critérios morfológicos observados e padrão imunofenótipico das células neoplásicas, com base na Classificação de Tumores das Partes Moles e Ósseos da Organização Mundial de Saúde (Fletcher *et al.*, 2002b).

3.2.8- Citometria de imagem

Os estudos da ploidia de ADN fornecem informações mais precisas do comportamento biológico dos tumores e têm sido cada vez mais utilizados na obtenção de informação com validade prognóstica (Siitonen *et al.*, 1993; Seigneurim *et al.*, 1994). Recorremos à técnica de citometria de imagem, pois possibilita a análise de material de arquivo, permitindo ao operador uma monitorização activa, na selecção das células e na rejeição de artefactos (Pape *et al.*, 1992; Mitchie *et al.*, 1994).

3.2.8.1- Metodologia

Foram efectuados cortes de 6 µm de espessura para lâminas revestidas em Poli-L-Lisina (Sigma) de quarenta e sete neoplasias do estudo e procedeu-se à coloração de Feulgen utilizando o "kit" de coloração "CAS DNA" (Becton Dickinson, Cell Analysis Sistems, Emhurst, III). A coloração de Feulgen é específica para o ADN nuclear, produz uma coloração azul que reflecte a ligação estequiométrica do corante ao ADN nuclear, resultando numa intensidade de coloração, proporcional à quantidade de ADN (Martinez- Nistal *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 2001; Haroske *et al.*, 2001).

Todo o procedimento foi realizado de acordo com as indicações do fabricante. Em cada banho de coloração foi incluída uma lâmina de hepatócitos de rato para calibração do aparelho e controlo externo da coloração. Após desparafinação e hidratação, as preparações histológicas, juntamente com uma lâmina de calibração, foram submetidas a hidrólise numa solução de Ácido Clorídrico 5N (Merck) durante 60 minutos, transferidas para a "solução de coloração" onde ficaram a incubar 60 minutos

após os quais foram submetidas a três passagens sucessivas pela "solução de lavagem". Seguiram-se a diferenciação em Álcool Ácido a 1%, desidratação e montagem com Entellan® (Merck). As preparações histológicas foram guardadas ao abrigo da luz até posterior leitura.

3.2.8.2- Quantificação do conteúdo de ADN nuclear

A quantificação e interpretação dos resultados foi efectuada no sistema de análise de imagem CAS 200® (Cell Analysis Sistems, Inc., Elmhurst, III) através do programa "Quantitative DNA Analysis 3.0). Este programa permite medir o conteúdo de ADN nuclear em cortes de tecidos e estabelecer a correcção entre o conteúdo de ADN de um núcleo individual com a espessura do corte. Uma vez quantificado, o conteúdo de ADN foi expresso em "unidades c", onde o "c" representa "conteúdo" e a ploidia foi determinada como "ploidia de ADN" para diferenciá-la claramente da contagem cromossómica obtida pelas técnicas de citogenética (Chieco & Derenzini, 1999).

Após a calibração do aparelho com a lâmina de hepatócitos de rato, procedemos à análise das preparações histológicas das neoplasias em estudo. Analisamos em cada lâmina o valor médio de ADN de um número mínimo de vinte linfócitos peritumorais. Os linfócitos funcionam como controlo interno da ploidia de ADN, constituindo a população de células de referência para definir o conteúdo de ADN diplóide (2c). A análise do conteúdo de ADN das células neoplásicas foi realizada através da leitura no mínimo de cem núcleos bem preservados, evitando-se os sobrepostos, destruídos ou marginais (Bacus *et al.*, 1993; van Velthoven *et al.*, 1995a; Reeder *et al.*, 1997).

Os resultados da análise de citometria de imagem são apresentados sob a forma de histogramas de ADN, representando a distribuição da população celular em função da intensidade da coloração do ADN nuclear. Através da análise dos histogramas foram avaliados os seguintes parâmetros: a ploidia de ADN, índice de ADN (IA), percentagem de células com teor de ADN superior a 2,5c, 5c e 9c.

Na interpretação dos histogramas de ADN consideramos os seguintes parâmetros:

População de células de referência: população de células não neoplásicas com conteúdo de ADN conhecido, funciona como garantia de controlo e da reprodutibilidade

da análise e permite estabelecer o pico diplóide (Wied *et al.*, 1989; Hardisson *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994).

População diplóide ou euplóide (2n ou 2c): população com conteúdo de ADN considerado normal e idêntico ao das células de referência para uma determinada espécie (Orfao *et al.*, 1993; Stöckle *et al.*, 1993; Wheless *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994).

População aneuplóide: população ou clone celular com conteúdo de ADN anormal, como tal, diferente da população celular diplóide de referência (Wheeless *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994).

Na análise dos histogramas de ADN de cada neoplasia identificamos o pico G_0/G_1 e calculamos o IA, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV).

O IA representa a razão do valor médio de conteúdo de ADN da população de células em estudo nas fases G_0/G_1 e a média do conteúdo de ADN das células diplóides normais nas mesmas fases. Células com conteúdo diplóide apresentam índice de ADN igual a 1, enquanto que populações celulares aneuplóides podem apresentar conteúdos de ADN variáveis (Bacus *et al.*, 1993; Orfao *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Epp *et al.*, 1996).

O CV do pico G0/G1 da população de referência é uma medida de precisão que expressa a variabilidade da população celular estudada, servindo como controlo de qualidade dos estudos citométricos realizados (Orfao *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994). Definimos a região diplóide de ADN como o conteúdo de ADN compreendido entre os valores de IA médio da população de referência ± 2 desvios padrões. As neoplasias que apresentavam pico $G0/G_1$ com IA médio compreendido na região diplóide foram classificadas como diplóides de ADN. Por sua vez aquelas cujos picos $G0/G_1$ se localizavam fora desta região, foram classificadas como aneuplóides de ADN (Raju *et al.*, 1993).

Avaliamos também a percentagem de células com conteúdo de ADN superior a 2,5c, 5c e 9c. As células com conteúdo de ADN superior a 2,5c poderão corresponder a células em proliferação enquanto que as células com valor de ADN superior a 5c indicam núcleos verdadeiramente aneuplóides. A população de células com conteúdo de ADN superior a 9c representa núcleos aneuplóides, muito aberrantes e com conteúdo de ADN muito elevado (Auer *et al.*, 1980).

3.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em frequências absolutas e relativas (percentagens) e para as variáveis numéricas foi calculada a média, desvio padrão, mediana e valores mínimo e máximo.

As variáveis contínuas foram estudadas através dos testes t de Student ou ANOVA. Quando necessário, as variáveis foram categorizadas, utilizando a média como valor "cut off" nas variáveis numéricas.

A sobrevida global foi calculada pelo método de Kaplan-Meyer. Os dados foram censurados quando os gatos estavam vivos no final do estudo. A associação da sobrevida com os diferentes parâmetros clínico-patológicos e citométricos foi estudada através do teste de log Rank.

As associações encontradas foram consideradas significativas para valores de $p<0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- ESTUDO DOS ANIMAIS PORTADORES DAS NEOPLASIAS

4.1.1- Dados clínicos

No nosso estudo utilizamos sessenta e dois gatos, com idades compreendidas entre os oito meses e os vinte anos, à data da cirurgia, sendo a média de idade de 8,9 anos (desvio padrão=2,9). As neoplasias ocorreram em trinta e dois machos (51,6%) e trinta fêmeas (48,4%). A raça Europeu Comum foi a predominante, 49 gatos (79,0%), estando também representadas as raças Siamesa (14,5 %, n= 9), Persa (4,9%, n=3) e Bosque da Noruega (1,6%, n=1).

4.1.2- Localização das neoplasias

Todos os animais apresentavam neoformações cutâneas, distribuídas em diferentes áreas anatómicas (Figura 1), incluindo as regiões: tóracica-dorso lateral (56,5%, n=35), interescapular (12,9%, n=8), dorso cervico-costal (3,2%, n=2), hipocôndrio (11,3%, n=7), mama (6,5%, n=4), membro (3,2%, n=2), axila (1,6%, n=1), sacro (3,2%, n=2) e zona inguinal (1,6%, n=1). Para facilitar o tratamento de dados consideramos que as regiões tóracica-dorso lateral, interescapular, dorso cervico-costal e hipocondrica, como parede costal (PC) representando 83,9% (n=52) das localizações neoplásicas observadas.

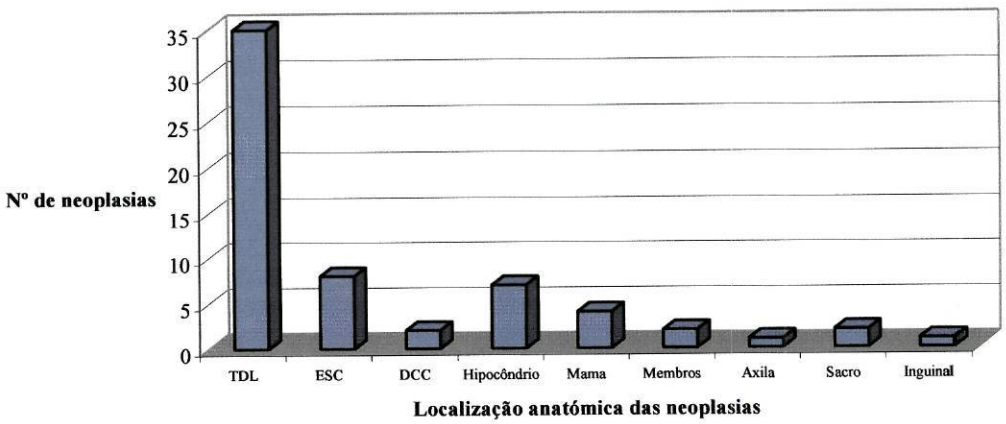


Figura 1 – Distribuição anatómica das neoplasias observadas.

Legenda: TDL- Tóracica dorso-lateral; ESC- Interescapular; DCC- Dorso cervico-costal

4.1.3- Estudo da sobrevida

O estudo da sobrevida foi baseado nos registos clínicos de cinquenta e um gatos, 82,3% dos animais em estudo. Foram descartados, deste estudo, oito animais, por impossibilidade de acesso à sua ficha clínica, dois por abandono das consultas sem que tivesse havido possibilidade de contactar os proprietários e um cuja colheita da neoplasia coincidiu com o acto de necrópsia, num total de onze animais.

Apesar de doze casos (23,5%) apresentarem historial de vacinação confirmada, não ocorreram registos clínicos de reacções pós vacinais. Estavam disponíveis testes serológicos para o FeLV em quatro animais do estudo (7,8%) cujos resultados foram negativos.

Quatro animais apresentaram evidências clínicas de metástases (7,8%), recorrendo à consulta com estado de saúde precário, apresentando dispneia intensa, e houve confirmação radiográfica em dois casos. Um gato apresentou linfadenopatia inguinal.

O valor da mediana do tempo de sobrevida total foi de 277 dias (9 meses), variando de 19 dias a 1263 dias (42 meses). No final do estudo treze animais permaneciam vivos (25,5%), tendo-se censurado as datas de final do estudo. Dois destes casos apresentaram tempos de sobrevida superiores a 1000 dias (Fig. 2).

Após a primeira excisão cirúrgica sete gatos não apresentaram recidivas, um gato apresentou uma recidiva e os restantes apresentaram várias, tendo sido submetidos a sucessivas intervenções cirúrgicas (de três a dezasseis cirurgias). No final do estudo o total de animais mortos foi de trinta e oito (74,5%). As recidivas foram observadas em quarenta e quatro casos (86,3%) e o tempo mediano do seu aparecimento foi de 198 dias (6,6 meses) variando entre 19 a 515 dias. Apenas três animais apresentaram tempos de primeira recidiva superiores a um ano.

4.2- ESTUDO DAS NEOPLASIAS

4.2.1- Exame anatomopatológico

As neoplasias observadas variavam, de pequenas lesões solitárias (0,5 cm) a neoplasias de grandes dimensões (9 cm), por vezes multinodulares. Ao corte apresentavam consistência dura, cor branca e frequentemente áreas de aspecto necrótico.

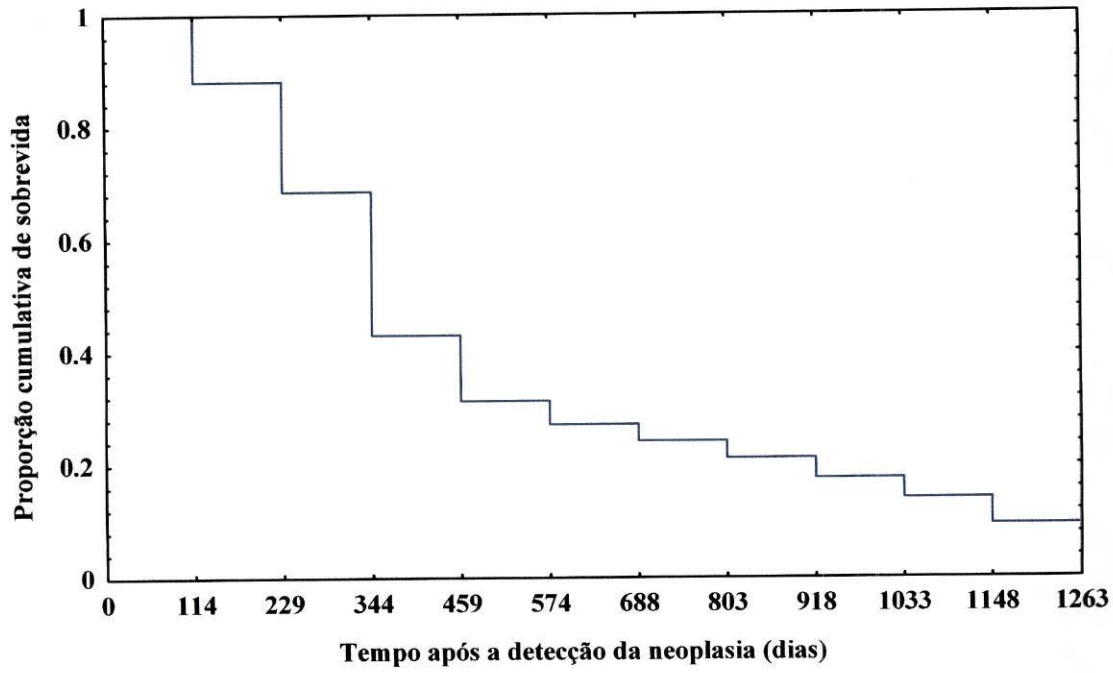


Figura 2- Proporção de sobrevida de cinquenta e um gatos com sarcomas das partes moles.

4.2.2- Exame microscópico

Os sarcomas das partes moles dos gatos foram agrupados em sete tipos histológicos, encontrando-se sumariados na tabela 4. Os tipos histológicos estão caracterizados relativamente às variáveis clinico-patológicas nas tabelas 11 e 12 (em Anexos).

Tipo histológico	**TOTAL n (%)**
A- Sarcoma miofibroblástico (SM)	28 (45,2)
B- Fibrossarcoma (FSA)	10 (16,1)
C- Mixofibrossarcoma (MFSA)	9 (14,5)
D- Sarcoma com células gigantes (SCG)	8 (12,9)
E- Condrossarcoma mesenquimatoso extra-esquelético (CME)	3 (4,2)
F- Tumor maligno das bainhas nervosas (TMBN)	2 (3,2)
G- Sarcoma rabdóide (SRD)	1 (1,6)
H- Lipossarcoma desdiferenciado (LPSA)	1 (1,6)
TOTAL	**62 (100)**

Tabela 4- Classificação histológica dos sarcomas observados.

A - Sarcoma miofibroblástico (SM)

O tipo histológico mais observado foi o sarcoma miofibroblástico, num total de vinte e oito neoplasias. A maioria destas neoplasias estava localizada na parede costal (89,3%, n=25) estando as restantes localizadas na glândula mamária (10,7%, n=3).

Estas neoplasias caracterizaram-se por apresentar células fusiformes miofibroblásticas, dispostas em feixes multidireccionais (Fig. 3), acentuada densidade celular e padrão de crescimento predominantemente infiltrativo (78,6%, n=22). Apresentaram-se fracamente delimitadas por uma fina cápsula de tecido conjuntivo, tendo sido observado padrão de crescimento misto em quatro casos (14,3%) e crescimento expansivo em dois casos (7,1%).

As células caracterizaram-se pela presença de citoplasma escasso, mal definido, frequentemente vacuolizado, núcleos ovóides a fusóides, com cromatina disposta à periferia e de aspecto grumoso. A heterocromasia e multinucleolação foram fenómenos frequentemente observados. A actividade mitótica era em geral, muito elevada, tendo-se observado índice mitótico (IM) 3 em 82,1% das neoplasias deste tipo histológico, por vezes com figuras atípicas. Em cinco neoplasias (17,6%) observou-se a presença de células gigantes mononucleares, com macronúcleos, assumindo formas bizarras (Fig.3). Onze casos (39,3%) apresentaram focos de células neoplásicas bi e multinucleadas. Em duas neoplasias foi possível observar a presença de áreas de matriz do tipo mixóide.

Em duas lesões, foi possível observar espaços císticos, contendo material hialino, ocorrendo, numa delas, rarefacção da área central da lesão com afastamento das células neoplásicas, formando uma cavidade intratumoral.

Foram frequentemente observadas áreas de necrose (78,6%, n=22) e com menor frequência calcificação focal (7,1%, n=2) e hemorragia (28,6%, n=8) (Fig.3). Doze neoplasias (42,9%) apresentaram infiltração linfocitária intratumoral.

As células neoplásicas revelaram imunorreactividade difusa com os marcadores vimentina e α–actina de músculo liso (Fig. 4 e 5). A maioria das neoplasias revelou ausência de imunorreactividade para o marcador desmina (Fig 6), à excepção de duas onde ocorreu marcação focal.

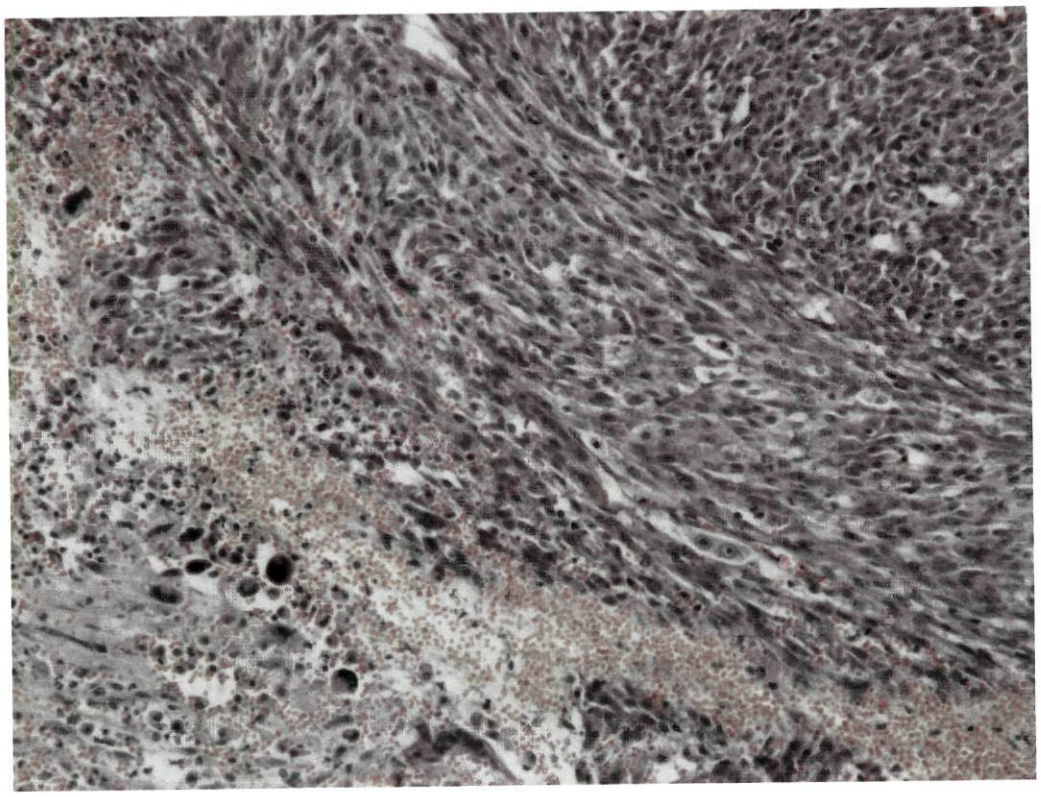


Figura 3- SM. Feixes multidireccionais de células neoplásicas fusiformes. Anisocitose e hemorragia. H&E.100x.

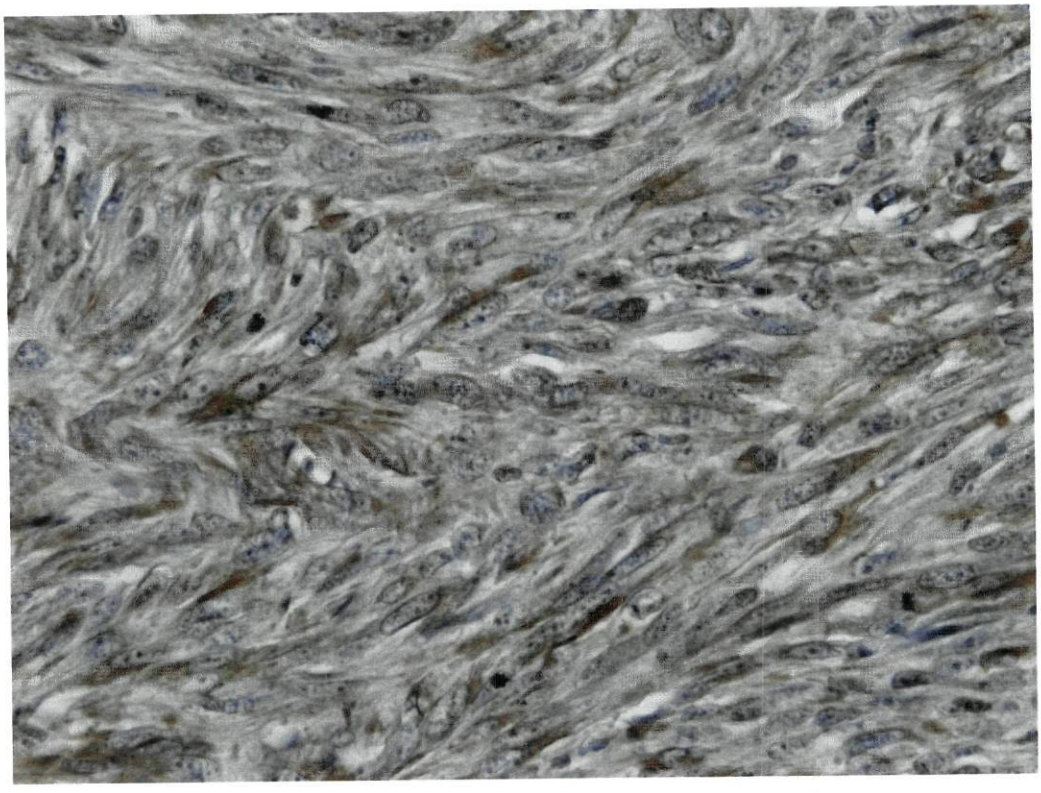


Figura 4- SM. Padrão de marcação difuso para a vimentina. ABComplex-HRP, 200x.

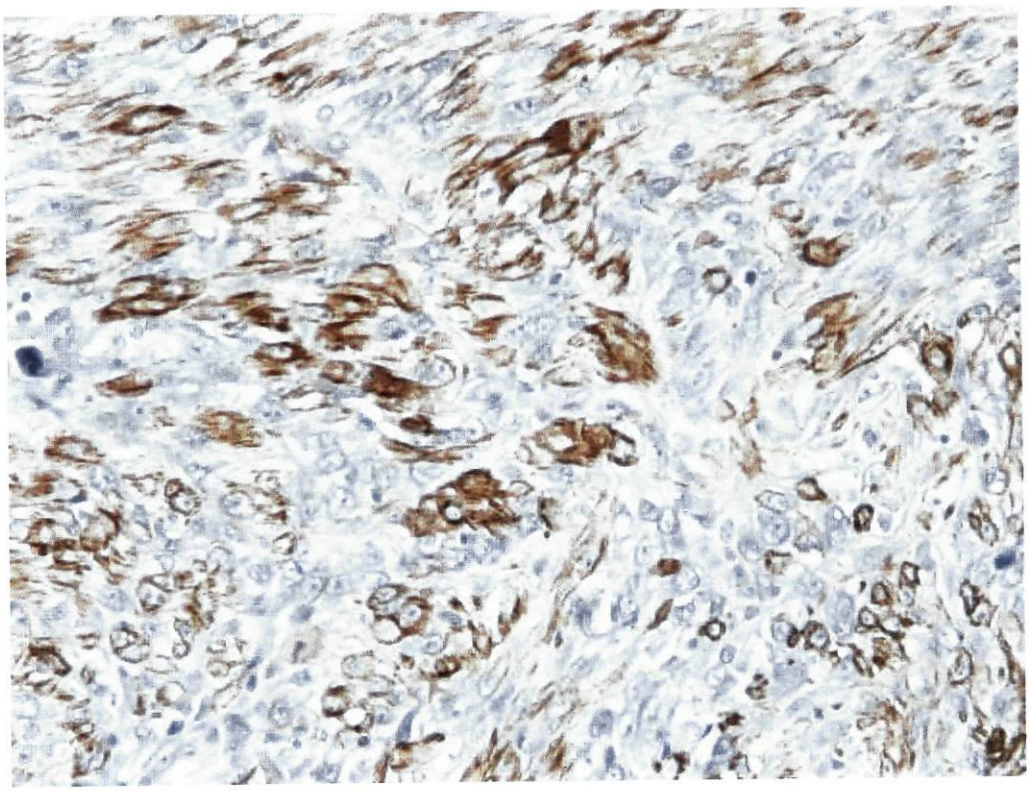


Figura 5- SM. Padrão de marcação difuso para a α - actina. ABComplex-HRP, 200x.

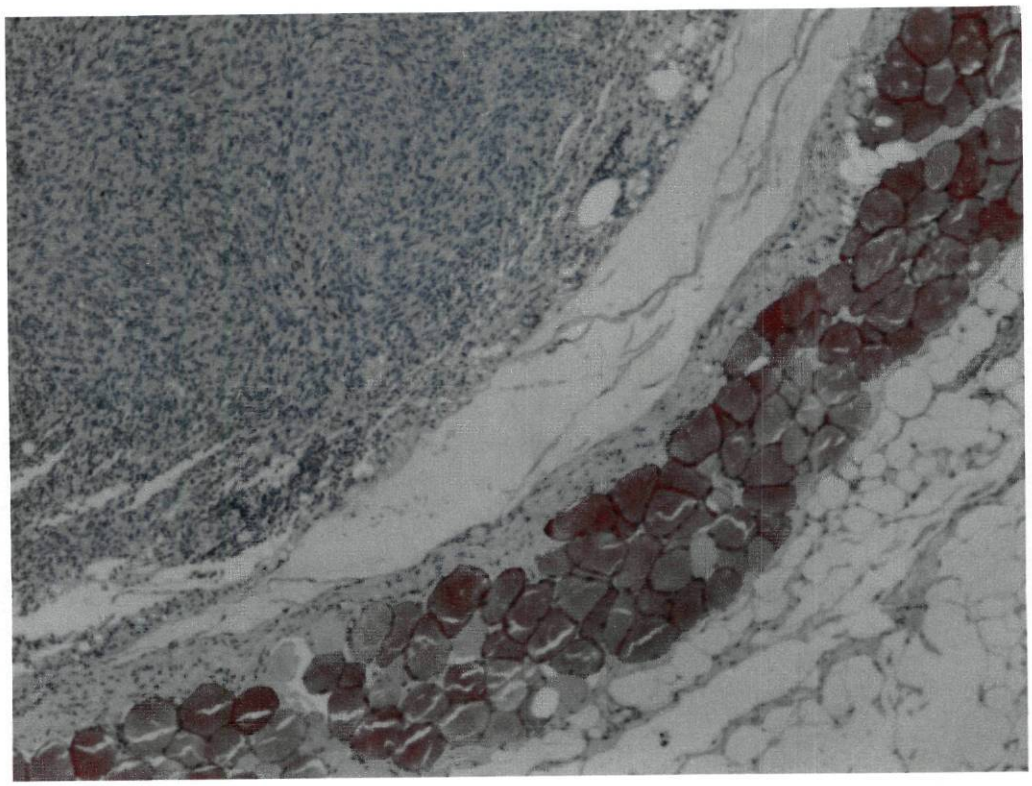


Figura 6- SM. Ausência de expressão ao antigénio desmina pelas células neoplásicas. ABComplex-FA, 40x.

B - Fibrossarcoma (FSA)

Dos dez fibrossarcomas observados, sete (70%) estavam localizados na derme da parede costal e os restantes na derme nas regiões sagrada, mamária e muscular no membro posterior.

As neoplasias observadas caracterizaram-se por apresentarem células fusiformes organizadas em fascículos multidireccionais, dispostas em "espinha de peixe", com estroma de colagénio, discreto a moderado, padrão de crescimento infiltrativo, com invasão e dissociação dos tecidos vizinhos (Fig.7 e 8).

As células apresentaram núcleos escuros fusóides a ovóides, com vários e proeminentes nucleólos, por vezes acidófilos, citoplasma escasso e frequentemente vacuolizado. O pleomorfismo celular foi mais evidente em duas neoplasias, com padrão de células redondas, por vezes bi e multinucleadas. As lesões apresentavam, geralmente, elevada densidade celular mas em três casos foi possível observar células neoplásicas mais dispersas, de forma estrelada a poligonal e áreas focais de estroma mixóide. A actividade mitótica era elevada, 90% apresentaram índice mitótico 3 e com figuras atípicas frequentes.

Foi observada necrose na maioria das neoplasias (90%, n=9).

As células neoplásicas revelaram imunorreactividade, de padrão difuso para o marcador anti-vimentina. Em seis neoplasias (60%), foi possível identificar baixo número de células miofibroblásticas, dispersas, cujo fenótipo foi, maioritariamente, vimentina/ α-actina (VA), tendo ocorrido numa neoplasia o fenótipo vimentina/ desmina (VD).

C - Mixofibrossarcoma (MFSA)

Foram observadas nove neoplasias fibroblásticas malignas, com localização na parede costal, caracterizadas pela presença de estroma de natureza mixóide, moderado a abundante, acentuado pleomorfismo citonuclear, com presença de proeminentes vasos sanguíneos, de paredes finas com condensação perivascular radial de células tumorais, assumindo padrão vascular curvilinear, característico (Fig. 9 e 10). Três lesões apresentavam nódulos múltiplos e as restantes apresentavam-se divididas por finos septos, incompletos, de tecido conjuntivo.

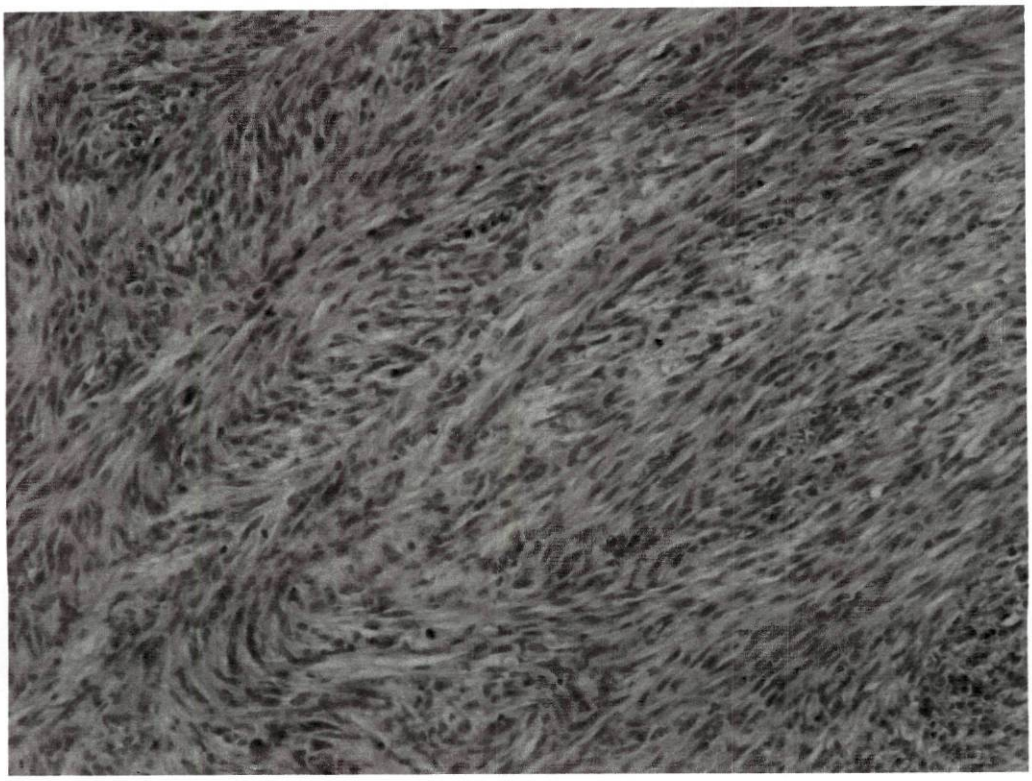


Figura 7- FSA. Feixes multidireccionais de células neoplásicas fusiformes. H&E.100x.

