

# ASPETTI PATOGENETICI ED ISTOPATOLOGICI DEL SARCOMA DA SITO DI INOCULO FELINO

CLAUDIO PETTERINO, ANGELA MARCHIORI, ALESSANDRA RATTO\*,  
MARINA MARTANO<sup>§</sup>, PAOLO BURACCO<sup>§</sup>

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria - Facoltà di Medicina Veterinaria  
Università degli Studi di Padova - AGRIPOLIS Legnaro (PD)

\* Centro di Referenza Nazionale per l'Oncologia Veterinaria e Comparata

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Genova

<sup>§</sup>Dipartimento di Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

## Riassunto

Il presente lavoro è incentrato sulla valutazione critica dei dati attualmente disponibili relativamente agli aspetti patogenetici e istopatologici del sarcoma da sito di inoculo felino.

## Summary

*In the present paper we review the different pathogenetic and histopathologic aspects of feline injection site sarcomas.*

## INTRODUZIONE

L'incidenza del sarcoma da sito di inoculo è stimata in circa 20 casi ogni 100.000 gatti vaccinati<sup>1</sup>. Tale dato potrebbe essere sottostimato, in quanto in uno studio<sup>2</sup> pubblicato nel 1997 si sostiene che sarebbero colpiti 3,6 gatti ogni 10.000 animali vaccinati. Nella valutazione di questi dati bisogna però considerare che entrambi gli studi descrivono la situazione negli Stati Uniti, mentre si ritiene che in Europa l'incidenza del sarcoma da sito di inoculo sia più elevata. Ciò sarebbe associato alla più diffusa consuetudine di somministrare una maggiore quantità di farmaci, diversi dai vaccini, per via sottocutanea e intramuscolare<sup>3</sup>.

Uno studio di Kass e colleghi<sup>1</sup> dimostra che le reazioni alla vaccinazione si manifestano in maniera additiva; ovvero, il rischio di sviluppare una neoplasia cresce all'aumentare del numero di inoculazioni subite simultaneamente nella stessa regione corporea.

In un gatto che riceva una vaccinazione nella regione cervicale/interscapolare, la probabilità di sviluppare un fibrosarcoma in tale sede aumenta del 50%. Se il numero di vaccinazioni subite simultaneamente nello stesso sito sale a due, il rischio aumenta al 127%; in animali che ne ricevo-

no tre o quattro la probabilità che si sviluppi un fibrosarcoma sale al 175%<sup>1</sup>.

Diversi autori<sup>1,4,5</sup> identificano concordemente che l'arco di tempo in cui la neoplasia ha maggiori probabilità di svilupparsi sia tra i 3 mesi e i 3 anni successivi alla vaccinazione.

Le differenze di sesso e razza non sono statisticamente significative nella genesi di questa patologia. È da segnalare però che una ricerca recente ha evidenziato una sopravvivenza mediana alla malattia maggiore nelle femmine ovariectomizzate rispetto ai gatti maschi castrati (753 giorni contro 638)<sup>6</sup>. L'età dell'animale al momento della comparsa del tumore rappresenta un dato epidemiologicamente significativo<sup>5</sup>. Secondo uno studio condotto da Doddy e colleghi<sup>5</sup> infatti, l'età media dei gatti affetti da sarcomi da inoculo è più bassa rispetto a quella dei soggetti affetti da fibrosarcoma non vaccinale (nei primi è pari a 8 anni, nei secondi a 11).

## EZIOPATOGENESI

I primi a segnalare l'esistenza di un tumore felino che origina nei siti utilizzati per l'inoculazione dei vaccini sono stati Hendrick e Goldschmidt nel 1991<sup>7</sup>. Già alla fine degli anni '80, il Laboratorio