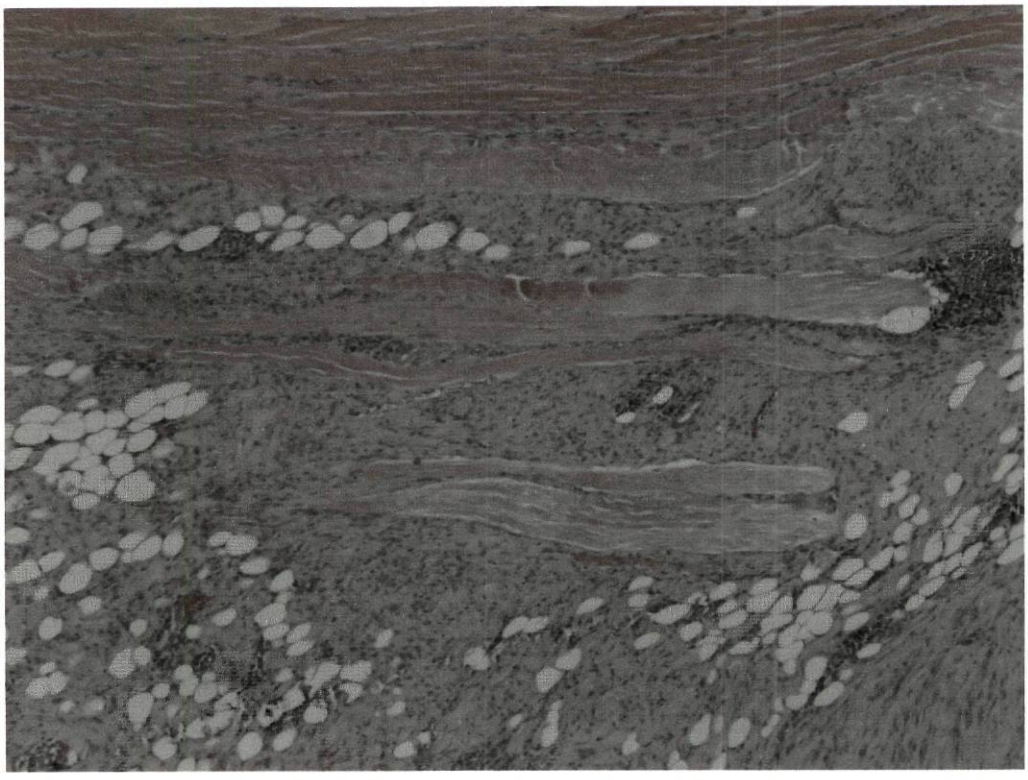


Figura 8- FSA. Padrão de crescimento infiltrativo com invasão e dissociação de fibras musculares esqueléticas e tecido adiposo. H&E.100x.

As células neoplásicas variavam de fusiformes a estreladas, com citoplasma claro, separadas por estroma variável de mucina, predominantemente composta por mucopolissacáridos ácidos. A anisocitose e a anisocariose foram fenómenos frequentes, com presença de núcleos de formas bizarras e de células binucleadas. Três neoplasias (33,3%) apresentaram focos de células neoplásicas multinucleadas. A celularidade destas lesões foi variável. Geralmente apresentaram áreas focais de elevada densidade celular que alternavam com outras áreas hipocelulares, em que as células neoplásicas estavam dispostas perpendicularmente a finos septos de tecido conjuntivo, com produção de mucina, para o centro da lesão, em geral necrosado.

As mitoses foram frequentemente observadas, por vezes com características de atípia acentuada, apresentando índice mitótico 3 em 88,9% das neoplasias deste tipo histológico.

Cinco neoplasias (55,6%) apresentaram padrão de crescimento expansivo, duas apresentaram crescimento infiltrativo (22,2%) e nas restantes foi possível observar invasão apenas numa pequena área, pelo que foram consideradas de crescimento misto (22,2%).

As células neoplásicas apresentaram marcação, num padrão difuso, ao anticorpo anti-vimentina. A marcação focal, com o anticorpo anti-α-actina, ocorreu em três neoplasias (33,3%), pressupondo diferenciação miofibroblástica focal.

D - Sarcoma com células gigantes (SCG)

Em oito das neoplasias, da série em estudo, observamos a presença de uma proeminente reacção estromal de células gigantes multinucleadas (CGM), do tipo osteoclasto, num substrato de células fusiformes, de núcleos ovóides a redondos (Fig. 11). Seis neoplasias (75%) estavam localizadas na parede costal, estando as restantes localizadas nas zonas axilar e inguinal.

Estas lesões apresentaram-se fracamente delimitadas por uma cápsula de miofibroblastos, tendo sido possível observar, em iguais proporções quer o padrão de crescimento infiltrativo quer o expansivo. As mitoses observadas eram frequentemente atípicas, e todas as neoplasias deste grupo revelaram índice mitótico 3.

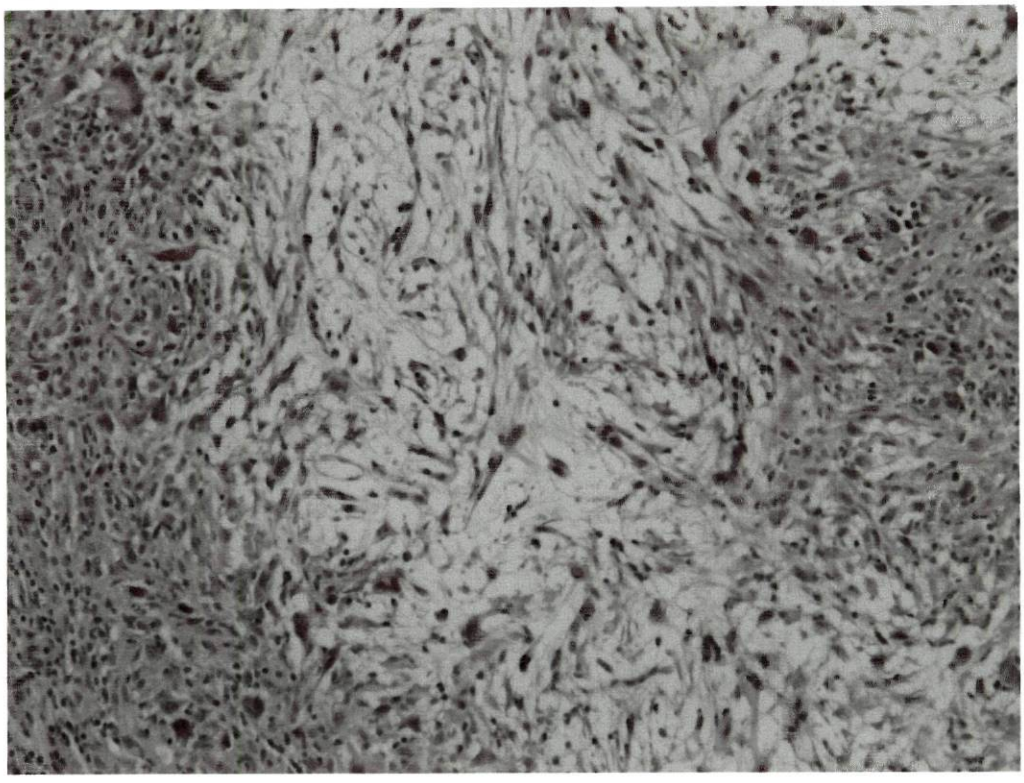


Figura 9- MFSA. Estroma mixóide moderado. Anisocitose e anisocariose das células neoplásicas. H&E.100x.

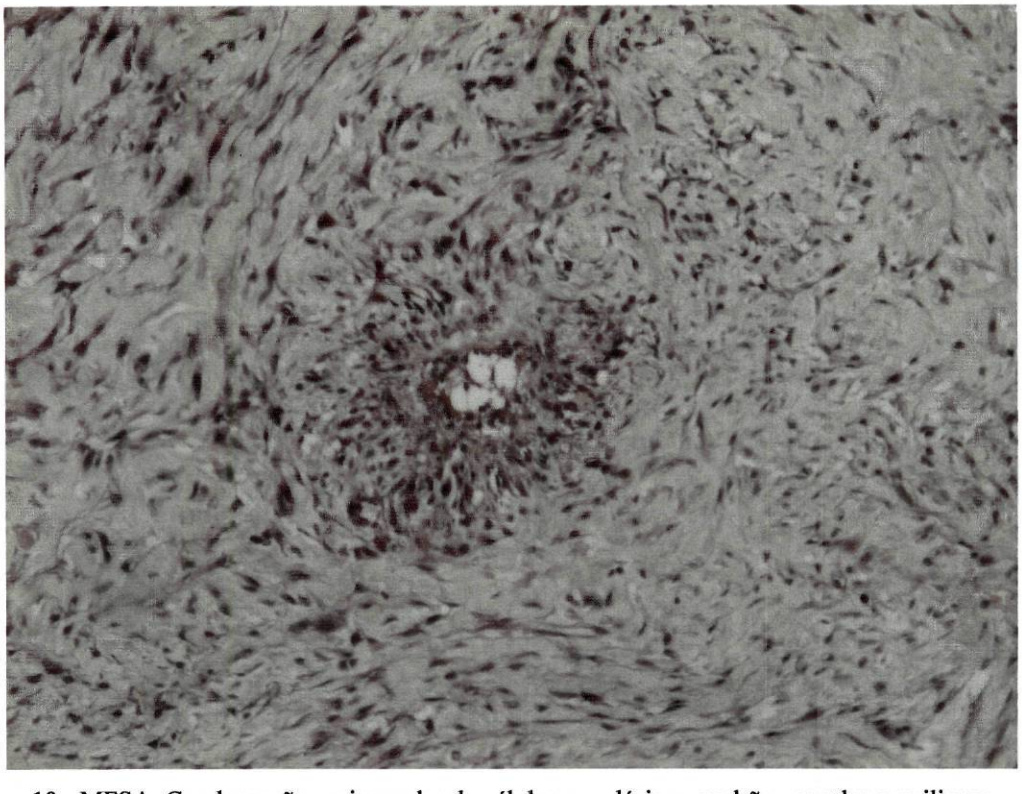


Figura 10- MFSA. Condensação perivascular de células neoplásicas- padrão vascular curvilinear. H&E.100x.

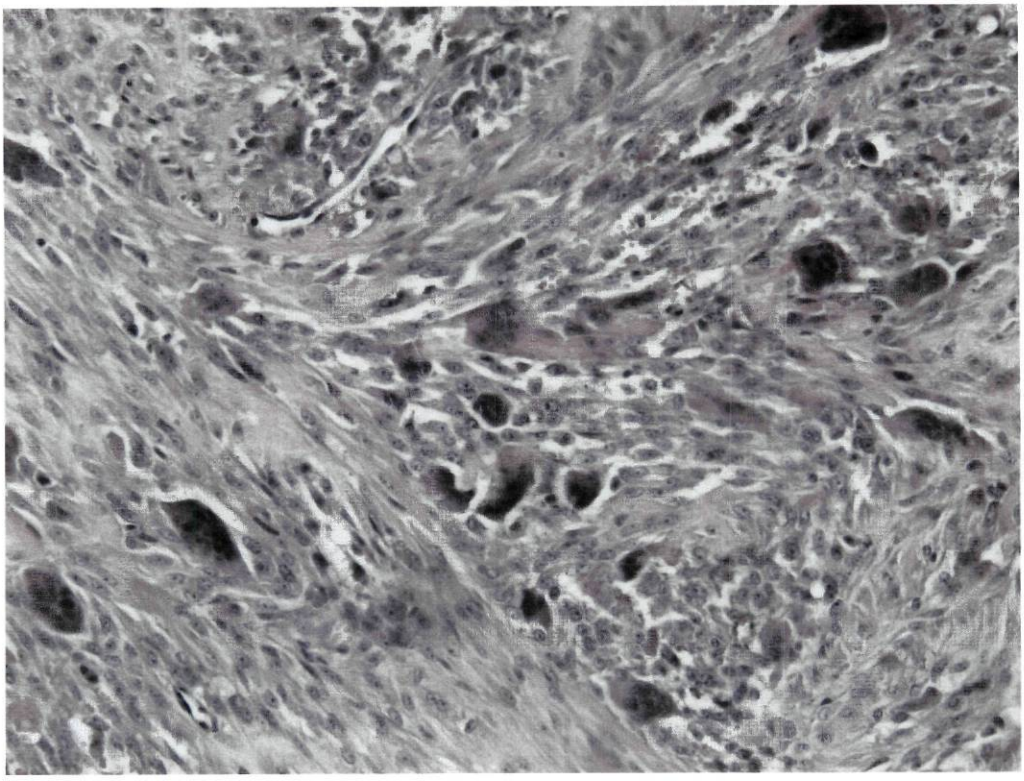


Figura 11- SCG. Células gigantes multinucleadas do tipo ostoclasto. H&E.100x.

Em todas as neoplasias foi possível observar vacuolização intracitoplasmática nas células neoplásicas e nas CGM (Fig. 13). No geral, estas lesões apresentaram acentuada celularidade, com estroma colagenoso a variavelmente seroso, por vezes assumindo aspectos de pequenas locas intratumorais de líquido seroso acumulado (n=4, 50%). Numa neoplasia foi possível observar estroma de natureza mixóide. A necrose ocorreu em 50% das neoplasias deste grupo e 75% (n=6) das amostras revelaram áreas de acentuada congestão, hemorragia e depósitos de hemosiderina (Fig. 12 e 13).

As células neoplásicas revelaram imunorreactividade difusa para o marcador anti-vimentina e em seis neoplasias (75%) ocorreu imunorreactividade para o anticorpo anti-α-actina, pressupondo diferenciação miofibroblástica. As CGM apresentaram imunorreactividade ao anticorpo anti-vimentina, mas não apresentaram imunorreactividade aos soros desmina, α-actina e proteína S-100.

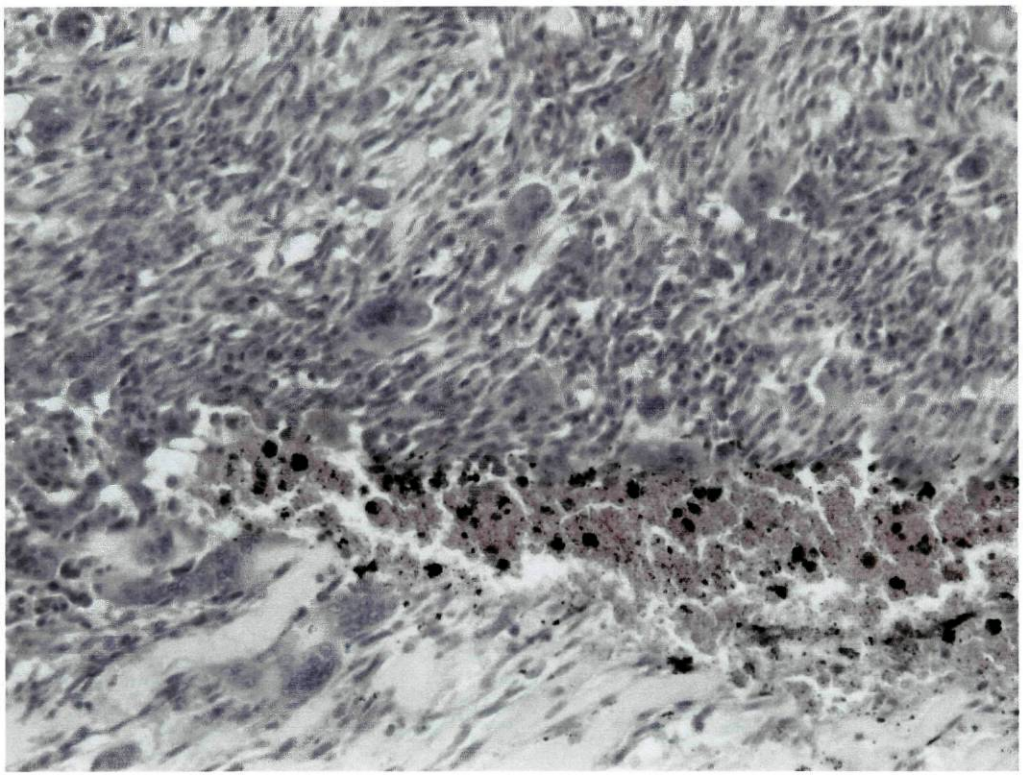


Figura 12- SCG-.Focos de hemorragia e depósitos de hemosiderina.H&E,100x.

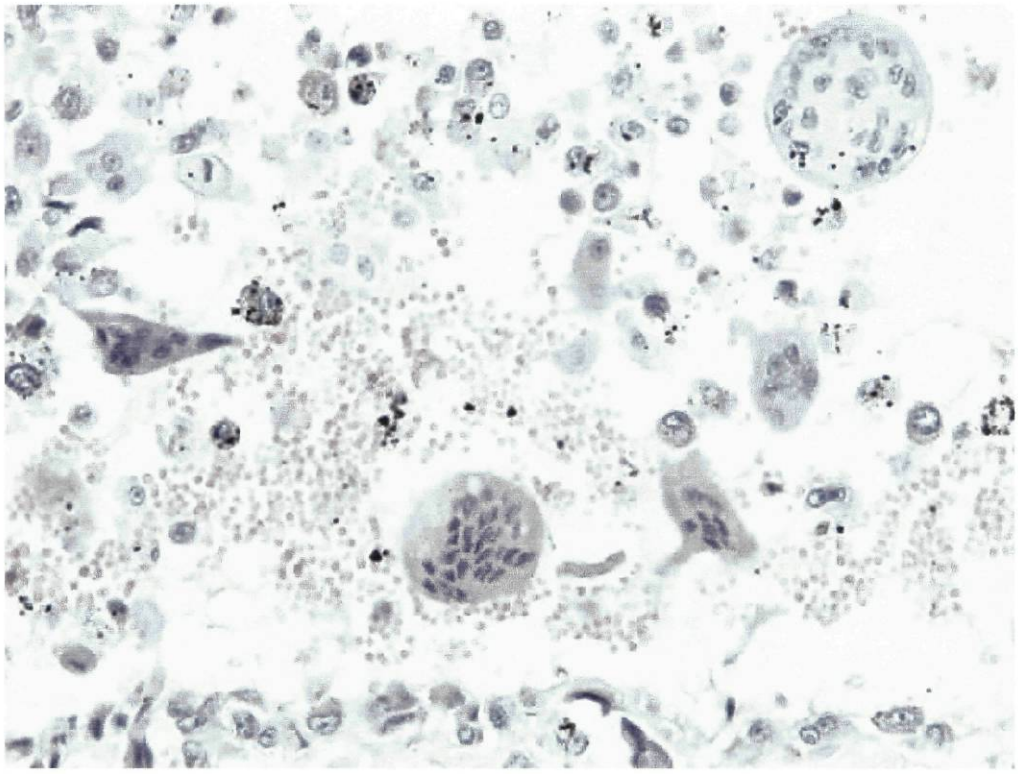


Figura 13- SCG- Presença de vacúolos intracitoplasmáticos, hemorragia e depósitos de hemosiderina. H&E,200x.

E - Condrossarcoma mesenquimatoso extra-esquelético (CME)

Três neoplasias subcutâneas eram caracterizadas pela presença de células pequenas indiferenciadas misturadas em ilhotas de cartilagem hialina. Duas neoplasias estavam localizadas na parede costal e uma na região sagrada.

As neoplasias apresentavam nódulos múltiplos e estavam aparentemente delimitadas por uma cápsula de miofibroblastos. A cartilagem ocupava a quase totalidade da massa neoplásica, ocorrendo calcificação focal em duas neoplasias. O componente de células pequenas apresentava grande actividade mitótica (66,7% das neoplasias do grupo revelaram IM 3). Foi possível observar vacúolos intracitoplasmáticos, núcleos de forma redonda a fusiforme, com pelo menos um nucléolo proeminente e cromatina grumosa. A necrose foi observada em todas as lesões, apresentando-se mais extensa nas lesões localizadas na parede costal e assumindo aspecto hialino numa delas. Observaram-se padrões de crescimento do tipo expansivo (66,7%) e misto (33,3%).

O componente de células pequenas dos CME revelou imunorreactividade difusa aos soros vimentina e focal aos soros α-actina e proteína S-100. As células de diferenciação condróide foram imunorreactivas ao anticorpo anti-proteína S-100 e anti-vimentina.

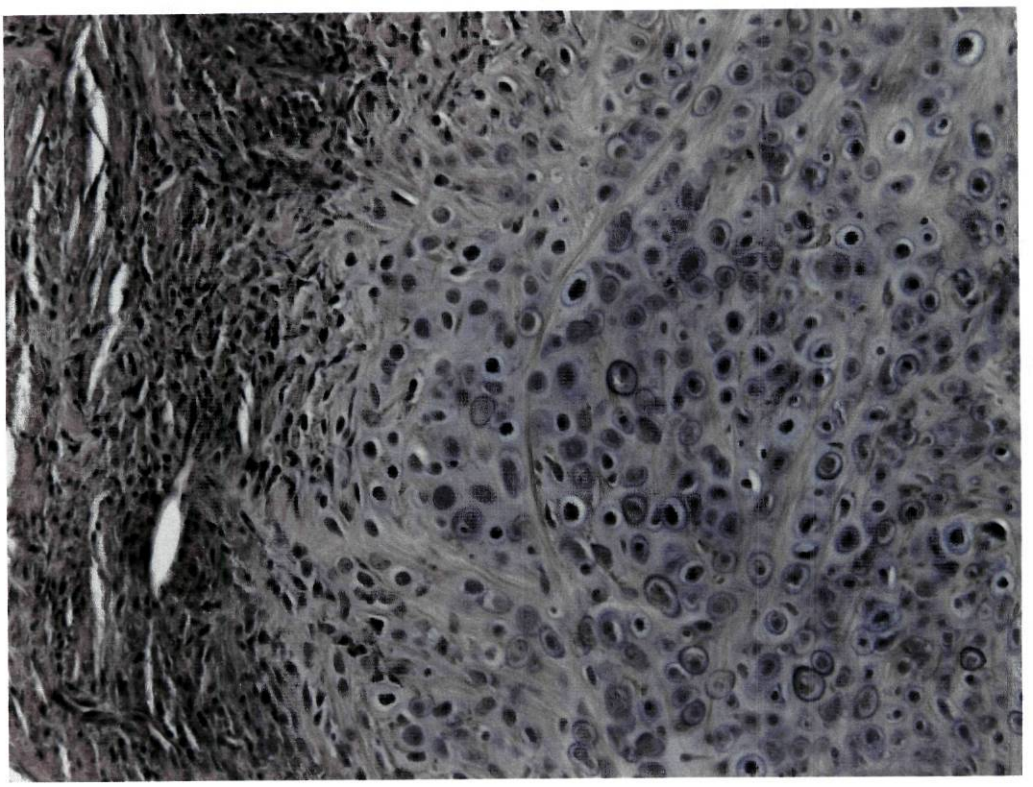


Figura 14-CME. Ilhotas de cartilagem hialina. H&E, 200x.

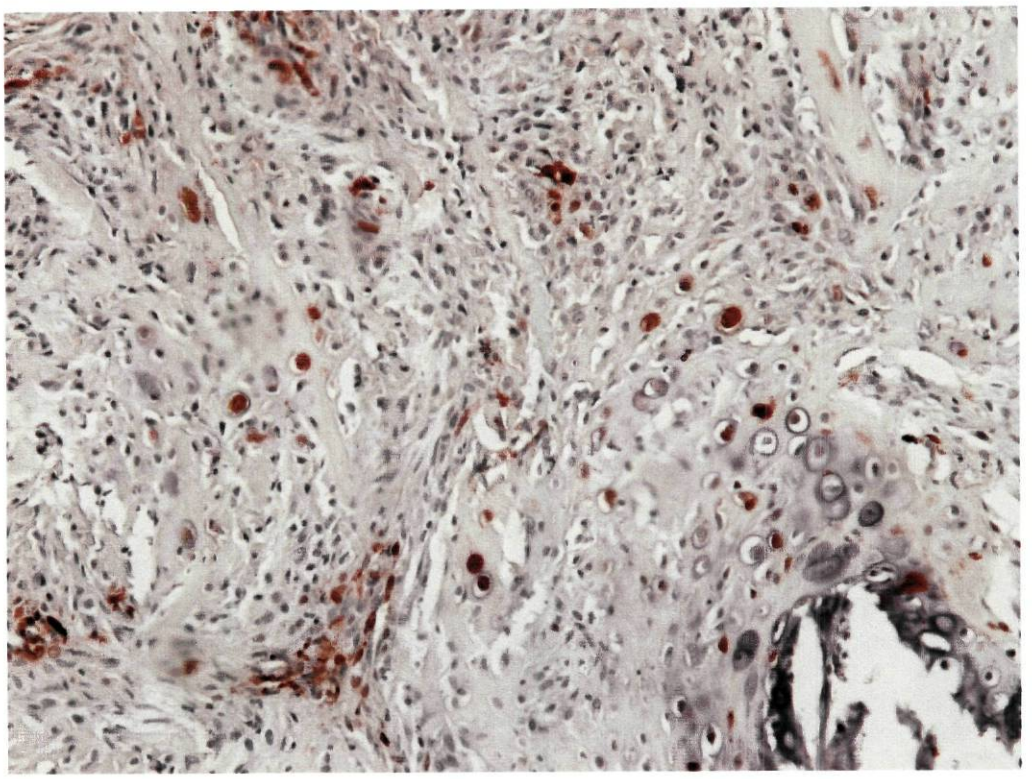


Figura 15- CME. Imunorreactividade ao marcador proteína S-100. Intensa marcação das células de diferenciação condróide. ABComplex-HRP, 100X

F – Tumor maligno das bainhas nervosas (TMBN)

Duas neoplasias caracterizaram-se pela presença de fascículos multidireccionais de células fusiformes pequenas, ocasionalmente justapostas em paliçada (Fig.16). Uma das neoplasias localizava-se no membro posterior e estava intimamente relacionada com a presença de nervos periféricos. A outra estava localizada na parede costal e apresentava anisocariose acentuada, com presença de núcleos, com formas bizarras e frequentemente células multinucleadas. Em ambas, ocorreram focos hemorrágicos e necrose. As mitoses foram frequentes (IM 3) e o padrão de crescimento observado foi do tipo infiltrativo.

As células neoplásicas revelaram imunorreactividade difusa ao anticorpo anti-vimentina e ao anticorpo anti-proteína S-100 (Fig.17).

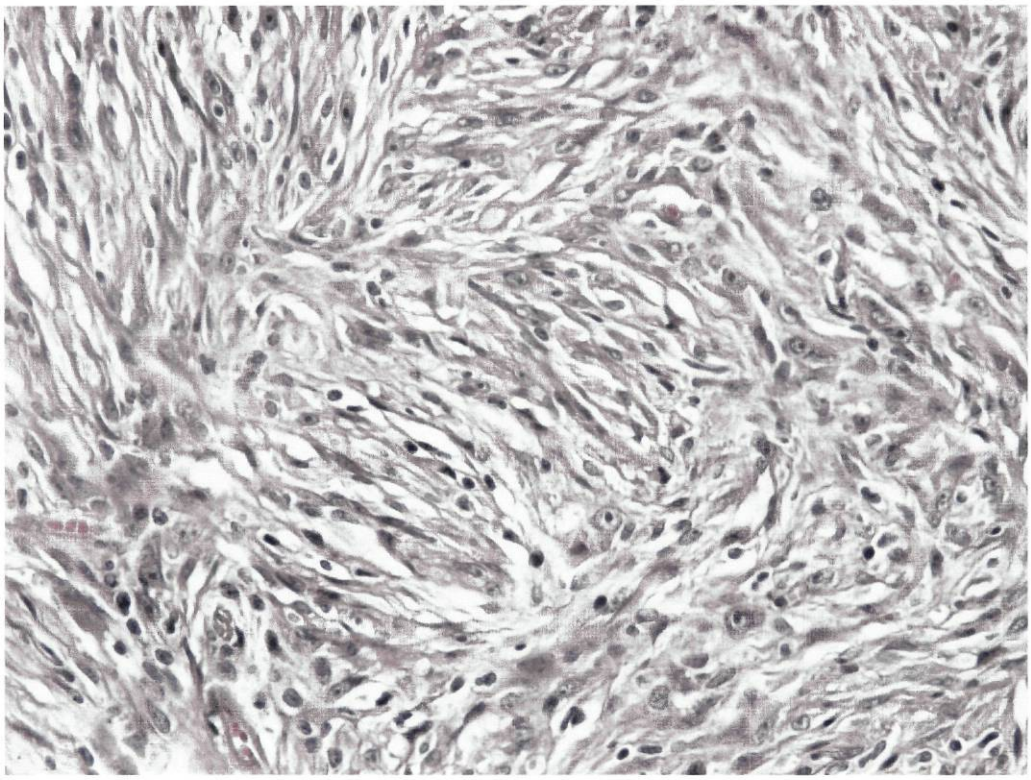


Figura 16- TMBN. Células neoplásicas justapostas em paliçada. H&E.100x

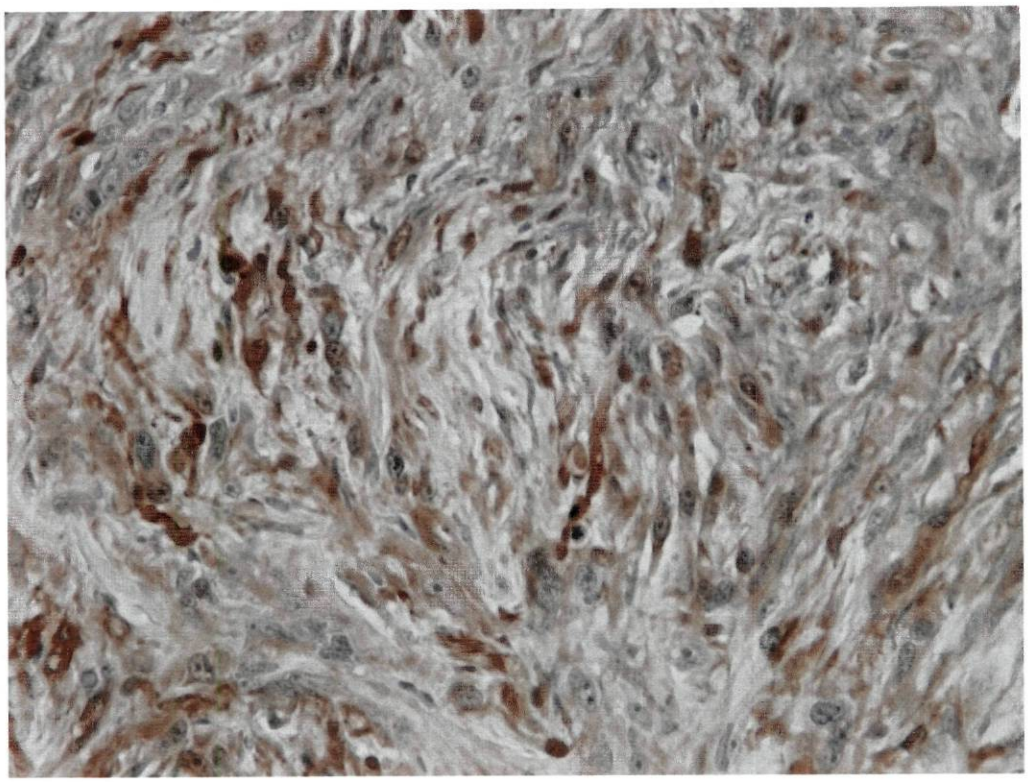


Figura 17- TMBN. Imunorreactividade ao marcador proteína S-100. ABComplex-HRP, 100X

G - Sarcoma rabdóide (SRB)

Uma neoplasia, localizada na região torácica dorso lateral, no tecido subcutâneo era caracterizada pela presença de células redondas, com citoplasma claro e abundante, com um ou dois núcleos, encostados à periferia, revelando pleomorfismo citonuclear elevado e índice mitótico 3 (Fig. 18). As células expressaram antigénio vimentina (Fig. 19) e α-actina, sendo negativas à desmina e à proteína S-100. Foram observadas extensas áreas de necrose e de hemorragia bem como áreas focais de acumulação de uma substância de características hialinas. Esta lesão apresentava-se fracamente encapsulada e o padrão de crescimento observado foi do tipo expansivo.

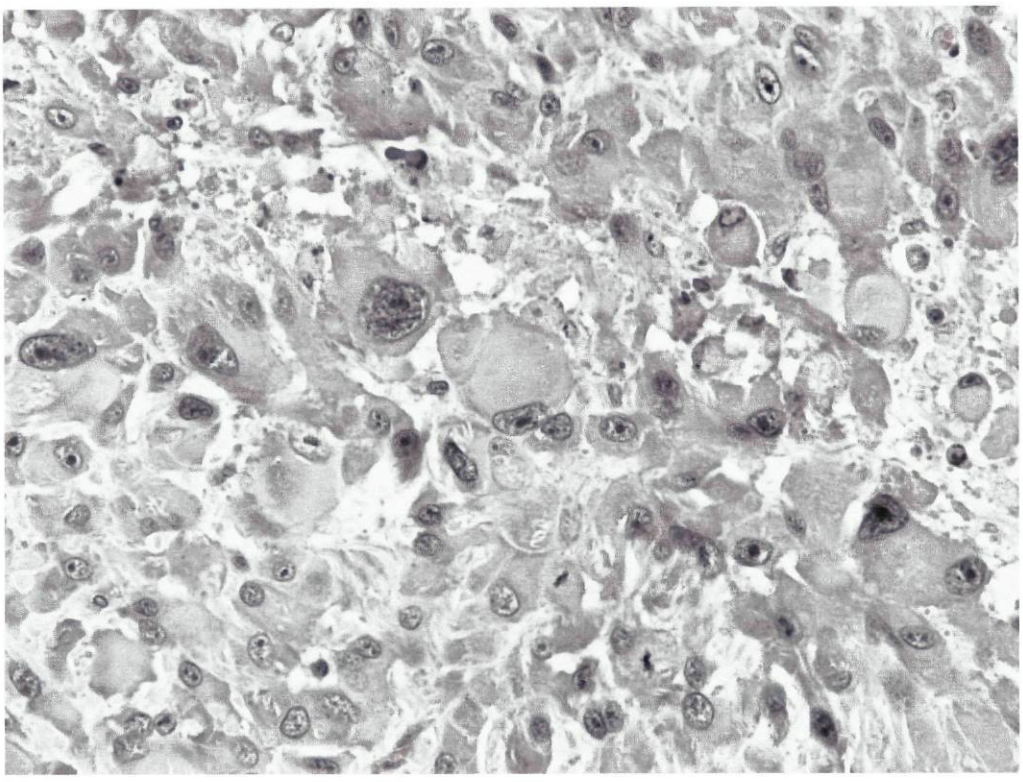


Figura 18- SRB. Células neoplásicas redondas de acentuada anisocitose e anisocariose. H&E.200x

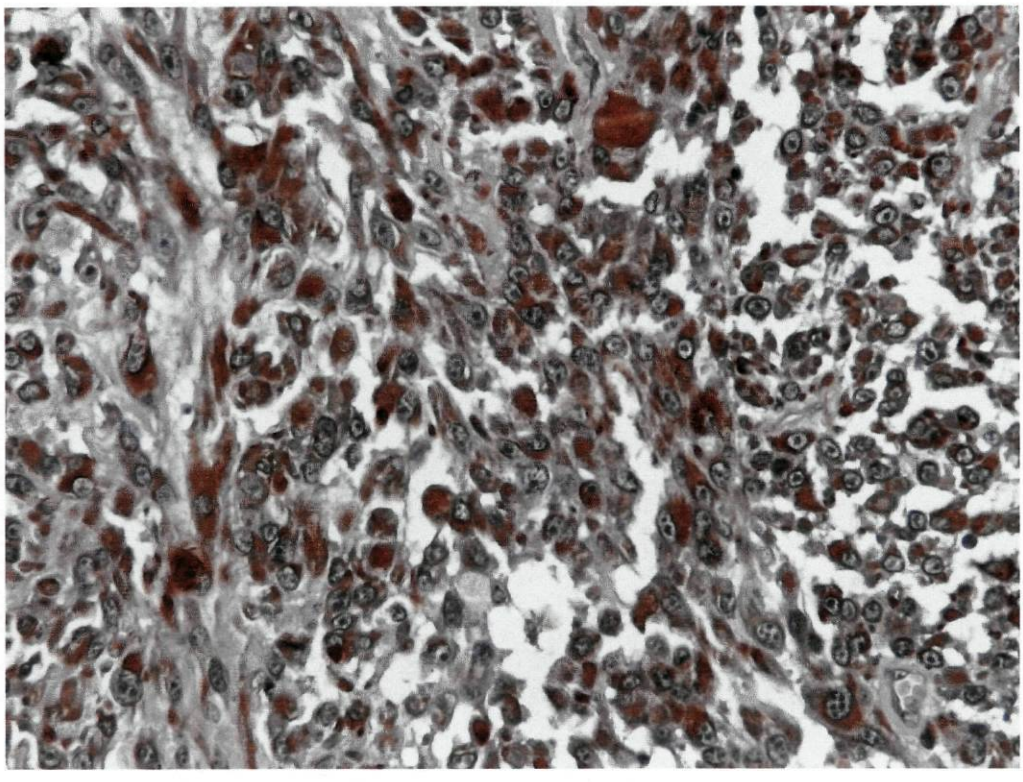


Figura 19- SRB. Imunorreactividade ao marcador vimentina. Intensa marcação citoplasmática. ABComplex-HRP, 200X

H - Lipossarcoma desdiferenciado (LPSA)

Neoplasia localizada na região torácica dorso lateral, no tecido subcutâneo caracterizada por possuir celularidade intratumoral variável, assim apresentava uma área demarcada de células fusiformes, de elevada celularidade, com crescimento infiltrativo e dissociação das fibras musculares esqueléticas adjacentes e outras áreas menos densas, de matriz do tipo mixóide, com células de características fusiformes a poligonais (Fig.20). As células poligonais dispersas na matriz possuíam por vezes vacúolos lipídicos múltiplos e de variados tamanhos, que deformavam as células e indentavam o núcleo, revelando diferenciação no sentido do lipoblasto (Fig.21 e 22). O pleomorfismo citonuclear foi bastante acentuado, com presença de células neoplásicas multinucleadas e apresentava índice mitótico 3. Foi possível identificar áreas de necrose e de calcificação focal.

As células neoplásicas com diferenciação lipoblástica foram imunorreactivas ao marcador proteína S-100 (Fig. 22).

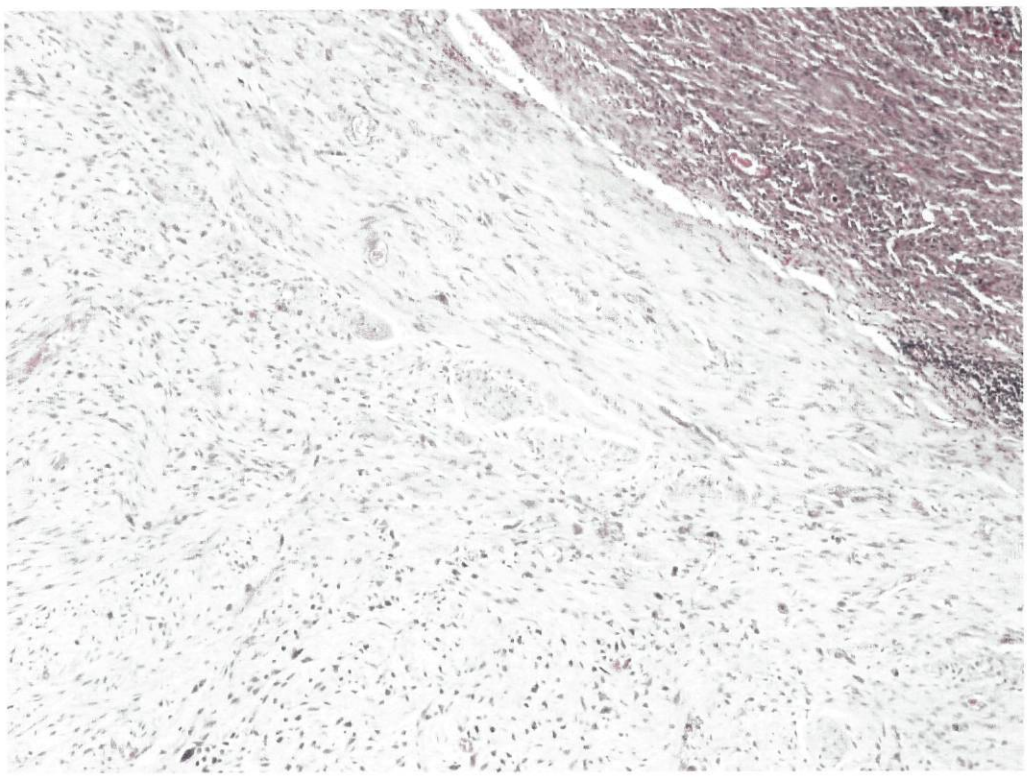


Figura 20- LPSA. Transição entre uma área de elevada celularidade e outra área menos densa, de matriz do tipo mixóide, com células de características fusiformes a poligonais. H&E.40x.

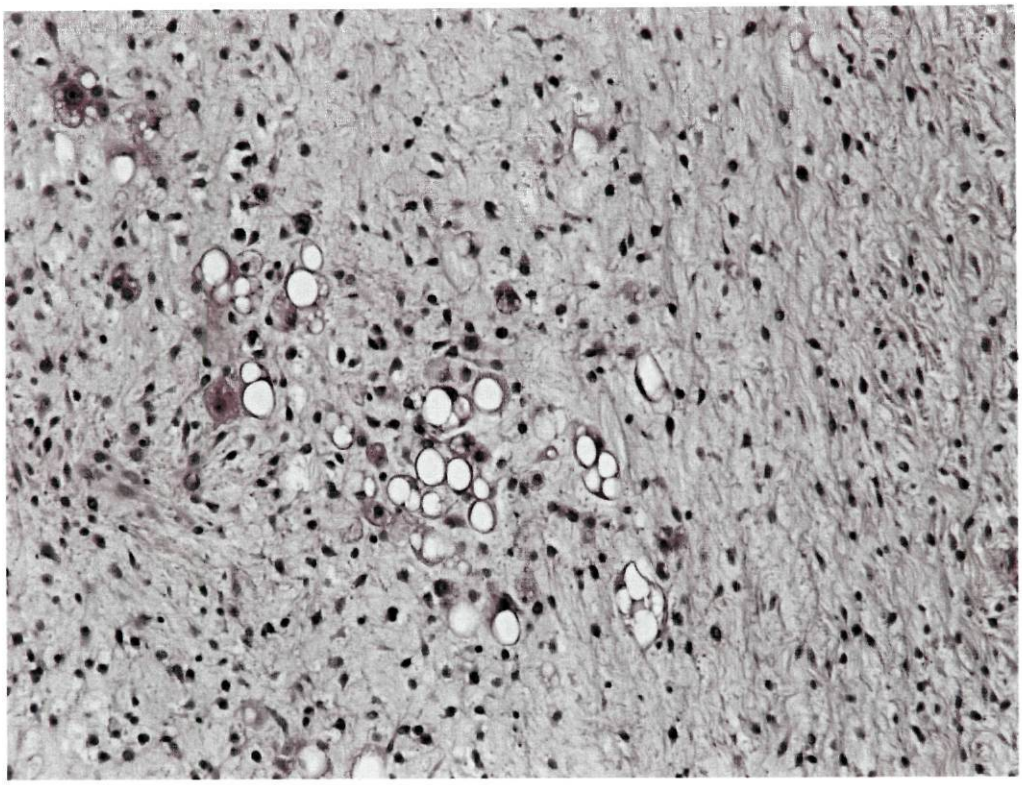


Figura 21- LPSA. Estroma de natureza mixóide moderado, células estreladas e contendo vacúolos lipídicos. H&E.100x

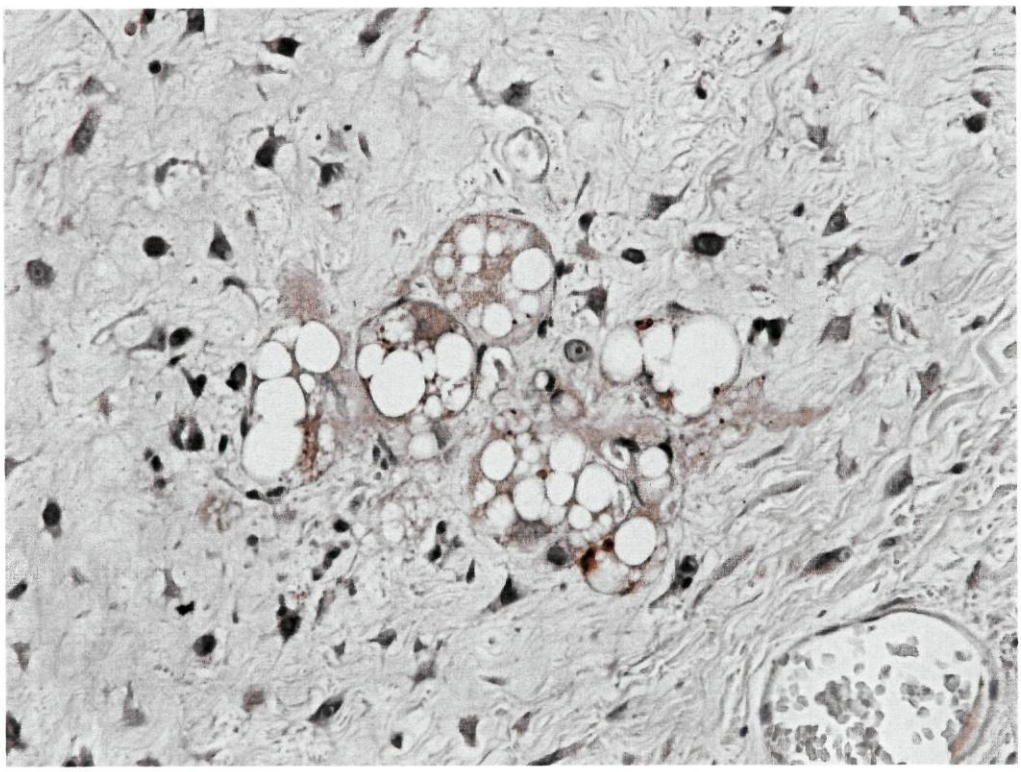


Figura 22- LPSA. Imunorreactividade ao marcador proteína S-100. Intensa marcação das células de diferenciação lipoblástica. ABComplex-HRP, 200X

4.2.2.1- Caracterização da imunorreactividade das células neoplásicas aos filamentos intermédios e proteína S-100.

As células neoplásicas revelaram imunorreactividade de padrão difuso para o marcador vimentina em todos os tipos histológicos. Este filamento intermédio tradicionalmente associado a células mesenquimatosas, esteve presente numa grande variedade de células, tendo sido identificado em fibroblastos, condroblastos, células musculares lisas e endotélio. A expressão das células neoplásicas aos filamentos intermédios desmina, α-actina de músculo liso e à proteína S-100 foi variável (Tab. 5), tendo sido utilizada na determinação da sua linha de diferenciação.

O anticorpo anti-desmina apresentou marcação focal em 6,5% das neoplasias estudadas, ocorrendo apenas nos tipos histológicos com padrão fusocelular predominante, SM (7,1%), FSA (10%) e MFSA (11,1%), ocorrendo também no músculo esquelético e de forma variável nos vasos.

A expressividade do antigénio α-actina de músculo liso foi observada em todos os tipos histológicos, apesar da sua presença não se verificar em todas as neoplasias. Este facto pressupõe ampla distribuição deste filamento intermédio nos sarcomas felinos.

Foi possível identificar imunofenótipo miofibroblasto em todos os tipos histológicos, num total de cinquenta neoplasias (80,6%), das quais quarenta e seis expressaram antigénios vimentina/α-actina (tipo VA), duas vimentina/α-actina/desmina (tipo VAD) e duas vimentina/desmina (tipo VD). Em neoplasias do tipo histológico FSA (n=3), MFSA (n=5), SCG (n=1) e CME (n=1), observou-se expressão do antigénio vimentina, sem imunorreacção positiva para os marcadores anti-desmina e anti-α-actina num total de doze neoplasias.

O anticorpo anti-proteína S-100 revelou marcação de padrão difuso para os tipos histológicos CME, TMBN e LPSA. Observou-se ausência da sua expressão no FSA e SRB e marcação focal no SM (7,1%) e MFSA (11,1%).

Tipo Histológico	Desmina (n/T)				α-Actina (n/T)				S-100 (n/T)			
	+	++	+++	%	+	++	+++	%	+	++	+++	%
SM	1/28	1/28	_	7,1	_	10/28	18/28	100	2/28	_	_	7,1
FSA	1/10	_	_	10	5/10	_	_	50	_	_	_	0
MFSA	1/9	_	_	11,1	1/9	1/9	1/9	33,3	1/9	_	_	11,1
SCG	_	_	_	0	_	1/8	5/8	75	_	_	2/8	25
CME	_	_	_	0	1/3	1/3	_	66,7	_	_	3/3	100
TMBN	_	_	_	0	_	1/2	1/2	100	_	_	2/2	100
SRB	_	_	_	0	_	1/1	_	100	_	_	_	0
LPSA	_	_	_	0	_	_	1/1	100	_	_	1/1	100
Total (%)	4,8	1,6	0	6,5	11,3	24,1	41,9	77,4	4,8	0	12,9	17,7

Tabela 5- Expressão dos marcadores desmina, α-actina e proteína S-100 nos diferentes tipos histológicos.

A imunorreactividade ao marcador citoqueratina 14 foi avaliada em quatro neoplasias localizadas na glândula mamária. As células sarcomatosas destas neoplasias evidenciaram ausência de expressão desta proteína (Fig. 23).

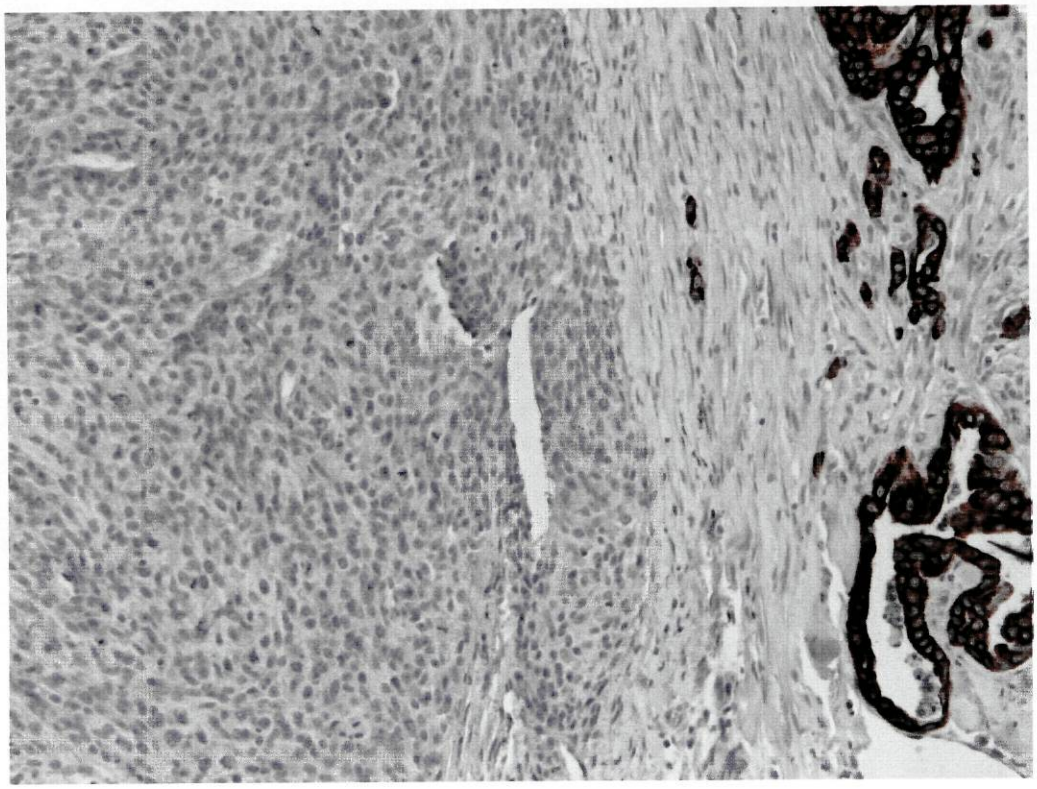


Figura 23- SM localizado na mama, ausência de imunorreactividade ao marcador citoqueratina 14 pelas células neoplásicas e positividade difusa das células epiteliais. ABComplex-HRP, 40X

4.2.2.2- Graduação histológica

Dos sessenta e dois sarcomas do nosso estudo, 82,3% (n=51) apresentaram grau histológico 3, 16,1% (n=10) apresentaram grau 2 e 1,6% apresentaram grau 1 (n=1). A distribuição do grau histológico e os tipos histológicos está representada na Figura 24. Todas as neoplasias agrupadas nos tipos histológicos MFSA, SCG, LPSA e SRB apresentaram grau histológico 3. O sarcoma de grau 1 pertencia ao tipo histológico SM. Os sarcomas de grau 2 apresentaram tipos histológicos SM, FSA, CME e TMBN. O estudo de análise de variância entre o grau histológico e as variáveis clínicas e patológicas está representado na tabela 13 (em Anexos). Desta análise, encontramos associações significativas entre esta variável e a idade (p=0,01), localização anatómica das neoplasias (p=0,02) e o infiltrado inflamatório (p=0,04) (Fig.25, 26 e 27).

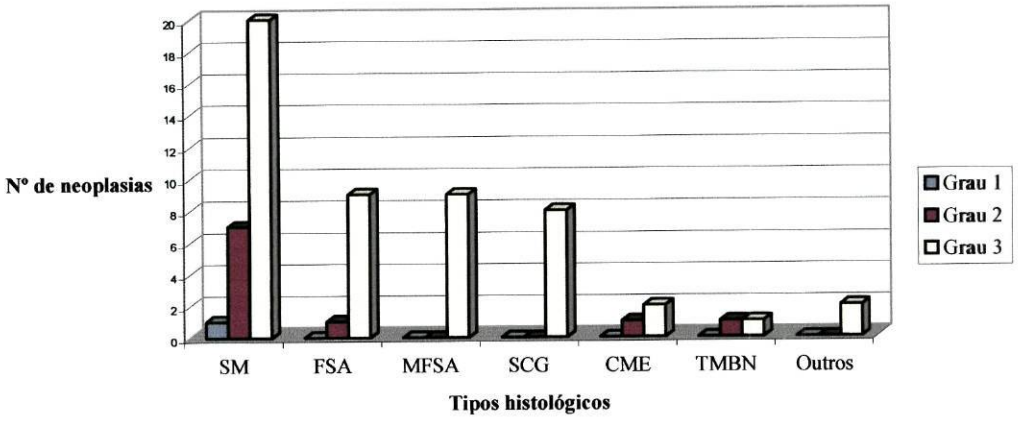


Figura 24- Caracterização dos tipos histológicos observados e o grau histológico.

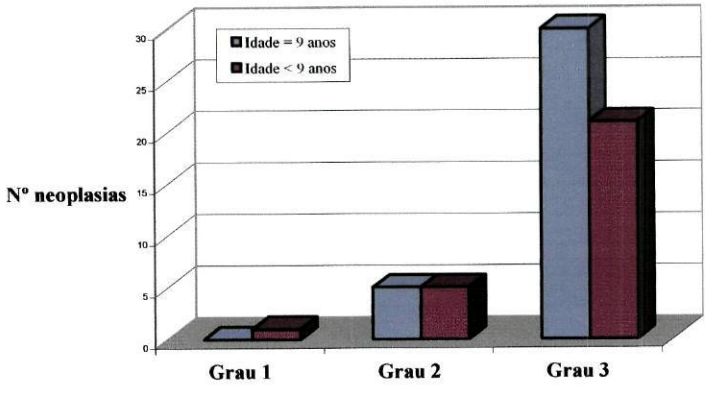


Figura 25- Associação do grau histológico e a idade dos gatos (p=0,01).

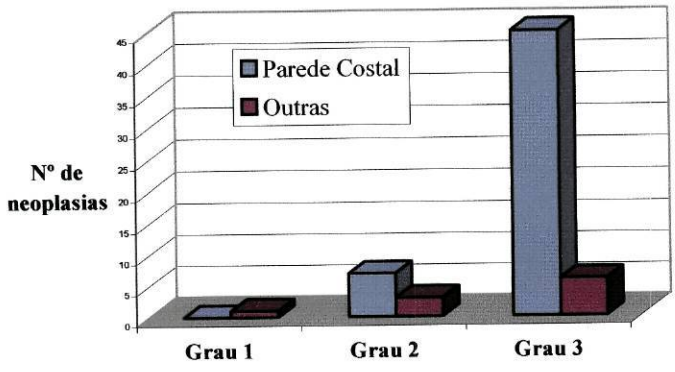


Figura 26 - Associação da localização anatómica das neoplasias e o grau histológico (p=0,02).

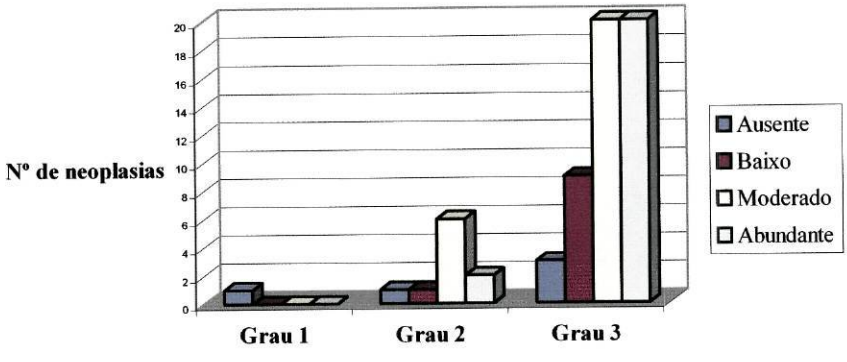


Figura 27 - Associação do infiltrado inflamatório peritumoral e o grau histológico (p=0,04).

4.2.2.3- Caracterização do infiltrado inflamatório

A presença de infiltrado peritumoral de células do tipo inflamatório foi frequentemente observada (93,5%, n= 58) independentemente dos tipos histológicos, estando a sua distribuição representada na Figura 28. Foi possível observar infiltração peritumoral abundante em vinte e duas neoplasias (35,5%). Nestas neoplasias o infiltrado inflamatório era principalmente constituído por células do tipo linfo-plasmocitário e macrofágico e estava organizada sob a forma de agregados foliculares linfogranulomatosos, perivasculares, distribuído em mais de 50% dos campos peritumorais (Fig.29). Em vinte e seis neoplasias (41,9%) os linfócitos estavam distribuídos de forma difusa ou em pequenos folículos e estavam presentes em pelo

menos 50% dos campos peritumorais, tendo-se considerado neoplasias com infiltrado inflamatório moderado. Em dez neoplasias (16,1%) este infiltrado foi menor com formação folicular mínima, e quatro neoplasias (6,5%) revelaram ausência de infiltrado inflamatório.

Os folículos revelaram heterogeneidade, de linfócitos B e T, tendo-se verificado maior proporção de linfócitos imunorreactivos ao anticorpo anti-CD3 do que ao anticorpo anti-CD20, pela observação das mesmas áreas, em cortes contíguos, pressupondo presença predominante dos linfócitos T.

Em vinte neoplasias (32,3%) observou-se a presença de linfócitos intratumorais (Fig.30), doze pertenciam ao tipo histológico SM, tendo ocorrido também nos tipos histológicos FSA (n=3), MFSA (n=2), SCG (n=2) e um SRB.

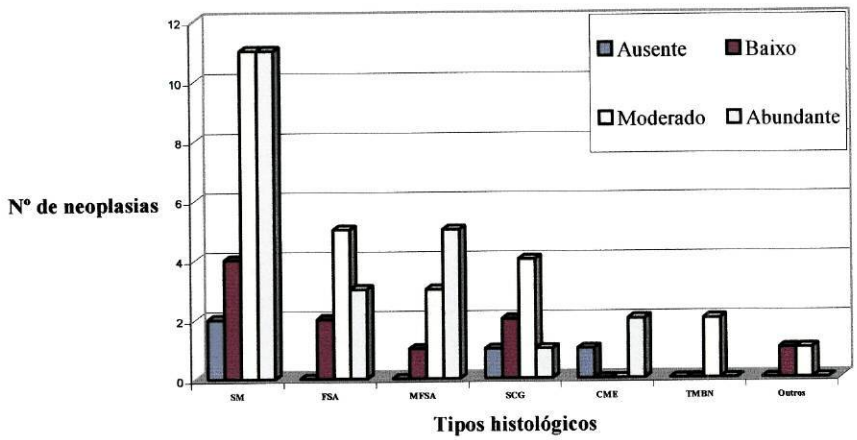


Figura 28- Caracterização do infiltrado inflamatório peritumoral nos tipos histológicos observados.

Em doze neoplasias, foi possível observar grandes quantidades de neutrófilos nas proximidades de áreas necrosadas e de detritos nucleares.

Em duas neoplasias (SM e SCG) localizadas na parede costal, observaram-se aglomerados de células macrofágicas, compatíveis com células espumosas. A natureza do material fagocitado não foi identificada.

O infiltrado inflamatório esteve associado a neoplasias localizadas na parede costal (p=0,000001) e de elevado grau histológico (p=0,03) (Tabela 14 em Anexos; Fig. 31 e 32).

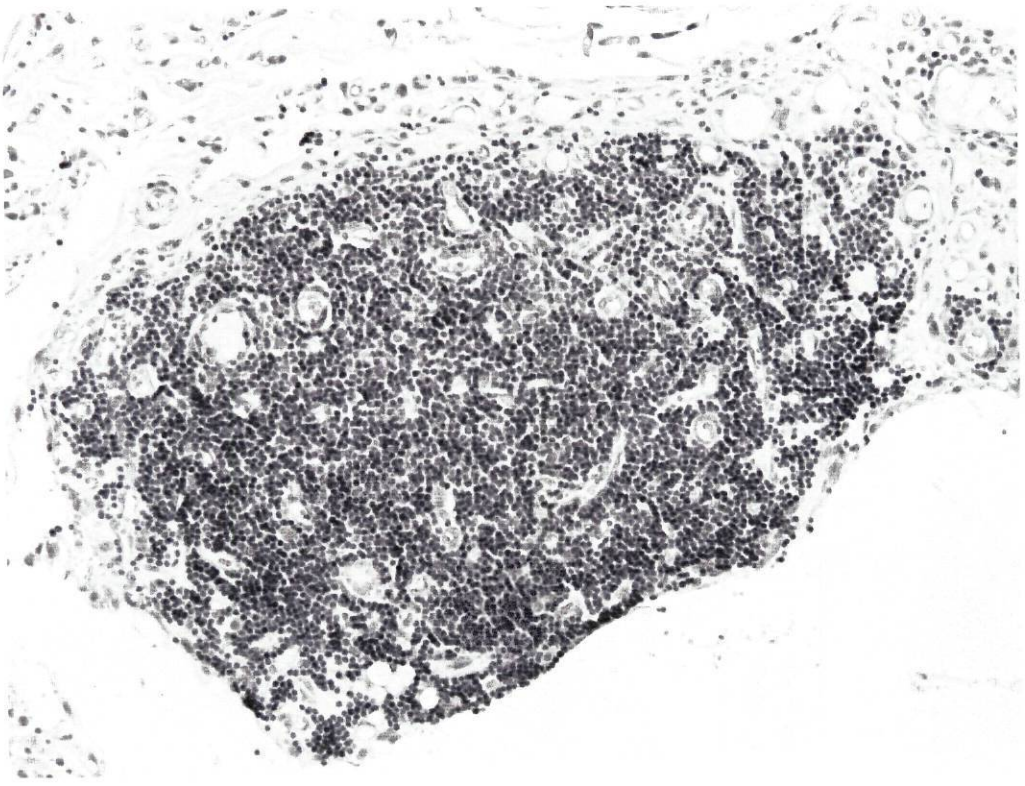


Figura 29- Agregado linfocitário peritumoral. H&E,100x.

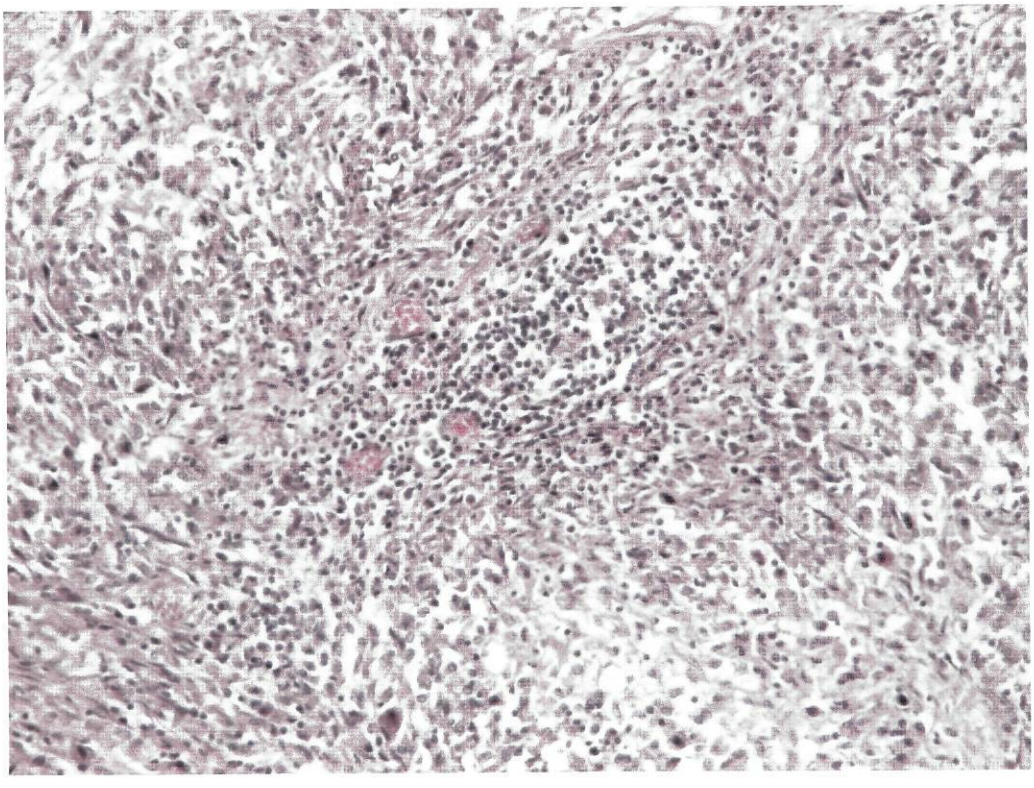


Figura 30- SM. Infiltrado linfocitário intratumoral. H&E, 100x.

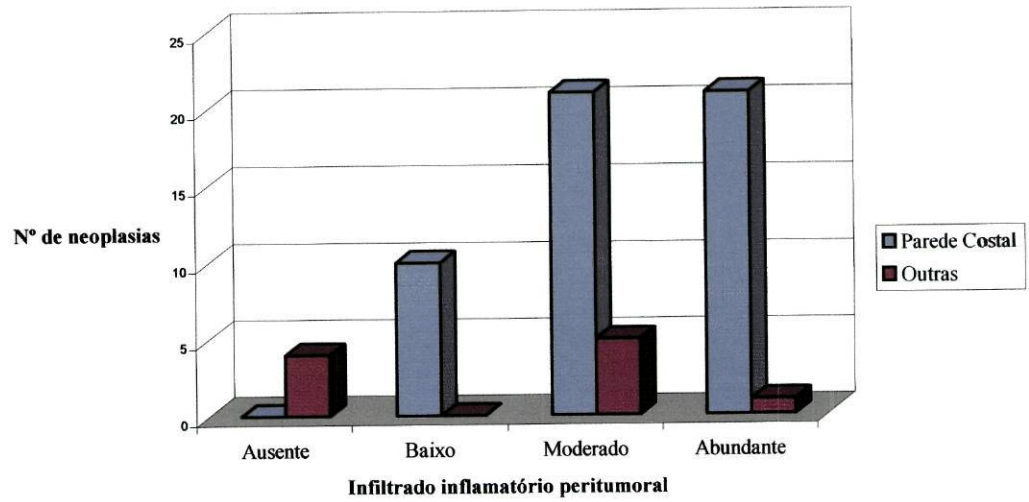


Figura 31- Associação da presença de infiltrado inflamatório e a localização anatómica das neoplasias (p=0,000001).

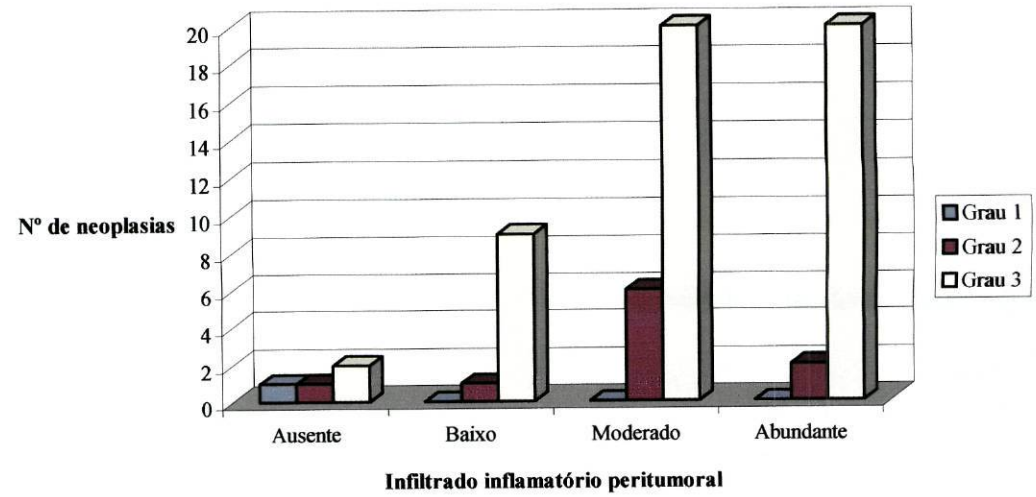


Figura 32- Associação do infiltrado inflamatório e o grau histológico dos sarcomas felinos observados (p=0,03).

4.2.2.4- Avaliação da actividade proliferativa

A actividade proliferativa das células neoplásicas foi avaliada pelo método clássico de contagem de mitoses e pela avaliação do índice proliferativo através do marcador PCNA. Obtivemos associação estatística significativa entre os dois métodos (p= 0,01, teste t de Student), representada na Figura 33. Os sarcomas apresentaram valor mediano de células em mitose de 41, ocorrendo variação bastante acentuada nos valores da contagem de mitoses (mínimo 1, máximo 110) sendo o valor médio de células em mitoses nas neoplasias de 41,5.

Todas as neoplasias estudadas apresentaram imunorreactividade ao marcador PCNA e os valores da percentagem de células marcadas foram considerados valores de índice de proliferação (IP), com distribuição normal, pelo que consideramos o valor da média 49% (mínimo 9,4%, máximo 89%) como valor "cut off" de forma a subdividir as neoplasias com índice de proliferação baixo (< 49) e alto (≥ 49).

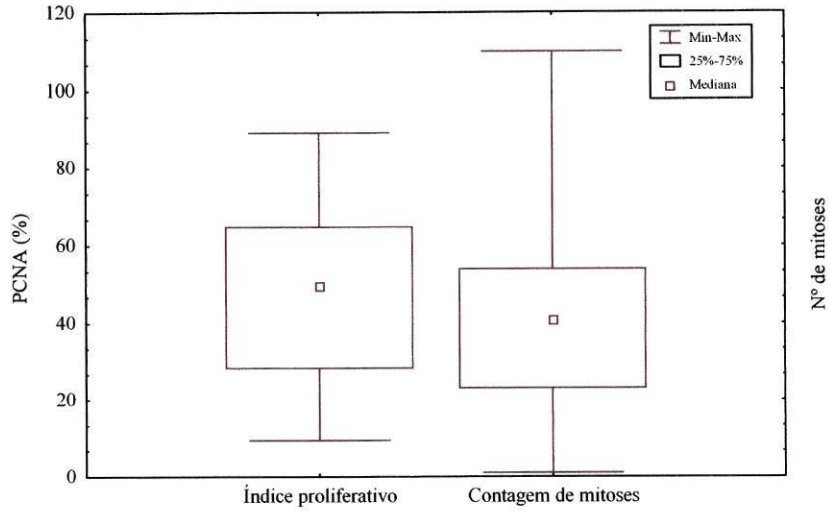
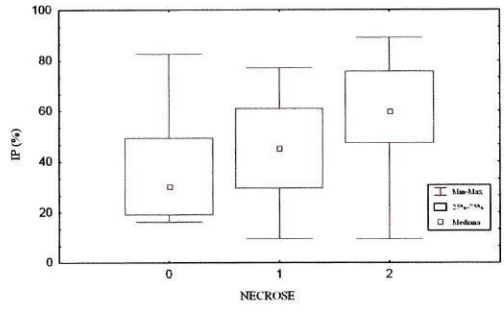
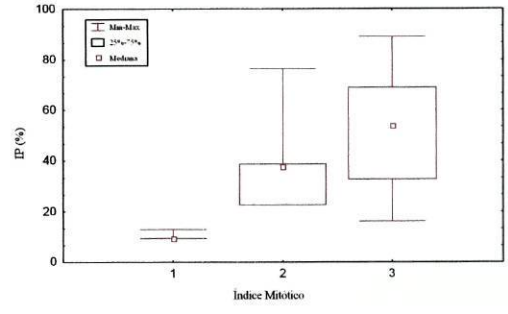


Figura 33- Associação do índice de PCNA e a contagem das mitoses (p=0,01).





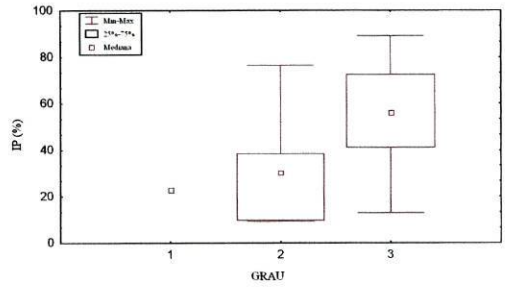


Figura 34- Associação do índice de proliferação com o grau de necrose, **p**= 0,006 (em cima à esquerda), índice mitótico, p=0,003 (em cima à direita) e grau histológico, p=0,01 (em baixo à esquerda)

Da análise de variância entre o índice de proliferação e as variáveis clínicas e patológicas, utilizou-se o método ANOVA, cujos resultados se encontram expressos na

tabela 15 (em Anexos). Desta análise, ocorreram associações estatisticamente significativas entre o IP e o IM (p=0,003), necrose tumoral (p=0,006) e o grau histológico (p=0,01) (Fig.34).

4.2.2.5- Expressão da proteína p53

Das neoplasias do nosso estudo, foi possível avaliar a imunorreactividade ao marcador p53 em quarenta e oito casos (77,4%) da nossa amostragem. Catorze neoplasias foram excluídos deste estudo devido a escassez de material histológico.

Das neoplasias analisadas catorze revelaram imunorreactividade nuclear ao marcador p53 (Fig.35), das quais dez (20,8%) revelaram índices de p53 superiores a 10%, tendo sido consideradas positivas à p53, tal como descrito em Material e Métodos.

Para estudar a relação entre este parâmetro patológico e as restantes variáveis clínico-patológicas utilizamos estudos de análise de variância, método de ANOVA, no entanto, não foram verificadas associações com significado estatístico, provavelmente devido ao reduzido número de casos.

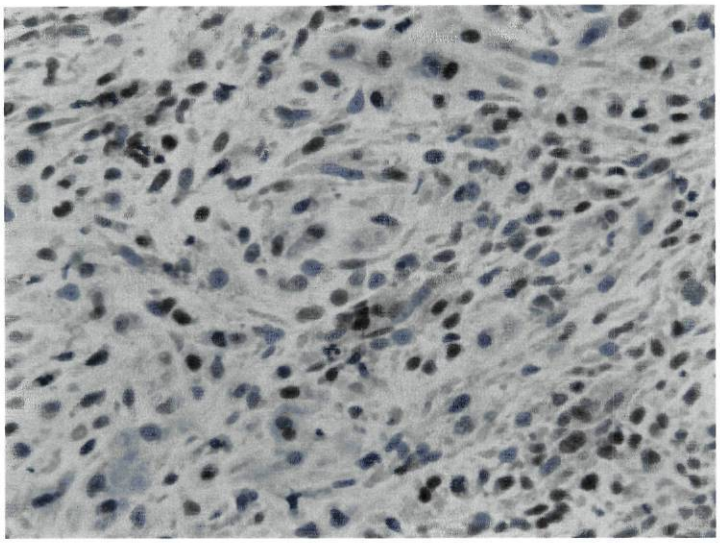


Figura 35- SM. Imunorreactividade nuclear à p53 (Ip53=55%). ABComplex-FA (200x)

Pela avaliação das frequências relativas sumariadas na tabela 16 (em Anexos), podemos observar que as neoplasias que evidenciaram expressão de p53 pertenciam sobretudo a gatos de raça Europeu Comum (90%) e estavam localizadas preferencialmente na parede costal (80% dos casos). As neoplasias apresentaram necrose em 70% dos casos e estavam associadas a infiltrados inflamatórios, moderados a abundantes, grau histológico 3 e índices mitótico e proliferativo altos.

4.3- ANÁLISE DE CITOMETRIA DE IMAGEM

Dos sessenta e dois sarcomas incluídos neste trabalho, foram inicialmente analisados quarenta e sete por citometria de imagem, para a avaliação do conteúdo de ADN das células neoplásicas. As restantes neoplasias foram excluídas deste estudo devido à escassez de material histológico. Das neoplasias avaliadas não foi possível a caracterização citométrica de seis casos, devido à sobreposição nuclear excessiva ou provavelmente devido a condições de fixação deficientes, pelo que o estudo das variáveis citométricas foi limitado a quarenta e uma neoplasias. Lembramos que a técnica requer controlo rigoroso de fixação e a avaliação deve ser efectuada em núcleos não sobrepostos (Falkmer, 1989; Bacus *et al.*, 1993; van Velthoven *et al.*, 1995b; Reeder *et al.*, 1997).

4.3.1.- Ploidia de ADN

Observou-se aneuploidia em trinta e quatro (82,9%) das neoplasias estudadas. Apenas sete sarcomas (17,1%) da nossa amostra apresentaram conteúdo de ADN diplóide. Dentro da categoria dos aneuplóides, onze neoplasias destacaram-se pela presença de clones múltiplos, tendo sido considerados multiplóides. As figuras 36, 37 e 38 são histogramas obtidos duma neoplasia diplóide, aneuplóide e multiplóide de ADN, respectivamente.

Para análise estatística entre esta variável e os parâmetros clínicos e patológicos foi aplicada a análise de variância ANOVA. No entanto os resultados do teste foram considerados não válidos, provavelmente devido ao reduzido número de casos em cada uma das três classes de ploidia de ADN. Os resultados desta relação encontram-se sumariados na tabela 18 (em Anexos). Pela análise das frequências relativas verificamos que as neoplasias diplóides de ADN pertenciam essencialmente aos grupos histológicos de padrão fusocelular (SM, 42,9%, FSA, 28,6%) revelando índices mitótico e proliferativo altos, grau 3, ausência de expressão de proteína p53, ocorrendo maioritariamente em neoplasias de menores dimensões. As neoplasias aneuplóides e multiplóides de ADN quando comparadas entre si, apresentaram frequências relativas similares, para os parâmetros clínico-patológicos estudados, observando-se no entanto, uma variação ligeira, relativamente ao IP: 56,5% das neoplasias aneuplóides de ADN revelaram IP altos, enquanto 63,6% das neoplasias multiplóides de ADN apresentaram IP baixos.

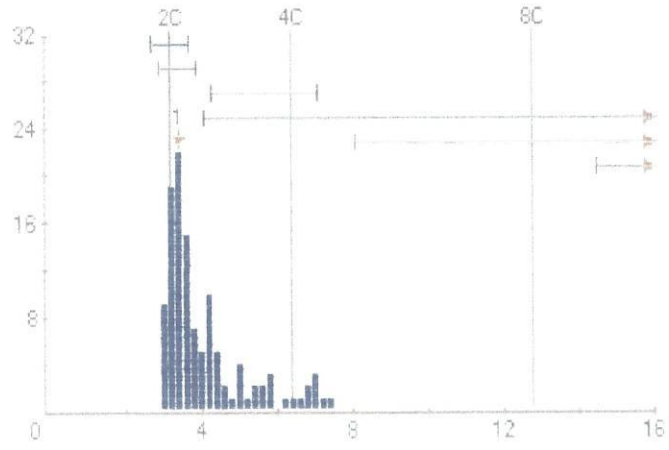


Figura 36- Histograma diplóide de ADN.

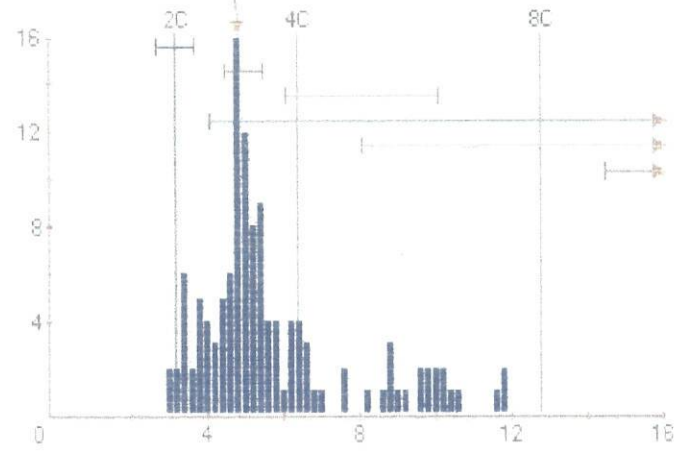


Figura 37- Histograma aneuplóide de ADN.

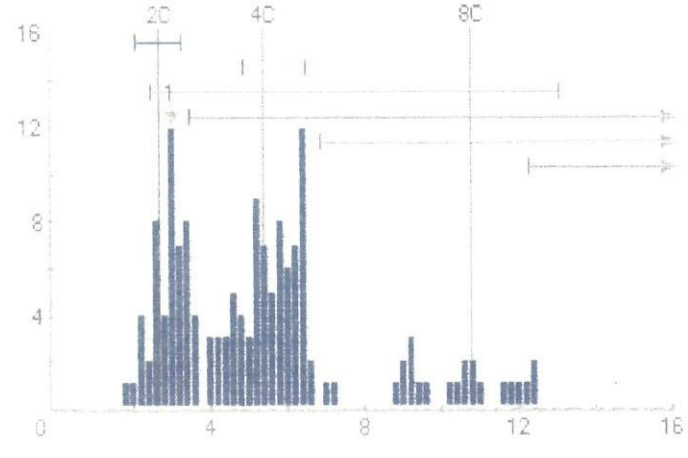


Figura 38- Histograma multiplóide de ADN.

A presença de hemorragia, calcificação e de células neoplásicas multinucleadas foram eventos observados com maior frequência nas neoplasias aneuplóides de ADN, tendo-se observado expressão de p53 exclusivamente na categoria dos aneuplóides e multiplóides de ADN.

4.3.2- Índice de ADN (IA)

O valor médio de IA dos sarcomas foi de 1,5 (mínimo-1,03, máximo- 2,17). Para efeitos de comparação com as variáveis patológicas, utilizou-se o valor da média como valor "cut off" para definir os intervalos de baixo (<1,5) e alto (≥ 1,5) IA. Dos sarcomas analisados, 58,8% apresentaram IA alto e 42,2% IA baixo.

Não foram observadas grandes variações entre os grupos de neoplasias com IA Baixo e Alto, apresentando frequências relativas de eventos clínicos e patológicos muito similares, representadas na tabela 19 (em Anexos). Analisada a relação entre o valor de IA e a variável infiltrado inflamatório, verificou-se que, infiltrados abundantes estavam associados a IA alto (p= 0,03). Por sua vez, os tipos histológicos que apresentaram diferenciação condróide, miofibroblástica e perineural revelaram IA superiores (p=0,02). A expressão da proteína p53 foi mais frequentemente observada nas neoplasias de IA alto.

4.3.3- Fracção de células com conteúdo superior a 2,5c, 5c e 9c

Cada uma destas variáveis foi categorizada em dois subgrupos utilizando o valor da média como valor "cut off", como sumariado na tabela 6.

Variáveis	Média	Mínimo	Máximo	Índices Citométricos	
				Baixo n (%)	Alto n (%)
> 2,5c	62,0	4,25	100	18 (43,9)	23 (56,1)
> 5c	12,1	0,0	38,1	23 (56,1)	18 (43,9)
> 9c	0,9	0,0	6,1	29 (70,7)	12(29,3)

Tabela 6- Valores das varáveis citométricas > 2,5c,> 5c e> 9c

As associações entre estas variáveis citométricas e as variáveis clínicas e patológicas estão sumariadas na tabela 20 (em Anexos). Desta avaliação, salientamos que as fracções elevadas de células com conteúdo de ADN superior a 2,5c e 5c

estiveram relacionados com tipos histológicos sem padrão fusocelular predominante (p = 0,006 e p=0,05) e que as fracções elevadas de células com conteúdo de ADN superior a 9c ocorreram apenas em neoplasias localizadas na parede costal (p=0,04) e de grau histológico 3 (p=0,04). Fracções elevadas de células com conteúdo de ADN superior a 5 c e a 9c revelaram associação estatística significativa com a hemorragia (p=0,05 e p=0,02).

4.4- ESTUDO DE FACTORES DE PROGNÓSTICO

As variáveis clínicas, patológicas e de citometria de imagem foram relacionadas com o tempo de sobrevida total (TST). Foram calculadas as medianas do TST para cada uma das categorias, e as diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de log-Rank, com o objectivo de estudar a sua importância como possíveis factores de prognóstico. Os resultados são apresentados em tabelas para as variáveis clínicas, patológicas e citométricas e também em curvas de sobrevida para os parâmetros considerados válidos.

4.4.1- Variáveis clínicas

O tamanho das neoplasias e a raça influenciaram a sobrevida destes animais. Pela análise das respectivas curvas de sobrevida, os gatos de raça Europeu Comum apresentaram uma curva mais suave ao longo do tempo (Fig.39), sugerindo maior resistência ao cancro do que as restantes raças, e animais com neoplasias de maiores dimensões apresentam uma curva de sobrevida muito acentuada, não ocorrendo sobreviventes deste grupo no final do estudo, revelando-se factor de mau prognóstico (Fig. 40). As variáveis sexo, idade e localização tumoral não influenciaram o prognóstico, contudo pudemos verificar valores de medianas de TST inferiores para gatos de sexo feminino, faixa etária elevada e com neoplasias localizadas na parede costal (Tab.7).

Variáveis Clínicas		Nº gatos (%)	TST (dias) (Mediana)	p (log rank)
Sexo	**Feminino**	25 (49,0)	262,2	0,47
	Masculino	26 (51,0)	286,5	
Idade	**< 9 anos**	24 (47,1)	286,5	0,44
	≥ 9 anos	27 (52,9)	262	
Tamanho	**< 3 cm**	20 (39,2)	399,5	0,02*
	≥ 3 cm	31 (60,8)	251	
Raça	**Europeu Comum**	40 (78,4)	321	0,05*
	Outras	11 (21,6)	239	
Localização	**Parede costal**	42 (82,4)	277	0,49
	Outras	9 (17,6)	309	

Tabela 7- Características clínicas e análise univariada com os tempos de sobrevida total em 51 gatos com sarcomas das partes moles. *- Valor estatisticamente significativo.

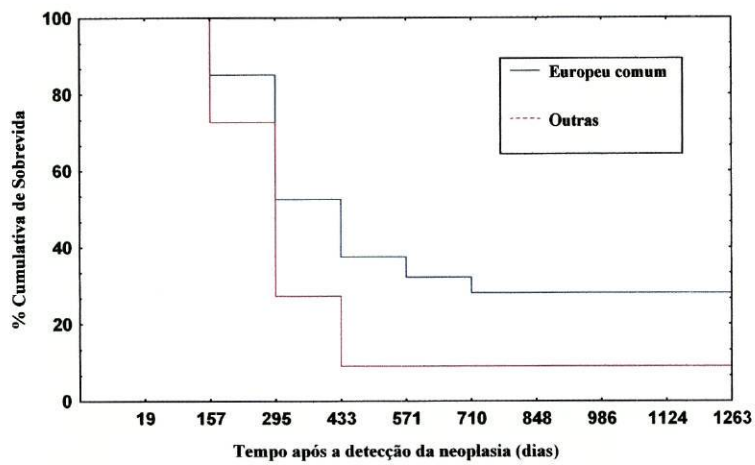


Figura 39-Curva de sobrevida e o efeito da raça (p=0,05).

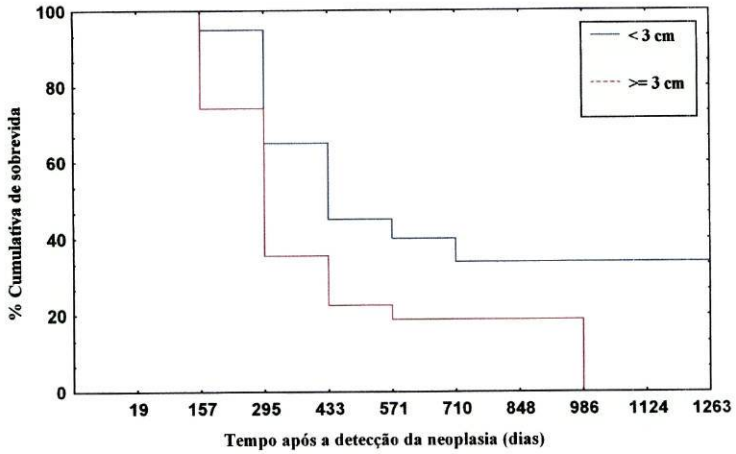


Figura 40- Curva de sobrevida e o efeito do tamanho das neoplasias (p=0,02).

4.4.2- Variáveis patológicas

Para avaliação das variáveis patológicas, categorizamos em dois grupos todas as variáveis, a fim de facilitar o tratamento de dados.

Observamos associações estatísticas significativas para as variáveis padrão de crescimento, necrose e expressão de p53. Pela análise das respectivas curvas de sobrevida, o padrão de crescimento expansivo (Fig.41), a ausência de necrose (Fig.42) e a expressão da proteína p53 (Fig. 43) revelaram-se factores de prognóstico favoráveis.

No nosso estudo o valor prognóstico foi limitado para as variáveis tipo histológico, IM, grau histológico, infiltrado inflamatório, hemorragia, células neoplásicas multinucleadas e IP das neoplasias, provavelmente devido à desproporção dos grupos (Tab.8). No entanto pudemos observar, para as variáveis IM e grau histológico, valores de mediana para o TST mais baixos no grupo de animais com neoplasias de IM 3 e grau 3, assim como para os animais cujas neoplasias apresentavam hemorragia e multinucleação das células neoplásicas. A presença de infiltrados inflamatórios peritumorais moderados (2) e abundantes (3) e IP alto estiveram associados a valores de mediana para o TST superiores.

Variáveis patológicas		Nº gatos (%)	TST (dias) (Mediana)	p (log rank)
Tipos histológicos	**SM**	22 (43,1)	275	**0,36**
	Outros	29 (56,9)	285	
Padrão de crescimento	**Infiltrativo + Misto**	41 (80,4)	269	**0,04***
	Expansivo	10 (19,6)	474	
Necrose	**Ausente**	10 (19,6)	485	**0,05***
	Presente	41 (80,4)	262	
IM	**1+2**	7 (13,7)	334	**0,41**
	3	44 (86,3)	265,5	
Grau	**1+2**	10 (19,6)	369	**0,32**
	3	41 (80,4)	251	
Infiltrado Inflamatório	**Ausente ou baixo**	14 (27,5)	241,5	**0,42**
	Moderado ou abundante	37 (72,5)	309	
Multinucleação de células neoplásicas	**Ausência**	37 (72,5)	288	**0,39**
	Presença	14 (27,5)	236	
Hemorragia	**Ausência**	35 (68,6)	309	**0,38**
	Presença	16 (31,4)	256,5	
Índice de proliferação	**Baixo**	22 (43,1)	275	0,38
	Alto	29 (56,9)	285	
Expressão de p53	**Presença**	9 (23,1)	518	**0,005***
	Ausência	30 (76,9)	255	

Tabela 8- Características patológicas das neoplasias e análise univariada com os tempos de sobrevida total. *- Valor estatisticamente significativo.

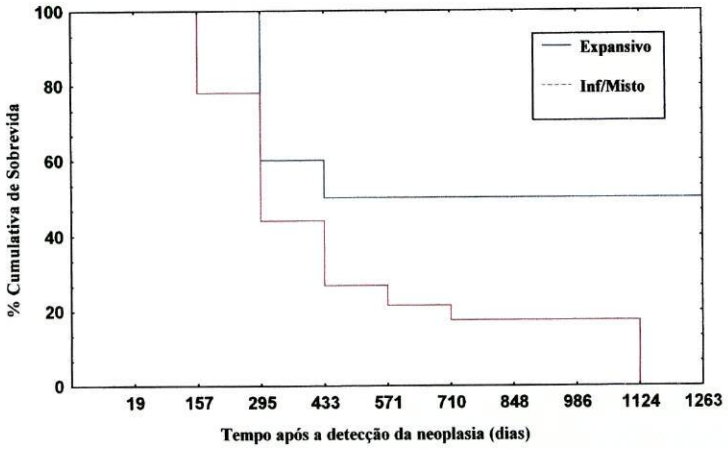


Figura 41- Curva de sobrevida e o efeito da variável patológica padrão de crescimento (p=0,04).

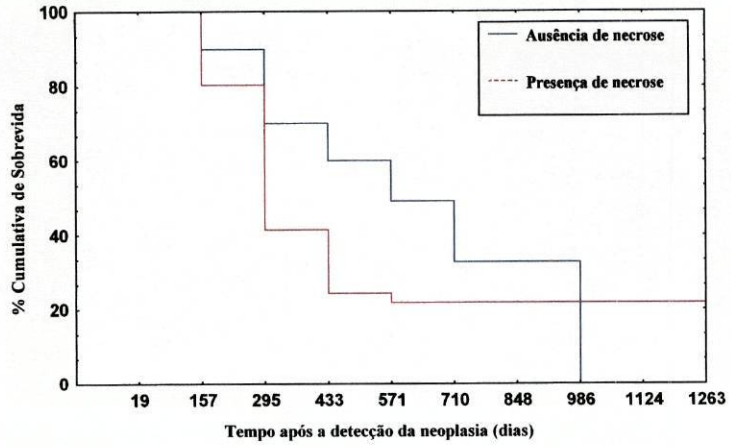


Figura 42- Curva de sobrevida e o efeito da variável patológica necrose (p=0,05)

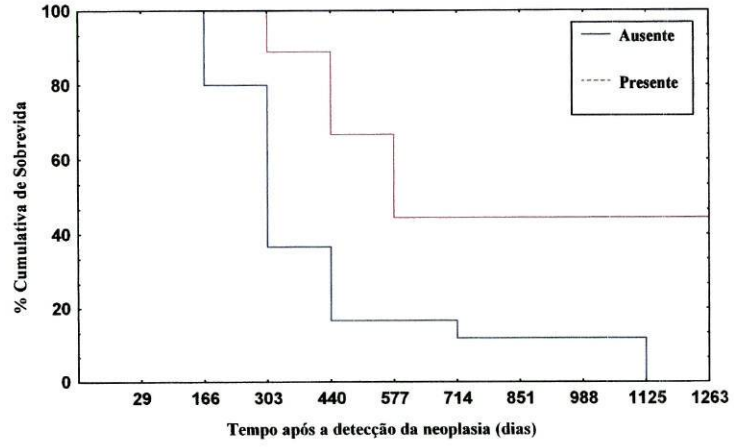


Figura 43- Curva de sobrevida e o efeito da variável patológica expressão de p53 (p=0,05).

4.4.3- Variáveis citométricas

Para avaliação das variáveis citométricas com os tempos de sobrevida, categorizamos em dois grupos a variável ploidia em diplóides e aneuplóides de ADN, juntando na mesma categoria os casos aneuplóides e multiplóides de ADN.

Foi possível observar associação estatística significativa para a variável citométrica fracção de células >2,5c (p=0,01), revelando prognóstico mais favorável para os gatos cujas neoplasias continham esta fracção elevada (Fig.44). As outras variáveis citométricas avaliadas não revelaram associação significativa com a sobrevida, revelando baixa importância como factores de prognóstico, tendo-se observado que os grupos de gatos com neoplasias aneuplóides de ADN ou fracções elevadas de células com >5c e >9c, revelaram valores de mediana para tempos de sobrevida, superiores (Tab. 9).

Variáveis		N.º gatos (%)	TST (dias) (Mediana)	p (log rank)
Ploidia	Diplóide	5 (15,2)	248	0,33
	Aneuplóides	28 (84,2)	351	
Índice de ADN	Baixo	13 (39,4)	248	0,42
	Alto	20 (60,6)	351	
>2,5 c	Baixo	13 (51,5)	231	0,01*
	Alto	20 (60,6)	455,5	
>5c	Baixo	17 (51,5)	244	0,11
	Alto	16 (48,5)	379	
>9 c	Baixo	23 (69,7)	334	0,27
	Alto	10 (30,3)	437	

Tabela 9- Características citométricas das neoplasias e análise univariada com os tempos de sobrevida total. *- Valor estatisticamente significativo.

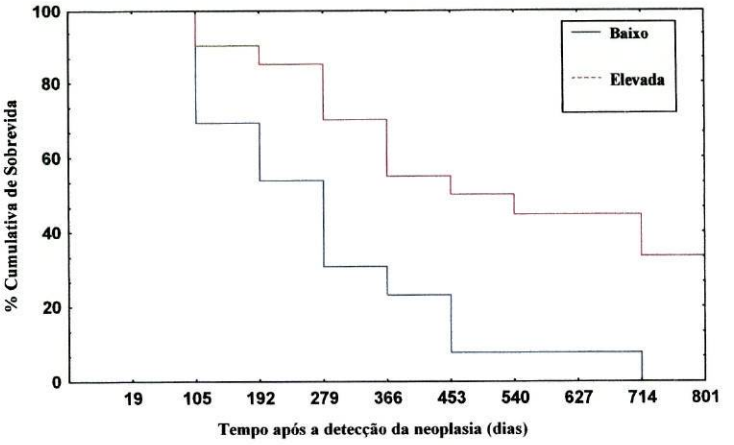


Figura 44- Curva de sobrevida e o efeito da variável citométrica >2,5 c.

5- DISCUSSÃO

Classicamente a caracterização das neoplasias é realizada com base nas características citológicas e histológicas. Contudo, à medida que novos conhecimentos emergem, novas técnicas são usadas para apoiar o diagnóstico histológico, estabelecer o prognóstico e melhorar o conhecimento da história natural das neoplasias.

No presente trabalho caracterizaram-se mais profundamente os sarcomas das partes moles felinos através de estudos de histologia convencional, histoquímica, IHQ e de citometria de imagem. Foram estudadas também algumas variáveis clínicas como o sexo, idade, raça, localização tumoral e tentamos obter algumas informações sobre o acompanhamento clínico dos animais.

Para efectuar este estudo recorremos a material de arquivo embebido em parafina. Os blocos de parafina revelaram ser repositório ideal para arquivar os tecidos (Robinson, 1994), permitindo estudos retrospectivos que relacionam o tempo de sobrevida com parâmetros de prognóstico, incluindo a caracterização da ploidia (Miettinen *et al.*, 1982; Soini *et al.*, 1992; Pape *et al.*, 1992; Cattoretti *et al.*, 1992; Baas *et al.*, 1994; Clemo *et al.*, 1994; Stenersen *et al.*, 1994; Jösen e Rudolph, 1997; Subdo *et al.*, 2001; Couto *et al.*, 2002). No entanto foi motivo de algumas limitações neste trabalho, pois a escassez do material histológico impossibilitou a realização de algumas determinações como a detecção da proteína p53 e do conteúdo de ADN para a totalidade das amostras.

O estudo da sobrevida baseou-se no registo de informações dos clínicos e de alguns proprietários, como a data da primeira recidiva e a data da morte de cinquenta e um gatos. No entanto, as informações sobre o historial de vacinação, envolvimento de gânglios linfáticos, estado serológico para o FeLV e de outros exames como confirmações radiográficas de metastização foram escassas ou ambíguas. Alguns erros de preenchimento das requisições de análise, como a omissão da identificação completa do proprietário impediram o acesso à ficha clínica de oito animais. O envio de material em condições deficientes e a escassez de informações fornecidas pelo clínico, importantes para um diagnóstico histológico correcto, são prática corrente no exercício da clínica Médico-Veterinária. Esta conduta tem sido alvo de preocupação nas reuniões anuais da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal, que tem vindo a promover acções de sensibilização junto dos clínicos no sentido de estabelecer colaboração mútua.

Os sarcomas estudados ocorreram em gatos com idade média de 8,9 anos, o que está de acordo com o observado na grande maioria dos estudos (Hendrick *et al.*, 1994b; Doddy *et al.*, 1996; Lester *et al.*, 1996; Davidson *et al.*, 1997; Cronin *et al.*, 1998; Doliger & Davauchelle, 1998; Hershey *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001; Couto *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2002). A idade média do aparecimento das neoplasias foi superior à idade geralmente apresentada por gatos infectados com o FeSV (4 a 5 anos) (Hoover & Mullins, 1991; Quackenbush *et al.*, 1996; Pereira & Tavares, 1998) e inferior à apresentada pelos gatos com sarcomas clássicos (12 anos) (Ryan, 1998).

Estas neoplasias ocorreram quer em machos quer em fêmeas, não se observando predisposição sexual, o que está de acordo com a literatura consultada (Kass *et al*, 1993; Hendrick *et al*, 1994b; Doddy *et al.*, 1996; Lester *et al.*, 1996; Davidson *et al.*, 1997; Hershey *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001; Couto *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2002).

As raças dos gatos foram variáveis, sendo a mais frequente a raça Europeu Comum (79,0% dos casos). Apesar de alguns estudos retrospectivos indicarem ausência de predisposição racial (Kass *et al.*, 1993; Hendrick *et al.*, 1994b; Doddy *et al.*, 1996), existem vários estudos em que o mesmo facto foi observado (Brown *et al.*, 1978; Bostock & Dye, 1979; Davidson *et al.*, 1997; Cronin *et al.*, 1998; Hershey *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002). A predisposição da raça Europeu Comum pode reflectir a maior frequência desta raça em Portugal e em outros países, no entanto a raça siamesa, apesar de muito frequente em Portugal, revelou-se pouco representada no nosso estudo.

A localização neoplásica mais frequentemente observada foi a parede costal (83,9% dos casos observados), principalmente a região torácica dorso-lateral, que representa uma área anatómica de eleição para a administração de vacinas. Trabalhos publicados na década de 70, descrevem a região dos membros e da cabeça como a localização mais frequente dos sarcomas do gato (Brown *et al.*, 1978; Bostock & Dye, 1979). A descrição dos locais de vacinação como áreas anatómicas para a ocorrência preferencial dos sarcomas do gato, tem vindo a ser referida em estudos mais recentes, que sugerem origem iatrogénica para estas neoplasias (Hendrick & Goldschmidt, 1991; Doliger *et al.*, 1992; Kass *et al.*, 1993; Esplin *et al.*, 1993; Gruffydd-Jones & Sparkes, 1994; Hendrick *et al.*, 1994b; Doddy *et al.*, 1996; Davidson *et al.*, 1997; Macy & Hendrick, 1996; Cohen *et al.*, 1998; Doliger & Devauchelle, 1998; Gagnon, 2000; Gobar & Kass, 2002). Como o historial de vacinação só estava disponível para doze

animais da nossa amostra, não foi possível, verificar a sua relação com o aparecimento das neoplasias.

Neste estudo, os gatos foram sujeitos ao tratamento cirúrgico para a extirpação do tumor primário, sem recurso a terapias adicionais e apresentaram valor mediano para a sobrevida total de 277 dias (9 meses) e para a sobrevida livre de doença de 198 dias (6,6 meses), valores inferiores ao apresentado em estudos semelhantes (Brown *et al.*, 1978; Bostock & Dye, 1979; Davidson *et al.*, 1997; Hershey *et al.*, 2000). A utilização de terapias neoadjuvantes e adjuvantes no tratamento dos SPM em Oncologia Humana visa o prolongamento do tempo de sobrevida (Frezza *et al.*, 1992; O'Sulliven *et al.*, 2002) suscitando interesse para a sua aplicabilidade no campo da Oncologia Veterinária. A quimiossensibilidade *in vitro* de linhas celulares neoplásicas de sarcomas de gato já foi avaliada para os agentes anti-mitóticos, vincristina e paclitaxel (Banerji *et al.*, 2002). Têm sido publicados vários trabalhos sobre a utilização de múltiplas modalidades terapêuticas, tendo-se observado, aumento dos tempos de sobrevida total para os gatos recorrendo à radioterapia neoadjuvante (Macy & Bergman, 1995; Couto & Macy, 1998; Cronin *et al.*, 1998; Doliger & Devauchelle, 1998), radioterapia adjuvante (Couto & Macy, 1998; Bregazzi *et al.*, 2001), radioterapia intersticial e imunogenoterapia (Macy & Bergman, 1995; Doliger & Devauchelle, 1998). Outros tratamentos incluíram a criocirurgia e a imunoterapia adjuvante com ou sem quimioterapia, mas sem grande sucesso (Brown *et al.*, 1978; Miller, 1991). A utilização da quimioterapia adjuvante com ou sem radioterapia já foi avaliada, mas a sua importância permanece controversa. Foram utilizados vários agentes quimioterápicos, como a metotrexato (Brown *et al.*, 1978), adriamicina (Macy & Bergman, 1995; Doliger & Devauchelle, 1998), doxorrubicina (Cronin *et al.*, 1998; Barber *et al.*, 2000; Bregazzi *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002), vincristina (Brown *et al.*, 1978; Barber *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2002), ciclofosfamida (Brown *et al.*, 1978; Cohen *et al.*, 2001 Kobayashi *et al.*, 2002) e a carboplatina (Kobayashi *et al.*, 2002).

O nosso estudo parece reforçar a ideia de que a cirurgia por si só, não parece ser suficiente, no tratamento dos sarcomas felinos reforçando a necessidade de pesquisar novas formas de tratamento. A utilização destas terapias em Medicina Veterinária, é, no entanto condicionada pela sua grande exigência quer em recursos económicos quer técnicos, sendo a extirpação cirúrgica a principal terapêutica. A precocidade da intervenção e a extensão alargada da exerese são factores que contribuem para o sucesso

do tratamento cirúrgico (Brown *et al.*, 1978; Bostock & Dye, 1979; Davidson *et al.*, 1997; Devauchelle *et al.*, 1997; Doliger & Devauchelle, 1998; Couto & Macy *et al.*, 1998; Richards, 1998; Heldmann *et al.*, 2000; Hershey *et al.*, 2000; Romanelli, 2000; McEntee & Page, 2001).

No nosso estudo 86,3% dos gatos apresentaram recidivas, o que está de acordo com a literatura consultada, com várias referências relativas ao aparecimento frequente de recidivas para estas neoplasias (Brown *et a.l*, 1978; Bostock & Dye, 1979; Hendrick *et al.*, 1994b; Lester *et al.*, 1996; Devauchelle *et al.*, 1997; Doliger & Devauchelle, 1998; Couto & Macy, 1998; Hershey *et al.*, 2000). Observamos no entanto, uma frequência de recidivas, superior, à descrita em outros estudos, que ronda os 30 a 60% (Couto & Macy, 1998; Hershey *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002). O tempo mediano do seu aparecimento foi de 198 dias (6,6 meses) variando entre 19 a 515 dias. Apenas três animais apresentaram tempos de primeira recidiva superiores a um ano.

Foram registadas quatro mortes associadas a metastização neoplásica dos sarcomas, 7,8% dos animais avaliados neste estudo. Este valor pode ser um número abaixo do valor real, pois, alguns animais permaneciam em risco no final do estudo e não foram clinicamente avaliados e noutros casos, a sua detecção não foi possível pela ausência de necrópsias. Alguns estudos sugerem que a metastização destas neoplasias seja mais frequente, do que inicialmente se pensava, atingindo 10 a 25% dos gatos (Couto & Macy *et al.*, 1998; Cronin *et al.*, 1998; Hershey *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2002). Pela sintomatologia descrita as metástases ocorreram sobretudo no pulmão, tendo sido confirmada por radiografia torácica em dois casos e nos gânglios linfáticos. Estudos anteriores citam os pulmões como os órgãos mais afectados, seguidos dos gânglios linfáticos regionais, rim, baço, intestino, pele, esqueleto e fígado (Brown *et al.*, 1978; Bostock & Dye, 1979; Hendrick *et al.*, 1994b; Esplin *et al.*, 1996; Rudmann *et al.*, 1996; Davidson *et al.*, 1997; Gemmil, 1998; Couto & Macy, 1998; Cronin *et al.*, 1998; Hershey *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2002).

A avaliação do estado imunológico relativamente ao FeLV (Vírus da Leucemia Felina) é importante em gatos com sarcomas, já que todos os gatos positivos ao FeSV (Vírus do Sarcoma Felino) são positivos para o FeLV (Bergman, 1998). O FeLV é um retrovírus exógeno capaz de incorporar ou transportar oncogenes, sendo altamente prevalente no gato. A infecção pelo FeLV pode resultar em numerosas doenças mieloproliferativas e hematológicas no gato, eventualmente fatais (Hardy, 1981; Hoover

& Mullins, 1991; Callanan *et al.*, 1996; Quackenbush *et al.*, 1996; Deslile & Foumenteze, 1997; Pereira & Tavares, 1998). O FeSV é um vírus formado a partir da recombinação de genes do FeLV com pelo menos um dos proto-oncogenes felinos, e está implicado no desenvolvimento de sarcomas multicêntricos no gato (Snyder, 1969; Hoover & Mullins, 1991; Bergman, 1998; Pereira & Tavares, 1998). Apesar de um estudo epidemiológico não o relacionar com os sarcomas associados à vacinação (Ellis *et al.*, 1996), o papel da subfamília oncornaviridae dos retrovirus exógenos e endógenos na patogenia dos sarcomas felinos, apesar de desconhecido, não deve ser esquecido, particularmente nos sarcomas de rápido aparecimento (muitas vezes três a nove meses após a vacinação) situação mais compatível com a oncogénese viral do que com o intervalo pródromal mais extenso dos tumores associados às reacções inflamatórias crónicas (Kass *et al*, 1993; Hendrick *et al.*, 1994a; Hendrick, 1998; Madewell *et al.*, 2001). Madewell e colaboradores (2001) detectaram a presença de partículas retrovirais nas células neoplásicas de um sarcoma de gato, serologicamente positivo ao FeLV. No nosso estudo, apenas obtivemos informação serológica para quatro animais, negativos ao FeLV, pelo que não foi possível estudar a sua influência na sobrevida ou na biopatologia das neoplasias.

Os sarcomas do nosso estudo, à semelhança do descrito na literatura consultada, constituíram um grupo neoplásico de grande heterogeneidade na sua aparência microscópica, apesar de semelhantes do ponto de vista clínico e biológico (Devauchelle *et al.*, 1997; Doliger & Devauchelle, 1998). No geral os sarcomas estudados apresentaram células neoplásicas fusiformes, sugestivas de origem mesenquimatosa, e diferenciação variável, no sentido do fibroblasto, miofibroblasto, condroblasto, lipoblasto, perineural ou outras. Também foi possível observar pleomorfismo citonuclear acentuado, elevada actividade mitótica, presença de extensas áreas de necrose e infiltrado inflamatório peritumoral abundante, o que está de acordo com o observado noutros estudos (Hendrick & Brooks, 1994; Doddy *et al.*, 1996; Esplin *et al.*, 1996; Duarte, 2001; Couto *et al.*, 2002).

Os sarcomas estudados foram enquadrados nos tipos histológicos sarcomas miofibroblásticos, fibrossarcomas, mixofibrossarcomas, sarcomas com células gigantes, condrossarcomas mesenquimatosos extraesqueléticos, tumores malignos das bainhas nervosas, lipossarcoma desdiferenciado e sarcoma rabdóide de acordo com os critérios morfológicos observados e o padrão fenotípico das células neoplásicas baseada na

Classificação de Tumores das Partes Moles e Ósseos da OMS (Fletcher *et al.*, 2002b). Dado o marcado pleomorfismo celular de cada neoplasia do nosso estudo, sentimos necessidade de recorrer a uma classificação histológica mais precisa e actualizada, para além da designação de sarcomas pós vacinais, da Classificação Histológica dos Tumores Mesenquimatosos da Pele e Partes Moles dos Animais Domésticos, da OMS (Hendrick *et al.*, 1998). Esta necessidade foi também partilhada por alguns autores (Couto *et al.*, 2002). Na nossa opinião se a amostragem fosse superior, encontraríamos maior diversidade de tipos histológicos, pois verificamos na literatura consultada, referências da ocorrência de outros tipos histológicos no gato, como o osteossarcoma (Hendrick & Brooks, 1994; Macy & Bergman, 1995; Doddy *et al.*, 1996; Lester *et al.*, 1996; Coyne *et al.*, 1997; Heldmann *et al.*, 2000; Hershey *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001), o rabdomiossarcoma (Hendrick & Brooks, 1994; Macy & Bergman, 1995; Lester *et al.*, 1996; Doliger & Devauchelle, 1998), o fibrohistiocitoma maligno (Hendrick & Brooks, 1994; Doddy *et al.*, 1996; Lester *et al.*, 1996; Coyne *et al.*, 1997; Doliger & Devauchelle, 1998; Hershey *et al.*, 2000), o hemangiossarcoma (Doliger & Devauchelle, 1998) para além de sarcomas indiferenciados (Doddy *et al.*, 1996; Lester *et al.*, 1996; Doliger & Devauchelle, 1998; Cohen *et al.*, 2001). Assim os SPM no gato, parecem ser um grupo complexo de neoplasias heterogéneas, com vários tipos histológicos, à semelhança do que se encontra descrito para os humanos (Miettinen *et al.*, 1982; Fletcher et al., 2002a). Sendo assim, esta espécie animal pode representar grande potencialidade na investigação dos SPM humanas, já que a sua caracterização está por vezes limitada pela sua rara ocorrência no Homem representando menos de 1% de todos os tumores malignos (Pape *et al.*, 1992; Calonje & Fletcher, 1995; Fletcher *et al.*, 2002a; Hasegawa *et al.*, 2002).

O tipo histológico mais observado foi o sarcoma miofibroblástico, correspondendo a 42,5% das neoplasias do estudo, ao contrário do observado noutros estudos em que o fibrossarcoma foi o tipo histológico mais frequente (Brown *et al.*, 1978; Bostock & Dye, 1979; Hendrick & Goldschmidt, 1991; Hendrick *et al.*, 1992, Esplin *et al.*, 1993; Kass *et al.*, 1993; Hendrick & Brooks, 1994; Hendrick *et al.*, 1994b; Doddy *et al.*, 1996; Davidson *et al.*, 1997; Cronin *et al.*, 1998; Hershey *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001; Madewell *et al.*, 2001; Couto *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2002). Este facto pode ser devido à impossibilidade de distinguir morfologicamente estas duas entidades, pela coloração de H&E, aliada à ausência de consenso na classificação histológica dos SPM usada em Medicina Veterinária, pois o grande polimorfismo dos

sarcomas de células fusiformes no gato implica por vezes, várias classificações, em diferentes publicações (Hendrick & Brooks, 1994; Doliger & Devauchelle, 1998). Na literatura consultada encontramos referências da ocorrência de sarcomas miofibroblásticos no gato (Dubielzig *et al.*, 1993; Doliger & Devauchelle, 1998), assim como da presença de miofibroblastos, estreitamente associadas aos sarcomas felinos ou na composição da sua pseudocápsula (Hendrick & Brooks, 1994; Hendrick *et al*, 1994b; Couto *et al.*, 2002), tendo sido implicados várias vezes na sua patogenia (Hendrick *et al*, 1994b; Doddy *et al.*, 1996; Hendrick *et al.*, 1998a). Já foi possível, inclusive, a sua identificação através estudos de ultraestrutura (Dubielzig *et al.*, 1993; Hershey *et al.*, 2000; Madewell *et al.*, 2001). Com o advento da imunohistoquímica, os miofibroblastos tornaram-se "popularizados", sendo reconhecidos numa grande variedade de tecidos normais e patológicos. As cicatrizes e as fibromatoses, pelo menos inicialmente são compostas por miofibroblastos proliferativos, contudo à medida que as lesões envelhecem ou hialinizam, as células com as características de fibroblastos tornam-se progressivamente mais proeminentes (Mentzel & Fletcher, 1997; Coffin & Fletcher, 2002). Além de participarem em respostas reparativas e na resposta estromal de neoplasias, representam um componente muito importante de numerosas neoplasias mesenquimatosas malignas e benignas (Miettinen, 1988; Roche, 1990; Mentzel & Fletcher, 1997). Para alguns autores, os sarcomas miofibroblásticos são provavelmente mais frequentes do que se pensava e incluem grande variedade de formas clínico-patológicas. O estabelecimento do miofibroblasto como tipo celular distinto não só veio aumentar o nosso entendimento da biologia das células mesenquimatosas e da sua plasticidade fenotípica, como também veio permitir a caracterização mais apurada de lesões mesenquimatosas reactivas, benignas ou malignas (Mentzel & Fletcher, 1997; Couto *et al.*, 2002).

O fibrossarcoma representou 16,1% das neoplasias estudadas e o seu diagnóstico foi essencialmente baseado na aparência microscópica e na ausência ou baixa expressão de outros marcadores, com excepção da vimentina (Weiss & Goldblum, 2001; Fisher *et al.*, 2002). A frequência deste tipo neoplásico foi inferior à observada noutros estudos, como já referido. Em Oncologia Humana, este diagnóstico passou a ser considerado cada vez menos frequente com o advento da microscopia electrónica e da imunohistoquímica em combinação com a aplicação de critérios morfológicos mais rigorosos (Calonje & Fletcher, 1995) sendo em grande parte um diagnóstico de exclusão (Weiss & Goldblum, 2001).

Neste estudo a frequência relativa de mixofibrossarcomas foi de 14,5%. Nestas neoplasias foi possível observar a presença de critérios morfológicos semelhantes ao descrito na literatura, como a presença de estroma variavelmente mixóide, áreas hipocelulares, crescimento multinodular ou presença de septos incompletos, padrão vascular curvilinear característico e diferenciação miofibroblástica focal (Rubin & Fletcher, 2000; Fletcher, 2000; Weiss & Goldblum, 2001; Mentzel *et al.*, 2002). Na literatura veterinária consultada encontramos referências à ocorrência no gato de mixofibrossarcomas (Lester *et al.*, 1996) mixossarcomas (Hendrick *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 2001) e de fibrohistiocitoma maligno (FHM) do tipo mixóide (Doliger & Devauchelle, 1998). O termo FHM pretendia designar as neoplasias caracterizadas pela presença simultânea de células neoplásicas de aspecto mesenquimatoso e outras de aspecto histiocitário, com estroma de colagéneo relativamente abundante. Poderiam possuir focos de metaplasia óssea ou cartilagínea ou células neoplásicas com fenótipo miofibroblástico. Quando se observavam numerosas células gigantes multinucleadas ou estroma mixóide eram subdivididos em FHM de células gigantes ou mixóide (Kerlin & Hendrick, 1996; Doliger & Devauchelle, 1998; Hendrick *et al.*, 1998). A designação de FHM foi amplamente utilizada na Medicina Humana, tendo-se considerado um dos sarcomas das partes moles mais frequente, podendo aparecer em cinco variantes – pleomórfico, de células gigantes, mixóide, inflamatório e angiomatoide (Fletcher, 2000). No entanto a família FHM tem vindo progressivamente a ser desmembrada, tendo em conta o padrão fenotípico e as características genéticas das células neoplásicas, que deixaram de suportar a ideia de diferenciação histiocitária. A caracterização da expressão antigénica das células neoplásicas dos sarcomas não só permitiu desafiar o conceito de fibrohistiócito como permitiu o reconhecimento de outro tipo de neoplasias que possam ser confundidas com os sarcomas e dentro dos sarcomas pôde permitir subclassificar sarcomas pleomórficos, muitos deles classificadas em categorias alargadas (Calonje & Fletcher, 1995).

Os sarcomas com células gigantes ocorreram em 12,9% das neoplasias estudadas. Eram caracterizadas pela presença abundante de células gigantes multinucleadas do tipo osteoclasto. Nestas neoplasias a hemorragia com depósitos de hemosiderina ocorreu frequentemente (75% das lesões) à semelhança do descrito na literatura (Fletcher, 2000; Weiss & Goldblum, 2001; Nascimento, 2002). Encontramos referências da ocorrência de FHM do tipo células gigantes no gato, correspondendo ao

subtipo de FHM mais frequente, no gato, sendo também designado como tumor de células gigantes das partes moles (Doliger & Devauchelle, 1998; Hendrick *et al.*, 1998).

Foram observados três condrossarcomas mesenquimatosos extra-esqueléticos (4,2%) na série de neoplasias do nosso estudo. A ocorrência de condrossarcomas está descrita no gato (Brown *et al.*, 1978; Hendrick & Brooks, 1994; Lester *et al.*, 1996; Doliger & Devauchelle, 1998; Hershey *et al.*, 2000). O termo "mesenquimatoso" pretende descrever o padrão bimórfico destas lesões, pois além de serem compostas por ilhotas de cartilagem hialina, também são constituídas por outro componente celular menos diferenciado (Fletcher, 2000; Weiss & Goldblum, 2001). O termo "extra-esquelético" pretende distinguir estas neoplasias das ocorridas no osso.

Foram observados dois tumores malignos das bainhas nervosas (3,2%), uma destas neoplasias apresentava-se estreitamente relacionada com a presença de nervos periféricos. A sua identificação foi essencialmente devido à sua aparência morfológica e à expressividade difusa para o marcador proteína S-100. Encontramos na literatura consultada, referências à ocorrência no gato de neurofibrossarcomas (Brown *et al.*, 1978; Doddy *et al.*, 1996) e de tumores das bainhas nervosas periféricas (Hendrick *et al.*, 1998).

Uma das neoplasias foi classificada como lipossarcoma desdiferenciado. Os lipossarcomas estão descritos no gato, mas são considerados raros (Esplin *et al.*, 1996). A designação de lipossarcoma desdiferenciado define uma neoplasia com característica de lipossarcoma bem diferenciado mas que mostra transição, por vezes abrupta, para outro sarcoma não lipogénico (Fletcher, 2000; Weiss & Goldblum, 2001; Deitos & Pedentour, 2002). No nosso estudo, este componente estava representado pela área com células de padrão fusocelular e crescimento infiltrativo, enquadrável num sarcoma miofibroblástico.

A neoplasia classificada como sarcoma rabdóide possuía critérios histológicos particulares, caracterizando-se pela presença predominante de células de formas redondas, citoplasma abundante e núcleo redondo, por vezes mais do que um, encostado à periferia. Morfologicamente era semelhante ao sarcoma rabdóide extra-renal descrito na literatura humana, não tendo sido possível, no entanto, observar a presença de inclusões intracitoplasmáticas acidófilas frequentemente observadas naquele tipo histológico (Weiss & Goldblum, 2001; Schofield, 2002). O termo sarcoma rabdóide pretende descrever a lesão em termos de morfologia e não de diferenciação celular.

Em algumas neoplasias foi possível a observação de células com numerosos vacúolos lipidícos ou de células dispersas que expressaram antigénios específicos para células musculares, que podem levar a confusão com o diagnóstico de lipossarcoma ou rabdomiossarcoma, contudo uma observação mais cuidada permitiu interpretar estas imagens como a consequência da invasão da hipoderme e tecido muscular pela células neoplásicas.

Todas as neoplasias do nosso estudo revelaram imunorreactividade para o marcador anti-vimentina, à semelhança do observado em estudos anteriores (Hendrick & Brooks, 1994; Duarte, 2001; Madewell *et al.*, 2001; Couto *et al.*, 2002). Apesar da sua importância diagnóstica, nos últimos tempos, ter vindo a diminuir em relação a outros filamentos intermédios, existem alguns casos em que a sua forte expressão pode sugerir um diagnóstico. Como este filamento é ubiquitário também serve de controlo positivo intrínseco para a avaliação da preservação antigénica do tecido aos outros filamentos intermédios (Denk *et al.*, 1983; Battifora, 1991; Folpe & Gown, 2001). A desmina foi identificada nas células neoplásicas num padrão focal. Em 77,4% das neoplasias estudadas, foi possível reconhecer a expressão antigénica de α-actina de músculo liso, pelas células neoplásicas. Os padrões de imunomarcação observados sugerem diferenciação miofibroblástica. É geralmente aceite que os miofibroblastos representam células "transicionais" entre fibroblastos e células musculares lisas sendo caracterizados pelos seus imunofenótipos diversos, podendo ocorrer variações dentro da mesma lesão à medida que esta progride (Mentzel & Fletcher, 1997). Em termos de marcadores de imunohistoquímica, têm sido identificados quatro fenótipos que mostram além da imunorreactividade às β- e γ-actinas, imunorreactividade à vimentina (tipo V), vimentina e desmina (tipo VD), vimentina e α-actina de músculo liso (tipo VA) ou vimentina, α-actina de músculo liso e desmina (tipo VAD) (Mentzel & Fletcher, 1997; Coffin & Fletcher, 2002). No nosso estudo observamos o tipo VAD em 3,2% das neoplasias, o tipo VD em 3,2%, sendo o tipo mais frequentemente observado o tipo VA em 74,2 % das neoplasias. Como não utilizamos marcadores para evidenciar as β- e γ-actinas não foi possível identificar o tipo V. Assim os sarcomas estudados enquadraram-se em vários tipos histológicos mas assentaram num fenótipo celular comum: o miofibroblasto. Isto reforça a ideia de uma origem comum para todas estas neoplasias e que o miofibroblasto desempenha um papel fundamental nos processos de cancerização e de evolução da doença.

A expressão difusa da proteína S-100 ocorreu nos TMBN, CME e LPSA da nossa série de neoplasias, auxiliando o seu diagnóstico, a marcação focal no SM (7,1%) e MFSA (11,1%) foi interpretada como marcação aberrante.

A IHQ apresentou valor muito limitado no diagnóstico dos sarcomas de diferenciação mixóide. Apesar da importância da IHQ como precioso método auxiliar de diagnóstico, a observação cuidada das características morfológicas no exame H&E nunca pôde ser dispensada, sobretudo no diagnóstico de MFSA, CME, LPSA e SRD.

Os quatro sarcomas localizados na mama revelaram ausência de expressão ao marcador citoqueratina 14, em geral presente nas células mioepiteliais (Wetzels *et al.*, 1989) excluindo a hipótese de estarmos a abranger no nosso estudo mioepiteliomas malignos da mama. Um sarcoma da mama foi diagnosticado como fibrossarcoma, os restantes três apresentaram diferenciação miofibroblástica, tendo sido considerados sarcomas miofibroblásticos. Na literatura consultada, encontramos referências bibliográficas da ocorrência de sarcomas mamários na gata, cujas células neoplásicas revelaram características ultraestruturais e de imunofenótipo compatíveis com miofibroblastos, sugerindo que em determinadas circunstâncias pode ocorrer a transformação de algumas células mesenquimatosas em miofibroblastos (Hayden, 1986). A avaliação da expressão de citoqueratinas para todos os sarcomas do nosso estudo, não foi possível devido a escassez de material histológico. No entanto não desvalorizamos esta avaliação, pois está descrita para os sarcomas do gato (Dubielzig *et al.*, 1993; Hendrick & Brooks, 1994; Duarte, 2001). Já foram utilizados outros anticorpos no estudo dos sarcomas felinos tais como o EMA, CD34, Factor VIII, mioglobina, miosina e GFAP, contudo estas neoplasias permanecem mal caracterizados em termos de imunomarcação, pois a casuística utilizada nestes estudos foi baixa (Dubielzig *et al.*, 1993; Hendrick & Brooks, 1994; Duarte, 2001). Em lesões individuais é difícil avaliar os benefícios da IHQ, contudo é particularmente útil no conhecimento da biologia destas neoplasias e na determinação das suas linhas de diferenciação celular.

O padrão de crescimento dos sarcomas estudados foi variável, predominando o crescimento infiltrativo com dissociação dos tecidos vizinhos pelas células neoplásicas. Este padrão foi mais frequentemente observado nos tipos histológicos SM, FSA e TMBN, enquanto que os tipos histológicos MFSA, SCG e CME apresentaram sobretudo padrão de crescimento expansivo tal como descrito na literatura (Fletcher, 2000; Weiss & Goldblum, 2001)

A necrose esteve presente na maioria dos sarcomas estudados (80,6%). A hemorragia foi observada em 29% das neoplasias estudadas, tendo sido mais frequentemente observada no SCG, onde também ocorreram depósitos de hemosiderina. A calcificação foi rara (8,1%) e observada essencialmente, próximo a áreas de necrose e de diferenciação condróide.

A presença de células neoplásicas multinucleadas foi observada em 29,0% das neoplasias estudadas, frequência inferior, quando comparada com estudos anteriores (Couto *et al.*, 2002). Neste estudo reconhecemos dois tipos distintos de células gigantes, as neoplásicas e as reactivas não neoplásicas ou do tipo osteoclasto, baseado essencialmente no seu aspecto morfológico e na sua distribuição. Esta distinção parece importante, na medida em que alguns investigadores associam a presença de células neoplásicas multinucleadas a fenótipos tumorais menos diferenciados, grau histológico elevado e a prognóstico reservado, ao contrário do que está associado às células do tipo osteoclasto (Jösten e Rudolph, 1997). Em dois estudos consultados, esta distinção foi efectuada pelo padrão de imunomarcação observado, utilizando marcadores associados a células macrofágicas (CD68 e CD18) para a identificação das células do tipo osteoclasto, e evidenciando a sua baixa actividade proliferativa pela ausência de marcação ao anticorpo anti-Ki67 (Jösten & Rudolph, 1997; Couto *et al.*, 2002).

O tipo histológico dos sarcomas nem sempre fornece informação suficiente em relação ao decurso clínico e tipo de tratamento a seguir. A graduação baseada nos parâmetros histológicos avalia o grau de malignidade e é considerada um dos principais factores de prognóstico para os SPM em Oncologia Humana, no que respeita à probabilidade de metastização à distância e taxa de sobrevida total (Fletcher et al., 2002a). A determinação do grau histológico tem sido descrita para várias neoplasias animais, inclusive para os sarcomas do gato (Davidson *et al.*, 1997; Couto *et al.*, 2002). No nosso estudo, em cada tipo histológico ocorreram neoplasias de grau 3. A frequência de neoplasias de grau 3 (82,3%) foi superior à verificada num estudo anterior (Couto *et al.*, 2002). Os tipos histológicos MFSA, SCG, LPSA e SRD da nossa série de neoplasias apresentaram sempre grau 3. As neoplasias de grau 2 pertenciam maioritariamente (70%) ao tipo histológico SM, ocorrendo também nos tipos histológicos FSA (10%), CME (10%) e TMBN (10%). A neoplasia de grau 1 observada era do tipo histológico SM.

O grau histológico esteve associado à localização tumoral (p=0,02), tendo-se verificado que 70% das neoplasias de grau 2 e 88,4% das neoplasias de grau 3 estavam localizadas na parede costal. A presença de células neoplásicas multinucleadas e de hemorragia ocorreu em 33,3% das neoplasias de grau 3. Estas observações estão de acordo com o observado num estudo anterior que relaciona as neoplasias de localização anatómica em áreas de eleição para a vacinação, com características histopatológicas de maior malignidade relativamente às localizadas em outras regiões (Doddy *et al.*, 1996). O grau histológico esteve associado à idade dos gatos (p=0,01), tendo-se observado a tendência dos indivíduos mais velhos para apresentarem neoplasias de grau 3, o que pode estar relacionado com a depressão do seu estado imunológico.

A presença de infiltrado inflamatório peritumoral foi observada em 93,5% dos sarcomas do nosso estudo. Alguns autores sugerem que a pseudocápsula de miofibroblastos, geralmente presente nestas neoplasias, será responsável por exercer uma barreira mecânica que impede a penetração de linfócitos e de macrófagos na massa neoplásica, formando-se agregados foliculares peritumorais (Couto *et al.*, 2002). Em vinte e duas neoplasias (35,5%) os infiltrados foram considerados abundantes, caracterizados pela presença de agregados foliculares linfo-granulomatosos, perivasculares e peritumorais. O infiltrado inflamatório foi considerado moderado em vinte e seis neoplasias (41,9%) e baixo em dez neoplasias (16,1%). Apenas quatro (6,5%) dos sarcomas estudados revelaram ausência deste componente.

Em duas neoplasias localizadas na parede costal foi possível identificar agregados de macrófagos com material fagocitado. A natureza do material fagocitado não foi identificada. Outros estudos já descreveram a ocorrência de células com características semelhantes, quer no gato quer em humanos, cujo conteúdo, descrito pelo exame de ultraestrutura como partículas de material cristalino, foi identificado como sendo partículas de alumínio e oxigénio e relacionadas com a administração de vacinas contendo adjuvantes vacinais alumínicos (Hendrick *et al.*, 1992; Madewell *et al.*, 2001; Brenner, 2002). Alguns autores consideram a presença de infiltrado inflamatório peritumoral e de agregados de macrófagos contendo material fagocitado como critérios histopatológicos específicos para os sarcomas em locais de injecção do gato (Doddy *et al.*, 1996; Hendrick *et al.*, 1998; Couto *et al.*, 2002). No nosso trabalho a sua presença esteve relacionada com a localização tumoral, (p=0,000001) e com o grau histológico (p=0,03) reforçando essa ideia.

Os folículos linfóides revelaram heterogeneidade de linfócitos B e T, com predominância de linfócitos com imunofenótipo T. Esta observação está de acordo com o descrito em estudos anteriores (Hendrick, 1998b; Couto *et al.*, 2002). A caracterização da população linfocitária, associada a este tipo tumoral parece importante para desvendar o papel que desempenham na patogenia. Já foi evidenciada imunorreactividade a factores de crescimento, tais como PDGF (factor de crescimento derivado das plaquetas) em linfócitos e ao seu receptor nos macrófagos (Hendrick, 1998b) associados a estas neoplasias. Estes dados sugerem que os linfócitos secretem PDGF para o recrutamento de macrófagos e causam proliferação de fibroblastos. Os factores de crescimento representam reguladores importantes no crescimento celular normal e neoplásico. A co-expressão de factores de crescimento e dos seus receptores, frequentes nos SPM em humanos, pode indicar auto-estimulação do crescimento tumoral e pode reflectir comportamento biológico mais adverso (Calonje & Fletcher, 1995). Para Hendrick (1998b) devem aprofundar-se estudos dos mecanismos imunológicos e inflamatórios nos locais de injecção, pois a utilização de citoquinas, factor de necrose tumoral e interferão, pode revelar-se importante no acto terapêutico.

A proliferação celular é dos processos biológicos mais importantes no crescimento e na manutenção da homeostasia dos tecidos, sendo considerada como importante mecanismo na oncogénese e está relacionada com o comportamento biológico das neoplasias. A avaliação deste parâmetro pode providenciar informação relevante para o prognóstico e diagnóstico sobretudo de lesões de fronteira, por exemplo na distinção de hiperplasia reactiva, displasia e malignidade (Gerdes *et al.*, 1984; van Dierendonck *et al.*, 1991; Cattoretti *et al.*, 1992; Gerdes *et al.*, 1992; Rose *et al.*, 1994; Calonje & Fletcher, 1995; van Diest *et al.*, 1998). No geral, os sarcomas estudados apresentaram elevada actividade mitótica, o que está de acordo com o observado em estudos anteriores (Couto *et al.*, 2002), o que pode ser interpretado como evidência morfológica de rápida proliferação e malignidade.

A contagem de mitoses é um método pouco laborioso de ter acesso à actividade proliferativa das neoplasias, no entanto na sua determinação podem ocorrer erros de contagem, devido essencialmente à espessura do corte, tamanho do campo, detectando apenas as células na fase M, a única em que se torna possível o seu reconhecimento morfológico. A identificação por IHQ de antigénios específicos para células em divisão oferece boa estimativa da fracção de crescimento das células neoplásicas (Rose *et al.*,

1994; van Diest *et al.*, 1998). O antigénio nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear não histona de 36kD altamente conservada entre espécies que actua como co-factor da ADN δ–polimerase na fase S durante a síntese de ADN estando também envolvida nos mecanismos de reparação de ADN (van Dierendonck *et al.*, 1991; Sarli *et al.*, 1994). O clone PC10 reage com um epítope resistente do PCNA, podendo ser utilizado em material histológico embebido em parafina. O PCNA é expresso por células em proliferação e atinge o seu pico na fase S do ciclo celular. Como a sua semi-vida é prolongada (mais de 20 horas) o PCNA pode ser detectado nas células em repouso, isto é na fase G0, além de poder ser expresso por células não cíclicas, nas quais estejam a decorrer fenómenos de reparação de ADN (Mitchie *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 1994; Sarli *et al.*, 1994). Além da determinação da fracção proliferativa das neoplasias animais, o índice de PCNA tem sido associado a comportamento biológico adverso (Alves, 1999; Queiroga & Lopes, 2002). No nosso trabalho o PCNA, revelou-se bom marcador da fracção de células em proliferação e apresentou associação estatística significativa com o índice mitótico, método clássico de acesso à actividade proliferativa (p=0,003). Encontramos associação estatística significativa com as variáveis necrose (p=0,006) e grau histológico (p=0,01).

A detecção por IHQ da proteína p53 pode estar correlacionada com uma mutação no gene supressor tumoral p53, muitas vezes associada quer à iniciação do cancro quer à sua progressão, nos humanos e nos animais (Iggo *et al.*, 1990; Hollstein *et al.*, 1991; Soini *et al.*, 1992; Greenblatt *et al.*, 1994; Hall & Lane, 1994; Calonje & Fletcher, 1995; Alves, 1999; Nambiar *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2002; Koenig *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2002). Nos tumores mesenquimatosos humanos o gene p53 está alterado em 25 a 65% dos casos (Yoo *et al.*, 2002). O produto expresso pelo gene p53 é uma fosfoproteína nuclear de 53kD, composta por 393 aminoácidos, que actua como supressor tumoral (Hollstein *et al.*, 1991; Soini *et al.*, 1992; Baas *et al.*, 1994; Nambiar *et al.*, 2001). Em resposta a stress genotóxico, os níveis da proteína p53 aumentam por mecanismos ainda não bem esclarecidos. Este aumento determina estagnação do ciclo celular na fase G1 ou induz a apoptose (morte celular programada). A estagnação das células em fase G1 permite à célula reparar o ADN danificado, evitando a propagação de lesões genéticas às células filhas. O ciclo celular é retomado assim que alterações do ADN são reparadas, e no caso das alterações serem muito extensas, impossíveis de reparar, a célula entra em apoptose. Assim a replicação de ADN danificado progride em

células com proteina p53 mutante ou ausente, gerando clones de células geneticamente aberrantes dando origem a células malignas (Soini *et al.*, 1992; Pellegata & Ranzani, 1996; Bergman, 1998). As alterações do gene p53 são as alterações genéticas mais frequentes que ocorrem em tumores humanos e já foram detectadas mutações pontuais e deleções génicas (perdas alélicas) numa grande variedade de tumores (Hollstein *et al.*, 1991; Pellegata & Ranzani, 1996).

O mecanismo de acção da p53 na paragem do ciclo celular na fase G1 parece estar relacionada com a activação da transcrição do gene p21. A proteína p21 bloqueia a transição da fase G1 para a fase S inibindo directamente a actividade cinase de várias ciclinas/compexos ciclinas cinase dependentes e forma complexos com o antigénio celular nuclear de proliferação (PCNA) inibindo a replicação do ADN mas não os mecanismos de reparação (Gottliebe & Oren, 1996; Pellegata & Ranzani, 1996; Willie, 1997; Khan *et al.*, 1999).

A semi-vida da proteína p53 nas células normais é de cerca de 20 a 30 minutos enquanto que a maioria das proteínas mutantes tem uma semi-vida superior (várias horas). Assim o tipo selvagem da proteína não é detectado geralmente pela IHQ, enquanto que as células neoplásicas exibem marcação positiva à p53, tipicamente nuclear. A expressão da proteína mutante é em geral consequência da sua estabilização, que resulta de mutações pontuais que modificam a conformação da proteína, aumentando a sua estabilidade, assim a imunomarcação do tecido está associada com mutações do gene p53 ao nível do ADN (Soini *et al.*, 1992; Baas *et al.*, 1994; Pellegata & Ranzani 1996; Nambiar *et al.*, 2001).

No local de inoculação de vacinas pode ocorrer inflamação, necrose e proliferação celular tornando-se necessária proteína p53 normal para uma reparação apropriada de ADN ou para induzir a apoptose em células com alterações no ADN irreparáveis (Nambiar *et al.*, 2000). O gene p53 do gato, partilha 82% de homologia com o gene humano. Foi completamente sequenciado e localizado no cromossoma felino E1 (Nambiar *et al.*, 2000). Já foram detectadas por PCR mutações do gene p53 em várias neoplasias do gato (fibrossarcoma, carcinoma mamário e escamoso oral e cutâneo) (Mayer *et al.*, 2000). A detecção das mutações do gene p53 é mais sensível utilizando técnicas de PCR e sequenciação nucleotídica, mas estas técnicas são laboriosas e dispendiosas sobretudo em tecidos fixados, pelo que se torna aceitável a utilização de métodos indirectos como a IHQ para predizer estas mutações (Iggo *et al.*, 1990; Baas *et al.*, 1994; Nambiar *et al.*, 2000). A detecção da proteína p53 através de IHQ em

sarcomas das partes moles do gato já foi descrita, tendo-se confirmado por PCR mutações pontuais no gene p53 tendo-se estabelecido correlação directa entre mutações do gene p53 e a sua expressão por IHQ. Estas mutações resultaram em substituição de aminoácidos (Nambiar *et al.*, 2000; Nambiar *et al.*, 2001).

Neste estudo ao examinar a expressão da proteína p53 nos sarcomas, procuramos de forma indirecta possíveis mutações do gene p53. Observamos expressão nuclear da proteína p53 em 20,8% das neoplasias analisadas. As neoplasias que evidenciaram expressão de p53 apresentaram critérios histopatológicos como a necrose em 70% dos casos, grau histológico 3 e índices mitótico e proliferativo altos estando localizadas preferencialmente na parede costal (80% dos casos), sugerindo que as mutações do gene p53 possam estar envolvidas na patogénese e/ou na progressão destas neoplasias, à semelhança do observado em estudos já realizados (Nambiar *et al*, 2000; Nambiar, *et al.*, 2001).

A instabilidade genética é uma das características das células neoplásicas e a expressão gradual de alterações genéticas com aumento da malignidade histológica tem sido implicada na carcinogénese (Hollstein *et al.*, 1991; Böcking *et al.*, 1994; Pihan & Doxsey, 1999; Baily 2001; Plaja *et al.*, 2001; Krishnamurthy & Sneige, 2002). A maioria das neoplasias sólidas exibe aberrações cromossómicas, sugestivas de aneuploidia e mesmo as células diploídes de ADN mostram frequentemente desarranjos no emparelhamento de cromossomas (Auer *et al.*, 1989; Loeb, 1991;Turker *et al.*, 1998). A quantificação do conteúdo de ADN nuclear tem sido progressivamente mais utilizada como auxiliar do diagnóstico e na graduação de tumores malignos. A quantidade de ADN nuclear pode ser modificada pelos seguintes mecanismos: replicação, poliploidização, ganho ou delecção. Cada um destes eventos provoca alterações no tamanho e no número de cromossomas (Böcking *et al.*, 1994; Enchev, 1998). A aneuploidia de ADN é o parâmetro citométrico equivalente da aneuploidia cromossómica avaliada pela citogenética e serve de marcador neoplásico, reflectindo alterações genómicas de larga escala devido à instabilidade genética e de marcador de prognóstico (Haroske *et al.*, 2001).

Vários estudos de citometria de imagem e de fluxo encontraram associação entre a ploidia de ADN e o grau histológico (Pape *et al.*, 1992; Clemo *et al.*, 1994; Böcking *et al.*, 1994; vanVelthoven *et ai.*, 1995b) a metastização (Lee *et al.*, 1994) a recorrência (Böcking *et al.*, 1994; Lee *et ai.*, 1994) e a progressão da doença (Sazaki *et al.*, 1992;

Zarbo, 1995; Subdo *et al.*, 2002). No nosso estudo 82,9 % dos sarcomas analisados apresentaram conteúdo de ADN aneuplóide e apenas 17,1 % eram diplóides de ADN. Das neoplasias aneuplóides de ADN, 32,4% possuíam mais de um clone de células aneuplóides, e foram consideradas multiplóides de ADN.

Não foi possível correlacionar a ploidia de ADN com as variáveis clínico-patológicas avaliadas, estudos de ploidia em neoplasias uroteliais de cão e de bovino obtiveram resultados semelhantes (Clemo *et al.*, 1994; Seixas, 1999). Na literatura consultada, não encontramos qualquer referência sobre a quantificação de ADN nuclear nos sarcomas do gato. Pela análise das frequências relativas, observamos que as neoplasias diplóides de ADN ocorreram principalmente no grupo dos sarcomas com padrão fusocelular predominante enquanto que as neoplasias com diferenciação condróide, mixóide, perineural ou com células gigantes do tipo osteoclasto, revelaram sobretudo aneuploidia de ADN. A maioria das neoplasias multiplóides de ADN apresentou grau histológico 3. As alterações genéticas progressivas podem produzir propriedades fenotípicas associadas à malignidade, tais como, rápido crescimento e capacidade de metastização (Auer *et al.*, 1989; Shackney & Shankey, 1997) e lesões aneuplóides têm tendência a apresentar células menos diferenciadas (Nenning *et al.*, 1997). As neoplasias multiplóides de ADN estão associadas a comportamento biológico mais agressivo (Lorenzato *et al.*, 2000; Subdo *et al.*, 2001). A presença de hemorragia, calcificação e células neoplásicas multinucleadas foram eventos observados com maior frequência nas neoplasias aneuplóides de ADN, enquanto que a expressão de p53 foi exclusivamente observada na categoria dos aneuplóides e multiplóides de ADN.

O facto de que a maioria dos sarcomas estudados apresentaram aneuploidia de ADN e grau histológico elevado pode reflectir-se no comportamento biológico agressivo destas neoplasias e sugerir que possam estar envolvidos, no processo de carcinógenese, fenómenos de instabilidade genética com repercussões nas alterações cromossómicas numéricas, evento já descrito na literatura (Duesberg *et al.*, 1998; Duesberg, 1999).

O índice de ADN (IA) dos sarcomas variou entre 1,03 e 2,17 convencionando-se que IA= 1 (± 2sd) ocorre em sarcomas diplóides de ADN. Relativamente ao IA verificamos a existência de associação estatisticamente significativa entre este parâmetro citométrico e o infiltrado inflamatório ($p=0,03$). Os sarcomas de IA alto apresentavam predominantemente grau 3 e tendiam a apresentar tipos histológicos sem

padrão fusocelular predominante (p=0,02). A expressão da proteína p53 foi mais frequentemente observada nas neoplasias de IA alto.

A detecção de células verdadeiramente aneuplóides >5c e >9c é importante por poderem ser marcadores de instabilidade e agressividade das neoplasias (Böcking *et ai.*, 1994; van Velthoven *et ai.*, 1995b; Lorenzato *et al.*, 2000; Subdo *et al.*, 2002). Vários estudos encontraram correlação entre o número de células >5c e o grau (Siitonen *et al.*, 1993; Schapers *et ai.*, 1993; van Velthoven *et al.*,1995), o estadio (Schapers *et ai.*, 1993; Nenning *et ai.*, 1997) e a progressão da doença (Schapers *et al.*, 1993) nomeadamente para os sarcomas humanos (Mitchie *et al.*, 1994). A presença de baixo número de células aberrantes em sarcomas diplóides pode ser um marcador de agressividade biológica ou eventualmente podem constituir populações celulares de tal forma aberrantes que não são viáveis. A avaliação destas fracções celulares tem sido utilizada em alguns estudos na classificação da ploidia (Subdo *et al.*, 2002; Dias, 2003). Nestes estudos, a presença de fracções superiores a 1% de células com conteúdos de ADN superiores a 5c e 9c, são, por si só indicadores de aneuploidia.

Quando associamos as variáveis citométricas > 2,5c, >5c e >9c com os vários parâmetros patológicos verificamos tendência dos tipos histológicos sem padrão fusocelular predominante, para possuírem estes parâmetros altos ou seja elevado número de células com conteúdo aberrante de ADN. Fracções elevadas de células com conteúdo de ADN superior a 5c e a 9c revelaram associação estatística significativa com a hemorragia (p=0,05 e p=0,02). Os sarcomas com os parâmetros > 9c altos apresentaram sempre grau 3 (p=0,04) e aparecerem apenas localizadas na parede costal (p=0,04). A expressão da proteína p53 ocorreu predominantemente em sarcomas com os parâmetros >2,5c, >5c e >9c altos.

A expressão da proteína p53 foi mais frequentemente observada em neoplasias aneuplóides de ADN, IA e parâmetros >2,5c, >5c e >9c altos, o que pode reflectir o facto de que mutações no gene p53 sejam impedimento da reparação eficaz das anomalias na molécula de ADN. A progressão das células para a aneuploidia e instabilidade genética está muitas vezes associada ao desenvolvimento adicional de anormalidades do gene p53 (Shackney & Shankey, 1997).

Um dos principais objectivos na investigação oncológica é a identificação de biomarcadores específicos com significado prognóstico (Rose *et al.*, 1994; Krishnamurty & Sneige, 2002). A identificação de alguns desses parâmetros já foi

possível para algumas neoplasias animais (Clemo *et al.*, 1994; Queiroga & Lopes, 2002), nomeadamente para os SPM do gato. A localização tumoral (Bostock & Dye, 1979; Hendrick *et al.*, 1994b; Hershey *et al.*, 2000), o índice mitótico (Bostock & Dye, 1979), o tipo de excisão cirúrgica (Bostock & Dye, 1979; Hershey *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002), as margens cirúrgicas livres de células neoplásicas (Cronin *et al.*, 1998, Doliger & Devauchelle, 1998; Hershey *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2002), o tamanho da neoplasia, a presença de metástases e a precocidade da radioterapia adjuvante (Cohen *et al.*, 2001) já foram significativamente associados com a sobrevida total. Neste trabalho foi nosso propósito o reconhecimento de factores de prognóstico de entre os parâmetros estudados. Obtivemos valores estatisticamente significativos para as variáveis, tamanho das neoplasias, raça dos gatos, padrão de crescimento e necrose das neoplasias, expressão da proteína p53 e fracções nucleares com conteúdo de ADN superiores a 2,5c. No entanto, na nossa opinião, teríamos identificado outros factores, se a amostragem fosse superior ou se tivéssemos mais êxito na recolha de informações. O arquivo de registos completos de vacinação incluindo o local de administração, o tipo de vacina, o fabricante e a sua composição, o tempo entre a injecção e o aparecimento de massas pós vacinais, o comportamento biológico dessas massas e o decurso clínico dos gatos, seria contributo valioso por parte do clínico veterinário. Um dos aspectos mais importante a ter em conta para a interpretação do nosso estudo consiste no facto de que o decurso clínico dos gatos ao longo da sua doença oncológica foi muitas vezes afectado por vários factores relacionados com o proprietário, incluindo decisões no que respeita a cirurgias sucessivas ou o recurso à eutanásia, sempre que ocorriam as recidivas, influenciando desta forma o tempo de sobrevida total. Para além disso, os grupos de comparação eram muitas vezes desproporcionais, devido à tendência das neoplasias para apresentarem critérios de malignidade acentuada e muito semelhantes entre si.

A idade e o sexo não influenciaram a sobrevida total dos animais do nosso estudo, à semelhança do observado em estudos anteriores (Davidson *et al.*, 1997; Cronin *et al.*, 1998), tendo-se no entanto, verificado valores de mediana de tempos de sobrevida inferiores para gatos mais velhos e para indivíduos do sexo feminino. A raça demonstrou influência na sobrevida total ($p=0,05$), ao contrário de outro estudo anterior (Davidson *et al.*, 1997) os gatos de raça Europeu Comum tiveram maior longevidade, do que os das restantes raças, pressupondo maior resistência a este tipo de cancro. No

entanto, temos que considerar, que os indivíduos desta raça estavam em maioria e este facto pode ter interferido nesta determinação.

Alguns estudos referem que as localizações anatómicas dos sarcomas do gato influenciam a sobrevida total, na medida em que facilitam a exerese cirúrgica mais alargada, ou mesmo radical, como a amputação (Bostock & Dye, 1979; Hendrick *et al.*, 1994b; Hershey *et al.*, 2000). Neste trabalho, esta associação não foi observada (p=0,49) tal como nos estudos de Davidson *et al.*, (1997) e de Cohen *et al.*, (2001). No entanto os gatos com neoplasias localizadas na parede costal, revelaram valor de mediana para a sobrevida total inferior ao apresentado por gatos com neoplasias em outras localizações anatómicas. A associação dos sarcomas em locais de injecção com o comportamento biológico mais agressivo, relativamente aos localizados em outras regiões anatómicas, tem sido descrita na literatura (Esplin *et al.*, 1993; Dubielzig *et al.*, 1993; Kass *et al.*, 1993; Hendrick & Brooks, 1994; Hendrick *et al.*, 1994a; Hendrick *et al.*, 1994b).

O tamanho das neoplasias representa um factor clássico de prognóstico, sendo considerado na avaliação do estadiamento dos pacientes oncológicos (Frezza *et al.*, 1992; Fletcher et al., 2002a; Hasegawa *et al.*, 2002; O'Sullivan *et al.*, 2002), assim como nos animais (Clemo *et al.*, 1994; Queiroga & Lopes, 2002). No nosso trabalho o tamanho das neoplasias mostrou associação estatisticamente significativa com a sobrevida total (p=0,02), os sarcomas de maiores dimensões estiveram associados a pior prognóstico, facto também observado em estudos anteriores (Cohen *et al.*, 2001).

O tipo histológico não apresentou associação significativa com a sobrevida total (p=0,36), tal como observado na literatura (Bostock & Dye, 1979; Cohen *et al.*, 2001). Isto significa que apesar da sua diversidade microscópica, os sarcomas apresentaram comportamentos biológicos muito semelhantes e que a classificação tumoral tem interesse limitado para o seguimento clínico, apesar do seu indiscutível valor académico. Este facto pode ser devido à baixa amostragem do nosso estudo, já que em Oncologia Humana este factor parece ter implicações não só terapêuticas como de prognóstico (Calonje & Fletcher, 1995; Fletcher, 2000; Hasegawa *et al.*, 2002).

Avaliamos a importância dos parâmetros patológicos como factores de prognóstico, com excepção da calcificação, devido à sua baixa frequência e verificamos que as variáveis padrão de crescimento e necrose estiveram associadas à sobrevida total. Pela análise das respectivas curvas de sobrevida, as neoplasias com padrão de crescimento expansivo e ausência de necrose estiveram associadas a melhor prognóstico. Este facto pode ser devido à dificuldade de completa excisão cirúrgica e da

obtenção de margens cirúrgicas livres de células neoplásicas aliado ao crescimento infiltrativo. A necrose está também relacionada com o rápido crescimento neoplásico e aumento do tamanho das neoplasias. Estes factores já foram relacionados com tempos de sobrevida menores (Bostock & Dye, 1979; Davidson *et al.*, 1997; Cronin *et al.*, 1998; Hershey *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002). A presença de hemorragia e de células neoplásicas multinucleadas não revelaram associação significativa com a sobrevida total, contudo o grupo de gatos portadores de neoplasias com ausência destes componentes revelou valores de mediana superiores para o TST, permitindo a sua conotação com comportamento biológico adverso, como já foi referido em estudos anteriores (Couto *et al.*, 2002).

A importância do infiltrado inflamatório peritumoral, como factor de prognóstico, foi limitada, mas pudemos verificar que neoplasias cujos infiltrados eram mais abundantes corresponderam a valores de mediana para tempos de sobrevida maiores. Na nossa opinião esta observação sugere que estes infiltrados poderão ter influência na contenção e delimitação das células neoplásicas.

O grau histológico não revelou, associação estatística significativa com a sobrevida total (p=0,32) à semelhança de um estudo anterior (Davidson *et al.*, 1997) provavelmente devido ao baixo número de amostras ou à tendência da maioria dos sarcomas apresentarem grau 3. Serão necessários, mais estudos futuros para a sua avaliação, de forma mais rigorosa, pois é considerado um dos principais factores de prognóstico para os SPM em Oncologia Humana (Jensen *et al.*, 1998; Weiss & Goldblum, 2001; Fletcher et al., 2002a). Nos sarcomas do gato está descrita a associação significativa entre o índice mitótico e a sobrevida total, (Bostock & Dye, 1979), facto que também não foi possível observar no nosso estudo (p=0,41).

Em alguns trabalhos de sarcomas humanos, os índices de proliferação, obtidos por IHQ, auxiliaram a obtenção de grau e estadiamento, revelando grande valor prognóstico, relativamente aos métodos clássicos (Jensen *et al.*, 1998; Hasegawa *et al.*, 2002). O índice de proliferação do PCNA tem sido utilizado em estudos da actividade proliferativa de algumas neoplasias animais (Sarli *et al.*, 1994; Alves, 1999; Queiroga & Lopes, 2002), tendo revelado importância como factor de prognóstico nas neoplasias da mama da cadela (Queiroga & Lopes, 2002). No nosso estudo, este parâmetro não revelou associação com a sobrevida total (p= 0,38), o que pode estar relacionado com a expressão do PCNA pelas células não cíclicas e ao seu papel na reparação de danos na molécula de ADN, muito frequentes nas neoplasias (van Diest *et al.*, 1998).

A expressão da p53 teve influência no decurso clínico dos gatos (p=0,005). Ao analisar a curva de sobrevida, constatamos, para nossa surpresa, que o grupo dos gatos cujas neoplasias revelaram expressão de p53, obtiverem melhores tempos de sobrevida ao longo do tempo, constituindo factor de melhor prognóstico. Estes dados devem ser analisados com prudência. Apesar do produto da expressão do gene p53 estar relacionada com a reparação do ADN, pelo exposto anteriormente, a técnica utilizada, permitiu detectar sobretudo as formas mutantes desta proteína, sendo de esperar que as neoplasias com imunorreactividade a este marcador apresentassem comportamento biológico mais agressivo, ao contrário do ocorrido. Provavelmente a causa deste evento terá sido a incapacidade de reconhecer todas as neoplasias com expressão de p53, pois ausência de imunorreactividade à proteína p53 não é sinónimo de ausência de mutação. A ausência de marcação pode ser justificada por: incapacidade do anticorpo em detectar proteínas p53 mutadas (por perda da antigenecidade da proteína devido a fixação) ou incapacidade em reconhecer os epítopes da proteína p53 do gato; ocorrência de mutação não associada a produção de proteínas ou com formação de proteínas instáveis ou mutação em áreas de genoma não conservadas associadas a produção de proteínas não detectáveis pelo anticorpo usado. Outra hipótese, mas menos provável será a expressão do tipo selvagem nas células em quantidade suficiente para a sua detecção pela IHQ (Soini *et al.*, 1992). Para a avaliação mais rigorosa da importância deste gene no mecanismo de tumorigénese dos sarcomas felinos e da sua influência na sobrevida será necessário aprofundar estudos de citogenética e de biologia molecular.

A importância prognóstica das variáveis citométricas nos SPM é controversa (Calonje & Fletcher, 1995). No nosso estudo esta importância foi muito limitada, observando associação estatística significativa apenas para a variável citométrica >2,5c (p=0,01), revelando prognóstico mais favorável para os gatos cujas neoplasias continham esta fracção alta. As outras variáveis citométricas avaliadas não revelaram associação significativa com a sobrevida, revelando inesperadamente, valores de mediana para tempos de sobrevida superiores nos grupos de gatos com neoplasias aneuplóides de ADN e fracções elevadas de células com conteúdo de ADN superior a 5c e 9c, ao contrário da generalidade dos estudos que associam estes parâmetros a comportamento biológico agressivo (Schapers *et al.*, 1993; Siitonen *et al.*, 1993; Epp *et al.*, 1996; Lorenzato *et al.*, 2000; Subdo *et al.*, 2002). Num estudo de SPM no Homem, com número idêntico de casos, foi possível correlacionar a progressão da doença com a ploidia de ADN, IA e fracções >2,5c e >5c, indicando a técnica de citometria de

imagem, como ferramenta importante na obtenção de indicadores de prognóstico válidos para os SPM para além dos convencionais (Mitchie *et al.*, 1994).

6- CONCLUSÕES

O estudo realizado permitiu as seguintes conclusões:

- Dentro da nossa casuística foi possível diagnosticar sarcomas de células fusiformes no gato, preferencialmente localizados em áreas anatómicas de eleição para a administração de vacinas, caracterizados pelo elevado pleomorfismo citonuclear, áreas de necrose e presença de infiltrado inflamatório peritumoral, semelhantes ao descrito na literatura com a designação de sarcomas pós vacinais em outros países, nomeadamente Estados Unidos da América e França.

- Os sarcomas das partes moles do gato apresentaram diversidade microscópica, no entanto exibiram critérios de malignidade histológica e comportamento biológico semelhantes, assentando num imunofenótipo celular maioritariamente do tipo miofibroblasto, sugerindo uma origem comum para estas neoplasias e um papel importante do miofibroblasto nos processos de carcinógenese e na progressão da doença.

- A determinação do tipo histológico com base nos imunofenótipos das células neoplásicas tem interesse prognóstico limitado.

- Fenómenos de instabilidade genética e de mutação do gene p53 podem ter um papel importante na patogenia destas neoplasias.

- O PCNA revelou-se um bom marcador da actividade proliferativa apresentando associação com o índice mitótico, necrose e grau histológico.

- O tamanho das neoplasias, a raça dos gatos, o padrão de crescimento e necrose das neoplasias são importantes factores de prognóstico.

7- ESTUDOS FUTUROS

Os resultados do trabalho por nós desenvolvido despertaram-nos o interesse para a continuação da realização de estudos nos sarcomas das partes moles no gato. Assim achamos pertinente realizar:

- Caracterização da imunoexpressão de marcadores vulgarmente utilizados em Oncologia Humana como o CD34, EMA, citoqueratinas, GFAP e Factor VIII, mioglobina, miosina.

- Caracterização da distribuição dos factores de crescimento e seus receptores, nomeadamente factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o factor de crescimento epidermal (EGF).

- A análise das alterações génicas associadas ao processo de cancerização, em particular dos genes p53, *c-sis* oncogene (codificante do PDGF) e *c- erb* (codificante do EGF) e *c- jun* por técnicas de PCR e sequenciação de genes.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1969:

Snyder, S.P. (1969) Transmissible Feline Fibrosarcoma. *Nature*. **221:**1074-1076.

1978:

Brown, N.O.; Patnaik, A.K.; Mooney, S.; Hayes, A.; Harvey, H.J.; MacEwen, G. (1978) Soft Tissue Sarcomas in the Cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **173(6):** 744-749.

1979:

Bostock, D. E.; Dye, M.T. (1979) Prognosis after Surgical Excision of Fibrossarcomas in Cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **175:** 727-728.

Harms, J.; Mäusle, E. (1979) Tissue Reaction to Ceramic Implant Material. *J. of Biomed. Mat. Research.***13:** 67-87.

1980:

Auer, G.U.; Casperson, T.O.; Wallgren, A.S. (1980) DNA Content and Suvival in Mammary Carcinoma. *Analytical and Quant. Cyt.* **2:** 161-165.

1981:

Hardy Jr, W. D. (1981). The Feline Leukemia Virus. *J. Am. Animal Hosp. Assoc.* **17:** 951-976.

1982:

Miettinen, M.; Lehto, P.; Badley, R.A.; Virtanen, I. (1982) Expression of Intermediate Filaments in Soft-Tissue Sarcomas. *Int. J. Cancer.* **30:** 541-546.

1983:

Denk, H.; Krepler, R.; Artlieb, U.; Gabbiani, G.; Rungger-Brandle,E.; Leoncini, P.; Franke, W.W. (1983). Proteins of Intermediate Filaments. An Immunohistochemical And Biochemical Approach To The Classification Of Soft Tissue Tumors. *Am. Assoc. of Pathologists.* **110:** 193-208.

Woog, J.; Albert, D. M.; Gonder, J. R.; Carpenter, J. J. (1983) Osteosarcoma in a Phthisical Feline Eye. *Vet. Pat.* **20:** 209-214.

1984:

Dubielzig, R. R. (1984) Ocular Sarcoma Following Trauma In Three Cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **184:** 578-581.

Gerdes, J.; Lemke, H.; Baisch; H.; Wacker, H-H.; Schwab, U.; Stein, H. (1984) Cell Cycle anlyses of a Cell Proliferation-associated Human Nuclear Antigen Defined by the Monoclonal Antibody Ki-67. *The J. of Immu.* **133** (4): 1710-1715.

1985:

Tiollais, P.; Pourcel, C.; Dejean, A. (1985) The hepatitis B virus. *Nature*. **317:** 489-495.

1986:

Bostock, D.E. (1986) Neoplasms of the Skin and Subcutaneous Tissues in Dogs and Cats. *British Vet. J.* **142:** 1-19.

Hayden, D. W.; Ghobrial, H. K.; Johnson, K. H.; Buoen, L. C. (1986) Feline Mammary Sarcoma Composed off Cells Resembling Myofibroblasts. *Vet. Pat.* **23:** 118-124.

1987:

Ryu, R.; Bovill, E.G.; Skinner, H.; Murray, W.R. (1987) Soft Tissue Sarcoma Associated with Aluminium Oxide Ceramic Total Hip Arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* **216:** 207-212.

1988:

Miettinen, M. (1988) Antibody Specific to Muscle Actins in the Diagnosis and Classification of Soft Tissue Tumours. *Am. J. of Pat.* **130** (1): 205-215.

1989:

Auer, G.; Askensen, U.; Ahrens, O. (1989) Cytophotometry. *Hum.Path.* **20**(6): 518-527.

Falkmer, U.G. (1989) Methodological Aspects on DNA Cytometry. Image and Flow Cytometry on Malignant Tumors of the Breast, the Endometrium, the Brain and the Salivary Glands. Stockholm.

Wied, G.L.; Bartels, P.H.; Bibbo, M.; Dytch, H.E. (1989) Image Analysis in Quantitative Cytopathology and Histopahology. *Hum. Pat.* **20**(6): 549-571.

1990:

Dubielzig, R. R.; Everitt,J. ; Shadduck, J.A. ; Albert, D.M. (1990). Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. *Vet. Pat.* **27:** 62-66.

Hakanson, N.; Shively, J.N.; Reed, R.E.; Merideth, R.E. (1990). Intraocular Spindle Cell Sarcoma Following Ocular Trauma in a Cat: Case Report and Literature Review. *J. Am. An. Hosp. Assoc.***26:** 63-66.

Iggo, R.; Gatter, K.; Bartek, J.; Lane, D.; Harris, A.L. (1990). Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *The Lancet*.**335** 675-679.

Pulley L. T., Stannard A. A. (1990). "Tumors Of The Skin And Soft Tissues" *In* Tumors in Domestic Animals. 3rd edition Moulton J.E. (ed). University of California Press, Berkeley. Pp.23-27.

Roche, W.R. (1990) Myofibroblasts. *J. of Pat.* **161:** 281-282.

1991:

Battifora, H. (1991) Assessment of Antigen Damage in Immunohistochemistry-The Vimentin Internal Control. *Am .J. Clin. Path.* **96**(5): 669-671.

Hendrick, M. J.; Dunagan, B. S. (1991) Focal Necrotizing Granulomatous Panniculitis Associated With Subcutaneus Injections Of Rabies Vaccine In Cats And Dogs: 10 Cases (1988-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **198:** 304-305.

Hendrick, M. J.; Goldschmidt, M. H. (1991) Do Injection Site Reactions Induce Fibrosarcomas In Cats? (Lett) *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **199:** 968.

Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C.C. (1991) p53 Mutations in Human Cancers. *Science*. **253:** 49-53.

Hoover, A. E.; Mullins, J.I. (1991). Feline leukemia virus infection and diseases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **199:** 1287-1297.

Loeb, L.A. (1991) Mutator Phenotiype maybe required for Multistage Carcinogenesis. *Cancer Research*. **51:** 3075-3079.

Miller, M. A.; Nelson, S.L. ;Turk, J.R.; Pace,L.W. ; Brown, T.P. ; Shaw, D.P. ; Fischer, J.R ; Gosser, H.S. (1991) Cutaneous Neoplasia in 340 Cats. *Vet Pathol* **28:** 389-395.

van Dierendonck, J. H.; Wijsman, J. H.; Keijzer, R.; Cornelis, J. H.; Cornelisse, C. J. (1991) Cell-cycle-Related Staining Patterns of Anti-proliferating Cell Nuclear Antigen Monoclonal Antibodies. Comparison with BrdUrd Labeling and Ki-67. *Am. J. of Pat.* **138** (5): 1165-1172.

Wetzels, R.H.; Holland, R.; van Haelst, U.J.; Lane, E.B.; Leigh, I.M.; Ramae, F.C. (1991) Detection of Basement Membrane Components and Basal Cell Keratin 14 in Noninvasive and Invasive Carcinomas of the Breast. *Am. J. Pathol.* **134**(3): 571-579.

1992:

Cattoretti, G.; Becker, M. H. G.; Key, G.; Duchrow, M.; Schlüter, C.; Galle, J.; Gerdes, J. (1992). Monoclonal Antibodies against Recombinant Parts of the Ki-67 Antigen (MIB-1 and MIB-3) Detect Proliferating Cells in Microwave-processed Formalin-Fixed paraffin Sections. *J. of Pat.* **168:** 357-363.

Doliger, S.; Delisle, F.; Devauchelle, P. (1992) Le Complex Fibrosarcome du Chat: Actualités Therapeutiques. *L'Action Vétérinaire*. **1233:** 17-23.

Frezza, G.; Barbieri, E.; Ammendolia I.; Corsa, P.; Neri, S.; Putti, C.; Veraldi, A.; Babini, L. (1992) Surgery and Radiation Therapy in the Treatment of Soft Tissue Sarcomas of Extremities. *Annals of Oncology*. **3:** (Suppl. 2) S93-S95.

Gerdes, J.; Becker, M.H.G.; Key, G.; (1992) Immunohistological Detection of Tumour Growth Fraction (Ki-67 Antigen) in Formaline- Fixed and Routinely Processed Tissues. *J. of Pat.* **168:** 85-87.

Hendrick, M. J.; Goldschmidt, M. H.; Shofer, F. S.; Wang, Y.Y.; Somyo, A. P. (1992). Postvacination Sarcomas in Cats: Epidemiology and Electron Probe Microanalytical Identification of Aluminium. *Cancer Res.* **205:** 5391-5394.

Pape, H., Pöttgen, Ch.; Ploem, J.S.; Van Driel-Kulker, A.; Wurm, R., Schmitt, G. (1992) The Prognostic Value of DNA Content Measure by Cytometry in Soft Tissue Sarcomas. *Annals of Oncology*. **3:** (Suppl. 2) S89-S92.

Sazaky, K.; Hamano, K.; Kinjo, M.; Hara, S. (1992) Intratumoral Heterogeneity in DNA Ploidy of Bladders Carcinomas. *Oncology* **49:** 219-222

Soini Y.; Vahakangas, K.; Kyosti, N.; Kamel, D.; Lane, D.P.; Paakko P. (1992). P53 Immunohistochemistry in Malignant Fibrous Histiocytomas and Other Mesenchimal Tumours. *J. of Pat.* **168:** 29-33.

1993:

Bacus, S.S. Bacus, J.W.; Bacus, J. V.; Bacus, B.C.; Chin, D.M.; Ortiz, R.; Stern, R.K.; Morrow, D.W. (1993) Prostate Adenocarcinoma: an Image Analysis Technique for DNA Ploidy Determination. *Lab. Med.* **24**(4): 225-331.

Dubielzig, R.; Hawkins, K.; Miller, P. (1993) Myofibroblastic Sarcoma Originating at the Site of Rabies Vaccination in a Cat. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5:** 637-638.

Esplin, D.G.; McGill L. D.; Meininger, A. C.; Wilson, S. R. (1993). Post-Vaccination Sarcomas in Cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **202:** 1245-1247.

Hardisson, D.; Salto, M.; Salas, A.; Toyos, J. R.; Sampedro, A. (1993) "Preparation of Samples for DNA Image Cytometry" *In: DNA Cytometric Analysis.* Eds. Sampedro A.; Orfao, A. Universidad de Oviedo- Serviço de publications, pp71-87.

Kass, P. H.; Barnes, W. G.; Spangler, W. L.; Chomel, B. B.; Culbertson, M. R. (1993) Epidemilogic Evidence for a Casual Relation Betweeen Vaccination and Fibrossarcoma Tumorigenesis in Cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **203:** 396-405.

Martinez- Nistal, A.; Hardisson, D.; Gonzalez, A.; Barriuso, J.; Sampedro, A. (1993) "Physical and Instrumental Bases of DNA Image Cytometry." *In: DNA Cytometric Analysis.* Eds. Sampedro A.; Orfao, A. Universidad de Oviedo- Serviço de publications,pp 25-53.

Orfao, A.; Gonzalez, M.; Lopez-Berges, C.; Lopez, A.; Vidrialis, B.; Macedo, A.; Miguel, J.F.S. (1993) "Cell Cycle ans DNA aneuploidy: Biological Bases and Terminology." *In: DNA Cytometric Analysis.* Eds. Sampedro A.; Orfao, A. Universidad de Oviedo- Serviço de publications,pp 15-23.

Raju U.; Zarbo, R.; Kubus, J.; Schuktz (1993) The Histologic Spectrum of Apocrine Breast Proliferations: a Comparative Study of Morphology and DNA Content by Image Analysis. *Hum Path.* **24**(2): 173-181.

Schapers, R. F.M.; Ploem-Zaaijer, J.J.; pauwels, R.P.; Smeets, W.G.B.; van den Brandt, P.A.; Tanke, H.J.; Bosman, F.T. (1993) Image Cytometric DNA Analysis in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Cancer.* **72** (1):182-189.

Siitonen, S.W.; Kallioniemi, O-P.; Helin, H.J.; Isola, J. (1993) Prognostic Value Of Cells With More Than 5c DNA Content in Node-Negative Breast Cancer As Determined By Image Cytometry From Tissue Sections. *Hum. Pat.* **24** (2):1348-1353.

Stöckle, M.; Steinbach, F.; Voges, G.; Hohenfellner, R. (1993) Image analysis DNA Cytometry of Bladder Cancer. *Recent Results in Cancer Res.* **22:**151-163.

Wheless, L.L.; Badalament, R.A.; deVere White, R.W.; Fradet, Y.; Tribukait, B. (1993) Consensus Review of the Clinical Utility of DNA Cytometry in Bladder Cancer. *Cytometry* **14:** 478-481.

1994:

Baas, I.O.; Mulder, J-W. R.; Offerhaus, J.A.; Vogelstein, B.; Hamilton, S.R.; (1994) A Evaluation of Six Antibodies for Immunohistochemistry of Mutant p53 Gene Product in archival Colorectal Neoplasms. *J. of Pat.* **172**: 5-12.

Böcking, A.; Striepecke, E.; Auer, H.; Füzesi, L. (1994) Static DNA Cytometry. Biological Background, Technique and Diagnostic Interpretation. *In*

Compendium on the Computerized Cytology and Histology Laboratory. Eds. Wied, G.L.; Bartels, P.H.; Rosenthal, D.L.; Schen, C.K. Tutorials of Cytology. pp 107-138.

Clemo, F.; DeNicola, D.B.; Carlton, W.; Morrison, W.; Walker, E. (1994) Flow Cytometric DNA Ploidy Analysis in Canine Transitional Cell Carcinoma of Urinary Bladders. *Vet. Path.* **31:** 207-215.

Greenblatt, M.S.; Bennett, W.P.; Hollstein, M.; Harris, C.C. (1994): Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Research.* **54:** 4855-4878.

Gruffydd-Jones, T. J.; Sparkes, A.H. (1994) Vaccination and Fibrosarcomas in Cats. *The Vet. Rec.* **19:** 310.

Hall, P.A.; Lane, D.P. (1994) p53 In Tumour Pathology: Can We Trust Immunohistochemistry? Revisited! *J. of Pat.* **172:** 1-4.

Hendrick, M.J.; Brooks, J.J. (1994). Post-vaccinal Sarcomas in the Cat: Histology and Immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* **31:** 126-129.

Hendrick M.J.; Kass, P.H.; McGill, L.D. (1994a) Post Vaccinal Sarcomas in Cats. *J.l of the Nat. Cancer Inst.* **86**(5): 341-343.

Hendrick, M.J.; Shofer, F. S.; Goldschmidt, M. H.; Haviland, J.C.; Schelling, S. H.; Engler, S. J., Giliato, J. M. (1994b) Comparison of a Fibrossarcomas that Developed at Vaccination Sites and at Nonvaccination Sites in Cats: 239 Cases (1991-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **205:**1425-1429.

Huff, J.E. (1994) Chemicals Causally Associated With Cancers in Humans and In Laboratory Animals: A Perfect Concordance. *In Carcinogenesis*. Eds. M.P. Waalkes , J.M. Ward. Raven press, New York chapter **2:** 25-37;

Lee S.; Tolmachoff, T.; Marchevesky, A.M.; (1994) DNA Content Analysis Image Analysis. Applications and Comparison with Flow Cytometry. Image Analysis: a Primer for Pathologists. Eds. Marchevvsky A.M. E Bartels P.H. Raven Press, Ltd, pp: 261-307.

Mitchie, B.A.; Black, C.; Reid, R.P.; Barret, A.; Hamblen, D.L. (1994) Image Analysis Derived Ploidy and Proliferation Indices in Soft Tissue Sarcomas: Comparison with Clinical Outcome. *J Clin Pathology* . **47:** 443-447.

Ohshima, H.; Bartsch, H. (1994) Chronic Infections and Inflammatory Processes as Cancer Risk Factors: Possible Role of Nitric Oxide in Carcinogenesis. *Mutat. Res.* **305:** 253-264.

Pollock, R.E. (1994) Molecular Determinants of Soft Tissue Sarcoma Proliferation.(Abstract) *Sem. in Surg. Oncol.* **10**(5): 315-322.

Robinson, R.A. (1994) Defining the Limits of DNA Cytometry American *J. of Cli. Pat.* **98** (3): 275-277.

Rose, D.S.C.; Maddox, P.H.; Brown, D.C. (1994) Which Proliferation Markers for Routine Immunohistology? A Comparison of Five Antibodies. *J. of Cli. Path.* **47:** 1010-1014.

Rosin, M.P.; Anwar, W.A.; Ward, A.J. (1994) Inflammation, Chromosomal Instability and Cancer: the Schistosomiasis Model. *Cancer Res.* **54:**1292-1933 (Abstract)

Sarli, G.; Benazzi, C.; Preziosi, R.; Marcato, P.S. (1994) Proliferative Activity Assessed by Anti-PCNA and Ki67 Monoclonal Antibodies in Canine Testicular Tumours. *J.Comp. Path.* **110:** 357-368.

Seigneurim, D.; Louis, J.; Villond, M.C. (1994) The Value of DNA Image Cytometry for the Cytological Diagnosis of Well Diferentiated Breast Carcinomas and Benigne Lesions. *Anal. Cellular Path.* **7:**115-125.

Stenersen, T.C.; Danielsen, H.; Farrants; G.; Reith, A. (1994). Caveats in the use of archival cell material for DNA analysis by image cytometry. *Analytical Cellular Pathology.* **7:** 217-233.

1995:

Calonje, E.; Fletcher, C.D.M. (1995) Immunohistochemistry and DNA Flow Cytometry in Soft- Tissue Sarcomas. *Hematology/Oncology Clinics of North America.* **9** (3): 657-675.

Houben, G.M.; Stockbrugger, R.W. (1995). Bacteria in the etio-pathogenesis of gastric cancer: a review. *Scand. J. Gastroenterol.* **212:** 13-18.

Macy, D.W.; Bergman, P.J. (1995). Vaccine-associated Sarcomas in Cats. *Feline Practice*. **23**(4): 24-27.

Tomatis, L. (1995) Limitations and Inconsistencies in the Approaches to Cancer Prevention. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis.* **15:** 277-282.

van Velthoven, R.; Petein, M.; Oosterlinck, W.J. ; Roches, H.; Pasteels, J.J.; Schulman, C.; Kiss, R. (1995a) The Use of Digital Image Analysis of Chromatin Texture in Feulgen-Stained Nuclei to Predict Recurrence of Low Grade Superficial Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Cancer.* **75**(2): 560-568.

van Velthoven, R.; Petein, M.; Oosterlinck, W.J. ;Zandona, C.; Zlotta, A. van der Meijden, P.J-L.; Roels, H.; Schulman, C.; Kiss, R. (1995b) Image Cytometry Determination of Ploidy Level, Proliferative Activity, and Nuclear Size in a Serie of 314 Transitional Bladder Cell Carcinomas. *Hum. Path.* **16:**3-11.

Zarbo, R.J.; (1995) "DNA Analysis of Soft Tissue Tumors." In Soft Tissue Tumors. 3rd Ed. Enzinger, F.M.; Weiss, S.W. Mosby-Year Book, Inc.St Louis. Missouri, USA.

1996:

Callanan, J.J.; Jones, B.A.; Irvine, J.; Willett, B. J.; McCandlish, I. A. P.; Jarret, O. (1996) Histologic Classification and Imunophenotype of Lymphosarcomas in Cats With Naturally And Experimentally Acquired Feline Immunodeficiency Virus Infection. *Vet. Pathol.* **33:** 264-272.

Doddy, F.D.; Glickman, L.T.; Janovitz, E.B. (1996) Feline Fibrosarcomas at Vaccination Sites and Non- Vaccination Sites. *J. Comp. of Pat.* **114:** 165-174.

Ellis, J.A.; Jackson , M.L.; Bartsch, R.C.; McGill, M.G.; Martin, K.M., Trask, B. R., Haines, D.M. (1996) Use Of Immunohistochemistry and Polymerase Chain Reaction for Detection of Oncornaviruses in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Fibrosarcomas from Cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **209(4):** 767-771.

Epp, R.A.; Justice, W.M.; Garcia, F.V.; McGregon, D.H.; Giri, S.P.G.; Kimler, F. (1996) Retrospective DNA Ploidy Analysis by Image and Flow Cytometry in head and Neck Cancer. *Laryngoscope*. **106:** 1306-1313.

Esplin, D.G.; Jaffe, M.H.; McGill, L.D. (1996) Metastasizing Liposarcoma Associated With a Vaccination Site in a Cat. *Feline Practice*. **24(5):** 20-23.

Gottlieb, T.M.; Oren, M. (1996) P53 in growth Control and Neoplasia. *Biochimica et Biophisica Acta.* **1287:** 77-102.

Lester, S.; Clemett, T. ; Burt, A. (1996). Vaccine Site-Associated Sarcomas in cats: Clinical Experience and a Laboratory Review (1982-1993). *J. Am. Hosp.Assoc.*; **32 :** 91-95

Kerlin, R. L.; Hendrick, M.J. (1996). Malignant Fibrous Histiocytoma and malignant Histiocytosis in the dog- Convergent or Divergent Phenotypic Differentiation? *Veterinary Pathology*. **33:**713-716.

Macy, D.W.; Hendrick, M.J. (1996) The Potential Role of Inflammation in the Development of Postvaccinal Sarcomas in Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* **26**(1): 103-109.

Pellegata, N.S.; Ranzani, G.N. (1996). The significance of P53 mutations in human cancers. *Eur. J. of Histochemistry*. **40:** 273-282.

Quackenbush, S. L.; Mullins, J. L.; Hoover, E. A. (1996). Replication Kinectics and Cell Tropism of an Immunosupressive Feline Leukemia Virus. *J. Gen Virol.* 77 (7): 1411-1420.

Rudmann, D.; Van Astine, W.G.; Doddy, F.; Sandusky, G. E.; Barkdull, T.; Janovitz, E. B. (1996) Pulmunary and Mediastinal Metastases of a Vaccination-Site Sarcoma in a Cat. *Vet. Pathol.* **33:** 466-469.

Trichoupolus, D.; Li, F.P.; Hunter, D.J. (1996) What causes cancer? *S. American* **275:** 50-57.

1997:

Coyne, M. J. ; Nancy, C. P. R.; Rosen, D. K.; (1997) Estimated Prevalence of Prevalence of Injection-Site Sarcomas in Cats During 1992. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **210**(2): 249-251.

Davidson, E.B.; Gregory, C.R. ; Kass, P.H. (1997): Surgical Excision of Soft Tissue Fibrosarcomas in Cats. *Vet. Surg.* **26:** 265-269.

Devauchelle, P.; Delisle, F.; Doliger, S. (1997) Les Fibrosarcomes Dits « Post-Vaccinaux »Chez Le Chat : Mise au Point. *Le P. Veterinaire.* **28** (186): 8-9.

Esplin, D.G.; Jaffe, M.H.; McGill, L.D. (1997) Vaccine Associated Feline Sarcoma Task Force Meets. *Feline pract.* **25**(1): 9-12.

Jösten, M.; Rudolph, R. (1997) Methods for the Differentiation of Giant Cells in Canine and Feline in Paraffin Sections. *J. of Vet. Medicine Association.* **44:** 159-166.

Mauldin, G.N. (1997) Soft Tissue Sarcomas. *Vet. Clin. North Am. Small Anim.* Pract. **27(1):**139-148.

Mentzel, T.; Fletcher, C. D. M. (1997). The Emerging Role of Myofibroblasts in Soft Tissue Neoplasia. *Am. J. of Cli. Path.*. **107**(1): 1997.

Nenning, H.; Raβler, J.; Minh, D.H.; Atolsenburg, J-U. (1997) The Value of DNA Cytometry in Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. *Gen.Diag. Path.* **143:** 231-236.

Reeder, D.H.; Cox, C.; Wheeless, L.L.; Flint, A., Liebert, M.; Grossman, H.B. (1997) Variability of DNA Analysis by Image Cytometry. *Cytometry.***28:**176-180.

Schultze, A.E.; Frank, L.A.; Hahn, K.A. (1997) Repeated Physical And Cytologic Characterizations of Subcutaneous Postvaccinal Reactions in Cats. *Am. J. of Vet.Research.* **58**(7): 719-724.

Shakney, S.E.; Shankey, T.U. (1997) Common Patterns of Genetic Evolution in Human Solid Tumors. *Cytometry* **29:**1-27.

1998:

Bergman, P.J. (1998). Etiology of Feline Vaccine-Associated Sarcomas: History and Update. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **213**(10): 1424-1425.

Couto, C.G.; Macy, D.W. (1998). Review of Treatment Options for Vaccine-Associated Feline Sarcoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **213**(10): 1426-1427.

Cronin, K. ; Page, R.L. ; Spodnick,G. ; Dodge, R.; Hardie, E.N.; Price, S.G.; Ruslander, D.; Thrall, D.E. (1998). Radiation Therapy and Surgery for Fibrosarcoma in 33 Cats. *Vet. Rad. Ultrassound.* **39**(1): 51-56.

Doliger, S.; Devauchelle, P.; (1998) Données Actuelles Sur Les Tumeurs Du "Complexe Fibrosarcome Félin". *Le Point Veterinaire*.**192**:27-36.

Duesberg, P.; Raucsch, C.; Rassnick, D.; Hehlmann, R. (1998) Genetic Instability of Cancer Cells is Proportional to their Degree of Aneuploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 13692-13697.

Garner R.C. (1998) The Role of DNA Adducts in Chemical Carcinogenesis. *Mutation Res.* **402:** 67-75.

Gemmil, L.T. (1998) Injection-Site Sarcomas in Cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **213**(7): 955.

Hendrick, M.J. (1998a) Feline Vaccine-associated Sarcomas: Current Studies on Pathogenesis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **213** (10): 1425-1426.

Hendrick, M.J. (1998b) Historical Review and Current Knowledge of Risk Factor Involved in Vaccine-Associated Feline Sarcomas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **213**(10): 1422-1423.

Hendrick, M. J.; Mahaffey, E. A., Moore, F. M.; Vos, J. H.; Walder, E. J. (1998) Histological Classification of mesenchymal tumours of skin and soft tissues of domestic animals. Second Series Volume II. *Armed Forces Institute of Pathology American Registry of Pathology and The World Health Organization Collaborating. Center for World Wide Reference on Comparative Oncology.* Washingthon, D.C.

Jensen, V.; Sorensen, F.B.; Bentzen, S.M.; Ladekarl, M.; Nielsen, O.S.; Keller, J.; Jensen, O.M. (1998) Proliferative Activity (MIB-1 Index) is an Indepentent prognostic parameter in patients with high-grade soft tissue sarcomas of subtypes other than Malignant fibrous Histiocytomas: a Retrospective Immunohistological study including 216 Soft Tissue Sarcomas. *Histopathology*. **32:** 536-546.

Enchev, V. (1998) DNA Ploidy and Morphometric Features of Normal, Hiperplastic, Premalignant and Malignant Specimens. An Evaluation. *Analytical and Quantitave Cytology and Histology*. **20**(4): 288-296.

Lewis, JJ; Brennan, MF (1998) Prognostic Factors in Soft Tissue Sarcomas. Acta Oncológica Brasileira. www.hcanc.org.br/Ingles/iacta98_8.html visitado em 25-02-03

Pereira, J.; Tavares, L. (1998). Patógenese das Infecções por Retrovírus da Sub-Família Oncornavirinae. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias Vol XCIII, **526:** 61-72.

Richards, J.R. (1998) Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force Awards Research Grants. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. **212** (2): 162-163.

Ryan, S. (1998) Feline Post- Vaccinal Sarcoma – A Literature Review. *Singapore Vet. J.* **22:** 65-73.

Starr, R.M. (1998) Vaccine Associated Feline Sarcoma Task force: A New Model for Problem Solving in Vetrinary Medicine.*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **213**(10): 1428-1429.

Turker, M.S. (1998) Estimation of Mutation Frequencies in Normal Mammalian Cells and the Development of Cancer. Seminars in Cancer Biology. **8:** 407-419.

van Diest, P.J.; Brugal, G.; Baak, K.J. (1998) Proliferation Markers in Tumours: Interpretation and Clinical Value. *J. Cl. Path* .**51:** 716-724.

1999:

Alves, A.G.A. (1999) Estudo Histológico e Imunohistoquímico dos Tumores das Glândulas Hepatóides Caninas: Marcadores Celulares, Fracção de Crescimento, Gene Supressor Tumoral e Hormonodependência. Relação com os Aspectos Clínicos. Dissertação para a obtenção do grau de Doutor. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. pp 94-97.

Chieco, P.; Derenzini, M. (1999) The Feulgen Reaction 75 Years on. *Histochem Cell Biol.* **111:** 345-358.

Duesberg, P. (1999) Are centrossomes or Aneuploidy the key to cancer? *Science* **284:** 2091-2092.

Hendrick, M.J. (1999) Feline Vaccine-Associated Sarcomas. *Cancer Investigation.* **17(4):** 273-277.

Khan, C.A. ; Vousden, S.H. ; Diplle, A. (1999) Lack of p53-Mediated G1 Arrest in Response to an Environmental Carcinogen. *Oncology.* **57:** 258-264.

Pihan, G.A.; Doxsey, S.J.(1999) The Mitotic Machinery as a Sourse of Genetic Instability in Cancer. *Cancer Biology.***9:** 289-302.

Seixas, F.A.G. (1999) Neoplasias Uroteliais Bovinas. Contributo para a sua Caracterização Biopatológica. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre. Universidade do Porto. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.pp53.

2000:

Barber, L.G.; Sorenmo, K.U.; Cronin, K.L.; Shofer, F.S (2000). Combined Doxorrubicin and Cyclophosphamide Chemotherapy for Nonresectable feline Fibrosarcoma. *J.Am. Anim. Hosp. Assoc.* 36**(5):** 416-421.

Fletcher, C. D. M. (2000) Soft tissue tumors. *In Diagnostic Histopathological of tumours.* Volume II. Second edition (Eds) Fletcher, C.D.M. Churchill Livingstone.pp. 1059-1072.

Gagnon, A-C. (2000) Drug Injection-Associated Fibrosarcoma in a Cat. *Feline Pract.* 28 **(2):**18-21.

Heldmann, E.; Anderson, M. A.; Wagnermann, C. (2000) Feline Osteossarcoma: 145 Cases (1990-1995). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 36**(6):** 518-521.

Hershey, A.E.; Sorenmo, K.U.; Hendrick. M.J.; Shofer, F.S.; Vail, D.M.; (2000) Prognosis for Presumed Feline Vaccine-Associated Sarcoma after Excision: 61 Cases (1986-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **216**(1): 58-61.

Lorenzato, M.; Abboud, P.; Masure, M.; Bouthens, D.; Visseux-Coletto, B.; Quereux, C. ; Adnet, J-J. (2000) Image Cytometry Detection of Breast Cancer Cells with >5c DNA Content and Minor DNA Stemlines. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology.* **22** (3): 199-205.

Mayer, B.; Blauensteiner, J.; Edlinger, A.; Reifinger,M.; Alton, K. ; Schaffner, G.; Brem. G. (2000) Presence of p53 Mutations in Feline Neoplasms. *S. in Veterinary Science.* **68:** 63-69.

Nambiar, P.R.; Haines, D. M.; Ellis, J.A.; Kidney, B.A.; Jackson, M.L. (2000) Mutational Analisis of Tumor Suppressor Gene p53 in Feline Vaccine Site-Associated Sarcomas. *Am. J. of Vet. Research.* **10:** 1277-1281.

Romanelli, G. (2000) Feline Vaccine Associated Sarcomas. In *Scientific Proceedings World Congress Amsterdam.* 346-347.

Rubin, B.P.; Fletcher, C.D.M. (2000) Myxoide Leiomyosarcoma of Soft Tissue, an Underrecognized Variant. *The Am. J. of Surg. Pathology*. **24**(7): 927-936.

2001:

Bregazzi, V..; LaRue, S.M.; McNiel, E.; Macy, D.M; Dernell, W.S.; Powers, B.E.; Withrow, S.J. (2001) Treatment With A Combination Of Doxorubicin, Surgery, And Radiation Versus Surgery And Radiation Alone For Cats With Vaccine-Associated Sarcomas: 25 Cases (1995-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **218**(4): 547-550.

Casparie, M.K.; van Geel, B.N.; Hennipman, A.; Gimbrere, C.H.F.; van Coevorden, F.; van Dalen, T.; Coebergh, J.W.W.; Hoekstra, H.J (2001) Soft Tissue Sarcoma the Predominant Primary Malignancy in the Retroperitoneum. *Sarcoma* **5**(1): 5-8.

Cohen, M.; Wright, J.C.; Brawner, W.R.; Smith, A.N.; Henderson, R.; Behrend, E.N. (2001) Use Of Surgery And Electron Beam Irradiation, With Or Without Chemotherapy, For Treatment Of Vaccine-Associatede Sarcomas In Cats: 78 Cases (1996-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **219**(11): 1582-1589.

Duarte, M.S.D. (2001) Sarcomas Felinos Pós-Vacinais: Estudo Morfológico E Imunohistoquímico de 36 Casos. Relatório Final de Curso (Parte II). Universidade do Porto. Instituto das Ciências Biomédicas de Abel Salazar.pp24-84.

Ferlay, J.; Bray, F.; Pisani, P., Parkin, D.M. (2001) Globocan 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Version 1.0. IARC Cancer Base No.5. IARC Press:Lyon, visitado em http://www-dep.iarc.fr/dataava/infodata.htm, em 15/01/2004.

Folpe, A.L.; Gown, A. (2001) Immunohistochemistry for Analysis of Soft Tissue Tumours. In Weiss, S. W.; Goldblum, J.R. (2001). Enzinger and Weiss`s Soft Tissue Tumours. Fourth Edition . St Louis. Mosby.

Haroske, G.; Baak, J.P.; Danielsen, H.; Giroud, F.; Gschwendtner,A. Oberrholzer, M.; Reith, A.; Spieler, P.; Böcking A. (2001) Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Analytical Cellular Pathology*. **23:** 89-95.

Huang, J.; Mackillop, W.J. (2001) Increased Risk of Soft Tissue Sarcoma after Radiotherapy in Women Breast Carcinoma (Abstract). *Cancer* **92**(1): 172-180.

Madewell, B. R.; Griffey, S.M.; McEntee; M. C.; Leppert, V.J.; Munn; R.J.; (2001) Feline Vaccine-Associated Fibrosarcoma: An Ultrastructural Study of 20 Tumors (1996-1999). *Vet. Pat.* **38:** 196-202.

McEntee, M.C.; Page, R.L. (2001). Feline Vaccine- Associated Sarcomas. *J. Vet. Intern. Med.* **15:** 176-182.

McNiel, E.A. (2001) Vaccine-Associated Sarcomas in Cats: A Unique Cancer Model. *Clin.Orthop.* **382:** 21-27.

Morrison, W.B.; Starr, R.M. (2001) Report of the Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force. *Journal of the AVMA*. **218(5):** 697-702.

Nambiar, P.R.; Jackson, M. L.; Ellis, J. A.; Chelack , B.J:; Kidney, B. A:, Haines, D. M. (2001) Immunohistochemical detection of tumor suppresser Gene p53 in Feline Injection Site-Associated sarcomas. *Vet. Pathol.* **38:** 236-23.

Plaja, A.; Perez, C.; Miró, R. (2001) Chromossome Aneuploidy and Cancer: Lessons from a Chromossomal Instability Síndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics.***131:** 144-145.

Subdo, J. Bryne, M.; Johannessen, A.C.; Kidal, W.; Danielsen, H.E.; Reith, A. (2001) Comparison of Histological Grading and Large-Scale Genomic Status (DNA Ploidy) as Prognostic Tools in Oral Dysplasia. *The J. of Pat.* **194:**303-310.

Weiss, S. W.; Goldblum, J.R. (2001). Enzinger and Weiss`s Soft Tissue Tumours. Fourth Edition. St Louis. Mosby.

2002:

Banerji, N.; Klausner, J.S.; Kapur, V.; Kanjilal, S. (2002) Evaluation of in Vitro Chemosensitivity Of Vaccine-Associated Feline Sarcoma Cell Lines To Vincristine And Paclitaxel. *Ame. J. Of Vet. Research.* **63**(5): 728-733.

Brenner, A. (2002) Macrophagic Myofasciitis: a Summary of Dr. Gherardi´s Presentations. *Vaccine.* **20** (Suppl. 3): S6-S7.

Clements, C.J.; Griffiths, E. (2002) The Global Impact of vaccines containing aluminium adjuvants *Vaccine.* **20** (Suppl. 3): S24-S33.

Coffin, C.M.; Fletcher, J.A. (2002) "Inflammatory Myofibroblastic Tumour." In World Health Organization Classification of Tumour. *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.* (Eds) Fletcher, C.; Umni, K.; Mertens, F. IARC Press:Lyon.pp91-93

Couto, S.S.; Griffey, S.M.; Duarte, P.C.; Madewell, B.R. (2002) Feline Vaccine-Associated Fibrosarcoma: Morphologic Distinctions. *Vet. Pat.* **39**(1): 33-41.

Deitos, A.P.; Pedentour, F. (2002) Dedifferentiated Liposarcoma. In World Health Organization Classification of Tumour. *Pathology and Genetics of Tumours of*

Soft Tissue and Bone. (Eds) Fletcher, C.; Umni, K.; Mertens, F. IARC Press:Lyon. pp.38-43.

Eickhoff, T.C.; Myers, M. (2002) Aluminum in Vaccines. *Vaccine*. **20** (Suppl. 3): S1-S5.

Nascimento, A.G. (2002) Giant Cell Tumour of Soft tissue. In World Health Organization Classification of Tumour. *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.* (Eds) Fletcher, C.; Umni, K.; Mertens, F. IARC Press:Lyon.pp. 118-119.

Fisher, C.; van den Berg, E.; Molenaar, W.M. (2002) Adult Fibrosarcoma. In World Health Organization Classification of Tumour. *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.* (Eds) Fletcher, C.; Umni, K.; Mertens, F. IARC Press:Lyon. pp100-101

Fletcher, C.D.M.; Sundaran, M.; Rydholm, A.; Coindre, J.M.; Singer, S. (2002a) "Soft Tissue Tumours: Epidemiology, Clinical Features, Histopathological Typing and Grading." In *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.* (Eds) Fletcher, C.; Umni, K.; Mertens, F. World Health Organization Classification of Tumour. IARC Press Lyon.pp.12-18.

Fletcher, C.; Umni, K.; Mertens, F. (2002b) Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. *World Health Organization Classification of Tumour*. IARC Press Lyon.

Flores, E. R.; Tsai, K.Y.; Crowley, D.; Sengupta, S.; Yang A.; McKeon, F.; Jacks, T. (2002) DNA damage. *Nature*. **416** (6880): 560-564.

Gobar, G.M.; Kass, P.H. (2002) World Wide Web-based Survey of Vaccination Practices, Postvaccinal Reactions, and Vaccine Site-associated Sarcomas in Cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **220**(10): 1477-1482.

Hasegawa, T.; Yamamoto, S.; Yokoyama, R.; Umeda, T.; Matsuno, Y.; Hirohashi, S. (2002) Prognostic Significance of Grading and Staging Systems using MIB-1 Score in Adult patients with Soft Tissue Sarcoma of the extremities and trunk. *Cancer.* **95:** 843-851.

Hogenesch, H. (2002). Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminium adjuvants. *Vaccine*. **20 (3):** S34-S40.

O´Sullivan, B.; Davis, M.; Turcotte, R.; Bell, R.; Catton, C.; Chabot, P.; Wunder, J.; kandel, R.; Goddard, K., Sadura, A.; Pater, J.; Zee, B. (2002)

Preoperative versus Postoperative Radiotherapy in Soft-Tissue Sarcoma of the Limbs: a Randomised Trial . *The Lancet* **359**(29): 2235-2241

Kobayashi, T.; Hauck, M.; Dodge, R.; Page, R.; Price, S.; Williams, L.; Hardie, E.M.; Mathews, K.G.; Thrall, D.E. (2002) Preoperative Radiotherapy for Vaccine Associated Sarcoma in 92 Cats. *Vet. Rad. & Ultrasound.* **43** (5): 473-479.

Koenig, A.; Bianco, S.R.; Fosmire, S.; Wojcieszyn, J.; Modiano, J.F. (2002). Expression and significance of p53, Rb, p21/*waf-1*, p16/*ink-4a*, and PTEN Tumour Suppressors in Canine Melanoma. *Vet. Pat.* **39:** 458-472.

Krishnamurthy, S.; Sneige, N. (2002) Molecular and Biologic Markers of Premalignant Lesion of Human Breast. *Advances in Anatomic Pathology.* **9**(3):185-197.

Mentzel, T.; van den Berg, E.; Molenaar, W.M. (2002) Myxofibrosarcoma. In World Health Organization Classification of Tumour. *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.* (Eds) Fletcher, C.; Umni, K.; Mertens, F. IARC Press:Lyon..pp102-103

Pinheiro, PS; Tyczynski, JE; Bray, F.; Amado, J.; Matos, E.; Miranda, AC.; Limbert, E. (2002). Cancro em Portugal. *IARC Technical Publication.* N°38 Lyon.

Queiroga, F; Lopes, C. (2002) Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. *Rev. Port. C. Vet.* **97 (543):**119-127.

Schofield, D. (2002) "Extrarenal Rhabdoid Tumour." In World Health Organization Classification of Tumour. *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.* (Eds) Fletcher, C.; Umni, K.; Mertens, F. IARC Press:Lyon. pp219-220

Subdo, J. ; Kidal, W.; Johannessen, A.C. ; Koppang, H.S.; Subdo,A.; Danielsen, H.E. ; Risberg, B. ; Reith, A. (2002) Gross Genomic Aberrations in Precancers: Clinical Implications of a long-term Follow-up Study in Oral Erythroplakias. *J. of Cli. Onc.* **20:** 456-462.

Yoo, J.; Park, S.; Kang, C.S.; Kang, S.J.; Kim, B.K. (2002) Expression of E-cadherin and p53 proteins in Human Soft Tissue Sarcomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **126:** 33-38.

2003:

Bettini, G.; Morini, M.; Marcato,P.S. (2003) Gastrointestinal Spindle Cell Tumours of the Dog: Histological and Immunohistochemical Study. *J. of Comp. Pat.* **129 (4):** 283-293.

Dias, A.J.M. (2003) Avaliação por Citometria de Imagem de Carcinomas Mamários Diplóides de ADN por Citometria de Fluxo. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre. Universidade do Porto. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.pp26.

Pires, M. A. ; Travassos, F. S.; Pires, I. (2003). Neoplasias em canídeos- Um Estudo Descritivo de 6 Anos. *Rev. Por. C. Vet.* **98 (547):** 111-118.

9- ANEXOS

Variáveis Clínicas e Patológicas		N	n	%
Sexo	Feminino	62	30	48,4
	Masculino	62	32	51,6
Idade	> 9 anos	62	35	56,5
	< 9 anos	62	27	43,5
Raça	EC	62	49	79,0
	Outras	62	13	21,0
Localização	Parede costal	62	52	83,9
	Outras	62	10	16,1
Tamanho	< 3 cm	62	25	40,3
	> 3 cm	62	37	59,7
Tipos histológicos	SM	62	28	45,2
	FSA	62	10	16,1
	MFSA	62	9	14,5
	SCG	62	8	12,9
	CME	62	3	4,8
	TMBN	62	2	3,2
	Outros	62	2	3,2
Tipo de crescimento	Infiltrativo	62	41	66,1
	Misto	62	7	11,3
	Expansivo	62	14	22,6
Células neoplásicas multinucleadas	Ausente	62	44	71,0
	Presente	62	18	29,0
Hemorragia	Ausente	62	44	71,0
	Presente	62	18	29,0
Calcificação	Ausente	62	57	91,9
	Presente	62	5	8,1
Necrose	0	62	12	19,4
	1	62	26	41,9
	2	62	24	38,7
Índice Mitótico	1	62	3	4,8
	2	62	5	8,1
	3	62	54	87,1
Grau	1	62	1	1,6
	2	62	10	16,1
	3	62	51	82,3
Infiltrado Inflamatório	0	62	4	6,5
	1	62	10	16,1
	2	62	26	41,9
	3	62	22	35,5
Índice de Proliferação	Baixo	62	30	48,4
	Alto	62	32	51,6
Expressão de p53	Ausente	48	38	79,2
	Presente	48	10	20,8

Tabela 10- Variáveis clínicas e patológicas observadas.

Tipo histológico	Idade (anos) (média ± sd)	Sexo				Raça				Tamanho				Localização Anatómica			
		F	%	M	%	EC	%	Outras	%	<3cm	%	>3cm	%	PC	%	OR	%
SM (28)	9,6 ± 3,5	15	53,6	13	46,4	21	75	7	25	11	39,3	17	60,7	25	89,3	3	10,7
FSA (10)	8,3 ± 2,1	5	50	5	50	8	80	2	20	1	10	9	90	7	70	3	30
MFSA (9)	7,7 ± 2,9	3	33,3	6	66,7	8	88,9	1	11,1	6	66,7	3	33,3	9	100	0	0
SCG (8)	9,0±2,7	2	25	6	75	6	75	2	25	2	25	6	75	6	75	2	25
CME (3)	8,6±0,6	2	66,7	1	33,3	2	66,7	1	33,3	1	33,3	2	66,7	2	66,7	1	33,3
TMBN (2)	8,0 ± 1,4	2	100	0	0	2	100	0	0	2	100	0	0	1	50	1	50
Outros (2)	9,0 ± 4,2	1	50	1	50	2	100	0	0	2	100	0	0	2	100	0	0
TOTAL (62)	8,9 ± 2,9	30	48,4	32	51,6	49	79	13	21	25	40,3	37	59,7	52	86,7	10	13,3

Tabela 11-Caracterização das variáveis clínicas e os tipos histológicos observados.

Parâmetros histopatológicos		SM	%	FSA	%	MFSA	%	SCG	%	CME	%	TMBN	%	Outros	%
Padrão de crescimento	Infiltrativo	22	78,6	10	100	2	22,2	4	50	0	0	2	100	1	50
	Misto	4	14,3	0	0	2	22,2	0	0	1	33,3	0	0	0	0
	Expansivo	2	7,14	0	0	5	55,6	4	50	2	66,7	0	0	1	50
CNM	Ausente	17	60,7	8	80	6	66,7	8	100	3	100	1	50	1	50
	Presente	11	39,3	2	20	3	33,3	0	0	0	0	1	50	1	50
Hemorragia	Ausente	20	71,4	9	90	9	100,0	2	25	3	100	0	0	1	50
	Presente	8	28,6	1	10	0	0,0	6	75	0	0	2	100	1	50
Calcificação	Ausente	26	92,9	10	100	9	100,0	8	100	1	33,3	2	100	1	50
	Presente	2	7,14	0	0	0	0,0	0	0	2	66,7	0	0	1	50
Necrose	0	6	21,4	1	10	0	0,0	4	50	0	0	0	0	1	50
	1	11	39,3	8	80	1	11,1	1	12,5	2	66,7	2	100	1	50
	2	11	39,3	1	10	8	88,9	3	37,5	1	33,3	0	0	0	0
Índice Mitótico	1	2	7,14	0	0	1	11,1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	3	10,7	1	10	0	0,0	0	0	1	33,3	0	0	0	0
	3	23	82,1	9	90	8	88,9	8	100	2	66,7	2	100	2	100
Grau	1	1	3,57	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	7	25	1	10	0	0,0	0	0	1	33,3	1	50	0	0
	3	20	71,4	9	90	9	100,0	8	100	2	66,7	1	50	2	100
Infiltrado Inflamatório	Ausente	2	7,14	0	0	0	0,0	1	12,5	1	33,3	0	0	0	0
	Baixo	4	14,3	2	20	1	11,1	2	25	0	0	0	0	1	50
	Moderado	11	39,3	5	50	3	33,3	4	50	0	0	2	100	1	50
	Abundante	11	39,3	3	30	5	55,6	1	12,5	2	66,7	0	0	0	0

Tabela 12- Caracterização das variáveis patológicas e os tipos histológicos observados.

VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS		GRAU 1		GRAU 2		GRAU 3		p =
		n	%	n	%	n	%	
Sexo	Feminino	1	100	4	40	25	49,0	0,52
	Masculino	0	0	6	60	26	51,0	
Idade	> 9 anos	0	0	5	50	30	58,8	**0,01**
	< 9 anos	1	100	5	50	21	41,2	
Raça	Europeu Comum	1	100	6	60	42	82,4	0,25
	Outras	0	0	4	40	9	17,6	
Localização	Parede Costal	0	0	7	70	45	88,2	**0,02**
	Outras	1	100	3	30	6	11,8	
Tamanho	< 3 cm	1	100	6	60	18	35,3	0,16
	> 3 cm	0	0	4	40	33	64,7	
Tipos Histológicos	SM	1	100	7	70	20	39,2	0,49
	FSA	0	0	1	10	9	17,6	
	MFSA	0	0	0	0	9	17,6	
	SCG	0	0	0	0	8	15,7	
	CME	0	0	1	10	2	3,9	
	TMBN	0	0	1	10	1	2,0	
	Outros	0	0	0	0	2	3,9	
Padrão de crescimento	Infiltrativo	1	100	7	70	33	64,7	0,77
	Misto	0	0	1	10	6	11,8	
	Expansivo	0	0	2	20	12	23,5	
CNM	Ausente	1	100	9	90	34	66,7	0,27
	Presente	0	0	1	10	17	33,3	
Hemorragia	Ausente	1	100	9	90	34	66,7	0,27
	Presente	0	0	1	10	17	33,3	
Calcificação	Ausente	1	100	8	80	48	94,1	0,32
	Presente	0	0	2	20	3	5,9	
Infiltrado Inflamatório	Ausente	1	100	1	10	2	3,9	**0,04**
	Baixo	0	0	1	10	9	17,6	
	Moderado	0	0	6	60	20	39,2	
	Abundante	0	0	2	20	20	39,2	

Tabela 13- Associação entre a variável grau histológico e as variáveis clínicas e patológicas.

VARIÁVEIS CLINICAS E PATOLÓGICAS		INFILTRADO INFLAMATÓRIO								
		AUSENTE		BAIXO		MODERADO		ABUNDANTE		
		n	%	n	%	n	%	n	%	p =
Sexo	Feminino	3	75	3	30	10	38,5	14	63,6	0,13
	Masculino	1	25	7	70	16	61,5	8	36,4	
Idade	> 9 anos	2	50	3	30	16	61,5	14	63,6	0,28
	< 9 anos	2	50	7	70	10	38,5	8	36,4	
Raça	Europeu C.	3	75	8	80	19	73,1	19	86,4	0,23
	Outras	1	25	2	20	7	26,9	3	13,6	
Localização	Parede Costal	0	0	10	100	21	80,8	21	95,5	**0,000001**
	Outras	4	100	0	0	5	19,2	1	4,5	
Tamanho	< 3 cm	3	75	2	20	11	42,3	9	40,9	0,30
	> 3 cm	1	25	8	80	15	57,7	13	59,1	
Tipos Histológicos	SM	2	50	4	40	11	42,3	11	50,0	0,74
	FSA	0	0	2	20	5	19,2	3	13,6	
	MFSA	0	0	1	10	3	11,5	5	22,7	
	SCG	1	25	2	20	4	15,4	1	4,5	
	CME	1	25	0	0	0	0,0	2	9,1	
	TMBN	0	0	0	0	2	7,7	0	0,0	
	Outros	0	0	1	10	1	3,8	0	0,0	
Padrão de crescimento	Infiltrativo	2	50	7	70	19	73,1	13	59,1	0,52
	Misto	1	25	2	20	7	26,9	3	13,6	
	Expansivo	1	25	1	10	0	0,0	6	27,3	
CNM	Ausente	4	100	7	70	17	65,4	16	72,7	0,57
	Presente	0	0	3	30	9	34,6	6	27,3	
Hemorragia	Ausente	3	75	6	60	18	69,2	17	77,3	0,79
	Presente	1	25	4	40	8	30,8	5	22,7	
Calcificação	Ausente	3	75	10	100	23	88,5	22	100,0	0,37
	Presente	1	25	0	0	3	11,5	0	0,0	
Necrose	0	2	50	3	30	5	19,2	2	9,1	0,65
	1	1	25	2	20	11	42,3	12	54,5	
	2	1	25	5	50	10	38,5	8	36,4	
Índice Mitótico	1	0	0	0	0	3	11,5	0	0,0	0,87
	2	2	50	0	0	2	7,7	1	4,5	
	3	2	50	10	100	21	80,8	21	95,5	
Grau	1	1	25	0	0	0	0,0	0	0,0	**0,03**
	2	1	25	1	10	6	23,1	2	9,1	
	3	3	75	9	90	20	76,9	20	90,9	

Tabela 14- Associação entre a variável infiltrado inflamatório e as variáveis clínicas e patológicas.

VARIÁVEIS CLINICAS E PATOLÓGICAS		ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO				p=
		BAIXO		ELEVADO		
		n	%	n	%	
Sexo	Feminino	13	43,3	17	53,1	0,44
	Masculino	17	56,7	15	46,9	
Idade	> 9 anos	16	53,3	19	59,4	0,63
	< 9 anos	14	46,7	13	40,6	
Raça	Europeu comum	23	76,7	26	81,3	0,66
	Outras	7	23,3	6	18,8	
Localização	Parede Costal	24	80	28	87,5	0,76
	Outras	6	20	4	12,5	
Tamanho	< 3 cm	13	43,3	12	37,5	0,43
	> 3 cm	17	56,7	20	62,5	
Tipos Histológicos	SM	16	53,3	12	37,5	0,98
	FSA	3	10	7	21,9	
	MFSA	2	6,67	7	21,9	
	SCG	5	16,7	3	9,38	
	CME	2	6,67	1	3,13	
	TMBN	1	3,33	1	3,13	
	Outros	1	3,33	1	3,13	
Padrão de crescimento	Infiltrativo	20	66,7	21	65,6	0,57
	Misto	2	6,67	5	15,6	
	Expansivo	8	26,7	6	18,8	
CNM	Ausente	22	73,3	22	68,8	0,69
	Presente	8	26,7	10	31,3	
Hemorragia	Ausente	20	66,7	24	75	0,47
	Presente	10	33,3	8	25	
Calcificação	Ausente	28	93,3	29	90,6	0,70
	Presente	2	6,67	3	9,38	
Necrose	0	9	30	3	9,38	**0,006**
	1	14	46,7	12	37,5	
	2	7	23,3	17	53,1	
Índice Mitótico	1	3	10	0	0	**0,003**
	2	4	13,3	1	3,13	
	3	23	76,7	31	96,9	
Grau	1	1	3,33	0	0	**0,01**
	2	8	26,7	2	6,25	
	3	21	70	30	93,8	
Inf iltrado Inflamatório	Ausente	3	10	1	3,13	0,77
	Baixo	3	10	7	21,9	
	Moderado	12	40	14	43,8	
	Abundante	12	40	10	31,3	

Tabela 15- Associação entre a variável índice de proliferação e as variáveis clínicas e patológicas.

VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS		EXPRESSÃO DA p53				p=
		PRESENTE		AUSENTE		
		n	%	n	%	
Sexo	Feminino	5	50	17	44,7	0,77
	Masculino	5	50	21	55,3	
Idade	> 9 anos	6	60	23	60,5	0,84
	< 9 anos	4	40	15	39,5	
Raça	Europeu comum	9	90	30	78,9	0,43
	Outras	1	10	8	21,1	
Localização	Parede Costal	8	80	30	78,9	0,94
	Outras	2	20	8	21,1	
Tamanho	< 3 cm	6	60	16	42,1	0,32
	> 3 cm	4	40	22	57,9	
Tipos Histológicos	SM	4	40	16	42,1	0,53
	FSA	1	10	8	21,1	
	MFSA	3	30	6	15,8	
	SCG	1	10	5	13,2	
	CME	0	0	2	5,3	
	TMBN	0	0	1	2,6	
	Outros	1	10	0	0,0	
Padrão de crescimento	Infiltrativo	5	50	25	65,8	0,32
	Misto	2	20	4	10,5	
	Expansivo	3	30	9	23,7	
CNM	Ausente	7	70	30	78,9	0,55
	Presente	3	30	8	21,1	
Hemorragia	Ausente	8	80	30	78,9	0,94
	Presente	2	20	8	21,1	
Calcificação	Ausente	9	90	35	92,1	0,83
	Presente	1	10	3	7,9	
Necrose	0	3	30	7	18,4	0,68
	1	3	30	16	42,1	
	2	4	40	15	39,5	
Índice Mitótico	1	0	0	3	7,9	0,48
	2	1	10	3	7,9	
	3	9	90	32	84,2	
Grau	1	0	0	1	2,6	0,82
	2	2	20	7	18,4	
	3	8	80	30	78,9	
Inf iltrado Inflamatório	Ausente	1	10	3	7,9	0,21
	Baixo	0	0	5	13,2	
	Moderado	3	30	19	50,0	
	Abundante	6	60	11	28,9	
Índice de proliferação	Baixo	2	20	18	47,4	0,12
	Elevado	8	80	20	52,6	

Tabela 16-Associação entre a variável expressão de p53 e as variáveis clínicas e patológicas.

Variáveis Citométricas (n=41)			n	%
Ploidia		Diplóide	7	17,1
		Aneuplóide	23	56,1
		Multiplóide	11	26,8
Índice de ADN		Baixo	17	41,5
		Elevado	24	58,5
Conteúdo anómalo de ADN	**> 2,5 c**	Baixo	18	43,9
		Elevado	23	56,1
	> 5c	Baixo	23	56,1
		Elevado	18	43,9
	> 9c	Baixo	29	70,7
		Elevado	12	29,3

Tabela 17- Variáveis citométricas observadas.

VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS		DIPLOIDE		ANEUPLOIDE		MULTIPLOIDE		p=
		n	%	n	%	n	%	
Sexo	Feminino	5	71,4	10	43,5	6	54,5	0,43
	Masculino	2	28,6	13	56,5	5	45,5	
Idade	> 9 anos	4	57,1	14	60,9	4	36,4	0,63
	< 9 anos	3	42,9	9	39,1	7	63,6	
Raça	Europeu comum	6	85,7	18	78,3	9	81,8	0,90
	Outras	1	14,3	5	21,7	2	18,2	
Localização	Parede Costal	5	71,4	19	82,6	10	90,9	0,58
	Outras	2	28,6	4	17,4	1	9,09	
Tamanho	< 3 cm	4	57,1	7	30,4	4	36,4	0,45
	> 3 cm	3	42,9	16	69,6	7	63,6	
Tipos Histológicos	SM	3	42,9	12	52,2	4	36,4	0,16
	FSA	2	28,6	5	21,7	0	0	
	MFSA	2	28,6	2	8,7	2	18,2	
	SCG	0	0	2	8,7	3	27,3	
	CME	0	0	1	4,35	1	9,09	
	TMBN	0	0	1	4,35	1	9,09	
Padrão de crescimento	Infiltrativo	5	71,4	16	69,6	6	54,5	0,82
	Misto	1	14,3	2	8,7	1	9,09	
	Expansivo	1	14,3	5	21,7	4	36,4	
CNM	Ausente	4	57,1	18	78,3	7	63,6	0,48
	Presente	3	42,9	5	21,7	4	36,4	
Hemorragia	Ausente	6	85,7	18	78,3	7	63,6	0,53
	Presente	1	14,3	5	21,7	4	36,4	
Calcificação	Ausente	7	100	22	95,7	10	90,9	0,68
	Presente	0	0	1	4,35	1	9,09	
Necrose	0	1	14,3	5	21,7	3	27,3	0,62
	1	2	28,6	10	43,5	4	36,4	
	2	4	57,1	8	34,8	4	36,4	
IM	1	0	0	2	8,7	1	9,09	0,46
	2	0	0	3	13	0	0	
	3	7	100	18	78,3	10	90,9	
Grau	1	0	0	1	4,35	0	0	0,13
	2	0	0	6	26,1	1	9,09	
	3	7	100	16	69,6	10	90,9	
Infiltrado Inflamatório	Ausente	0	0	2	8,7	1	9,09	0,85
	Baixo	2	28,6	3	13	1	9,09	
	Moderado	3	42,9	11	47,8	4	36,4	
	Abundante	2	28,6	7	30,4	5	45,5	
Índice Proliferação	Baixo	1	14,3	13	56,5	4	36,4	0,12
	Elevado	6	85,7	10	43,5	7	63,6	
Expressão p53	Ausente	5	100	12	75	7	77,8	0,49
	Presente	0	0	4	25	2	22,2	

Tabela 18- Associação entre a variável ploidia e as variáveis clínicas e patológicas.

VARIÁVEIS		INDICE DE ADN				p=
		BAIXO		ELEVADO		
		n	%	n	%	
Sexo	Feminino	10	58,8	11	45,8	0,42
	Masculino	7	41,2	13	54,2	
Idade	> 9 anos	10	58,8	12	50	0,23
	<9 anos	7	41,2	12	50	
Raça	Europeu Comum	13	76,5	20	83,3	0,59
	Outras	4	23,5	4	16,7	
Localização	Parede Costal	13	76,5	21	87,5	0,36
	Outras	4	23,5	3	12,5	
Tamanho	< 3 cm	7	41,2	8	33,3	0,61
	> 3 cm	10	58,8	16	66,7	
Tipos Histológicos	SM	10	58,8	9	37,5	**0,02**
	FSA	4	23,5	3	12,5	
	MFSA	2	11,8	4	16,7	
	SCG	1	5,88	4	16,7	
	CME	0	0	2	8,33	
	TMBN	0	0	2	8,33	
Padrão de crescimento	Infiltrativo	13	76,5	14	58,3	0,49
	Misto	2	11,8	2	8,33	
	Expansivo	2	11,8	8	33,3	
CNM	Ausente	12	70,6	17	70,8	0,98
	Presente	5	29,4	7	29,2	
Hemorragia	Ausente	15	88,2	16	66,7	0,11
	Presente	2	11,8	8	33,3	
Calcificação	Ausente	16	94,1	23	95,8	0,80
	Presente	1	5,88	1	4,17	
Necrose	0	4	23,5	5	20,8	0,65
	1	5	29,4	11	45,8	
	2	8	47,1	8	33,3	
IM	1	1	5,88	2	8,33	0,68
	2	1	5,88	2	8,33	
	3	15	88,2	20	83,3	
Grau	1	1	5,88	0	0	0,63
	2	1	5,88	6	25	
	3	15	88,2	18	75	
Infiltrado Inflamatório	Ausente	2	11,8	1	4,17	**0,03**
	Baixo	4	23,5	2	8,33	
	Moderado	8	47,1	10	41,7	
	Abundante	3	17,6	11	45,8	
Índice Proliferação	Baixo	5	29,4	13	54,2	0,12
	Alto	12	70,6	11	45,8	
Acumulação p53	Ausente	11	84,6	13	76,5	

Tabela 19- Associação entre a variável índice de ADN e as variáveis clínicas e patológicas.

VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS		CONTEÚDO ANÓMALO DE ADN														
		>2,5 c				p=	>5 c				p=	>9 c				p=
		BAIXO		ELEVADO			BAIXO		ELEVADO			BAIXO		ELEVADO		
		n	%	n	%		n	%	n	%		n	%	n	%	
Sexo	Feminino	11	61,1	10	43,5	0,27	14	60,9	7	38,9	0,17	15	51,7	6	50	0,82
	Masculino	7	38,9	13	56,5		9	39,1	11	61,1		14	48,3	6	50	
Idade	> 9 Anos	12	66,7	10	43,5	**0,05**	13	56,5	9	50	0,38	14	48,3	8	66,7	0,66
	<9 Anos	6	33,3	13	56,5		10	43,5	9	50		15	51,7	4	33,3	
Raça	Europeu c.	14	77,8	19	82,6	0,70	18	78,3	15	83,3	0,69	23	79,3	10	83,3	0,69
	Outras	4	22,2	4	17,4		5	21,7	3	16,7		6	20,7	2	16,7	
Localização	P. costal	15	83,3	19	82,6	0,95	18	78,3	16	88,9	0,38	22	75,9	12	100	**0,04**
	Outras	3	16,7	4	17,4		5	21,7	2	11,1		7	24,1	0	0	
Tamanho	<3 cm	6	33,3	9	39,1	0,71	9	39,1	6	33,3	0,71	12	41,4	3	25	0,23
	> 3 cm	12	66,7	14	60,9		14	60,9	12	66,7		17	58,6	9	75	
Tipos Histológicos	SM	10	55,6	9	39,1	**0,006**	12	52,2	7	38,9	**0,05**	14	48,3	5	41,7	0,32
	FSA	6	33,3	1	4,3		6	26,1	1	5,56		7	24,1	0	0	
	MFSA	2	11,1	4	17,4		2	8,7	4	22,2		3	10,3	3	25	
	SCG	0	0	5	21,7		2	8,7	3	16,7		3	10,3	2	16,7	
	CME	0	0	2	8,7		1	4,35	1	5,56		1	3,45	1	8,33	
	TMBN	0	0	2	8,7		0	0	2	11,1		1	3,45	1	8,33	
Padrão de crescimento	Infiltrativo	15	83,3	12	52,2	0,06	18	78,3	9	50	**0,05**	22	75,9	5	41,7	0,10
	Misto	1	5,56	3	13		1	4,35	3	16,7		2	6,9	2	16,7	
	Expansivo	2	11,1	8	34,8		4	17,4	6	33,3		5	17,2	5	41,7	
CNM	Ausente	11	61,1	18	78,3	0,24	16	69,6	13	72,2	0,85	20	69	9	75	0,88
	Presente	7	38,9	5	21,7		7	30,4	5	27,8		9	31	3	25	
Hemorragia	Ausente	16	88,9	15	65,2	0,08	20	87	11	61,1	**0,05**	24	82,8	7	58,3	**0,02**
	Presente	2	11,1	8	34,8		3	13	7	38,9		5	17,2	5	41,7	
Calcificação	Ausente	17	94,4	22	95,7	0,86	21	91,3	18	100	0,20	27	93,1	12	100	0,33
	Presente	1	5,56	1	4,35		2	8,7	0	0		2	6,9	0	0	
Necrose	0	2	11,1	7	30,4	0,23	6	26,1	3	16,7	0,43	8	27,6	1	8,33	0,10
	1	8	44,4	8	34,8		9	39,1	7	38,9		12	41,4	4	33,3	
	2	8	44,4	8	34,8		8	34,8	8	44,4		9	31	7	58,3	
Índice Mitótico	1	1	5,56	2	8,7	0,60	1	4,35	2	11,1	0,56	2	6,9	1	8,33	0,62
	2	1	5,56	2	8,7		2	8,7	1	5,56		3	10,3	0	0	
	3	16	88,9	19	82,6		20	87	15	83,3		24	82,8	11	91,7	
Grau	1	0	0	1	4,35	0,19	1	4,35	0	0	0,97	1	3,45	0	0	**0,04**
	2	2	11,1	5	21,7		3	13	4	22,2		7	24,1	0	0	
	3	16	88,9	17	73,9		19	82,6	14	77,8		21	72,4	12	100	
Infiltrado Inflamatório	Ausente	1	5,56	2	8,7	0,69	3	13	0	0	0,27	3	10,3	0	0	0,54
	Baixo	3	16,7	3	13		4	17,4	2	11,1		5	17,2	1	8,33	
	Moderado	7	38,9	11	47,8		8	34,8	10	55,6		12	41,4	6	50	
	Abundante	7	38,9	7	30,4		8	34,8	6	33,3		9	31	5	41,7	
Índice Proliferação	Baixo	5	27,8	13	56,5	0,06	9	39,1	9	50	0,49	15	51,7	3	25	0,25
	Alto	13	72,2	10	43,5		14	60,9	9	50		14	48,3	9	75	
Acumulação	Ausente	12	85,7	12	75		16	88,9	8	66,7		18	85,7	6	66,7	

Tabela 20-Associação entre as variáveis citométricas >2,5c, >5c e >9c e as variáveis clínicas e patológicas.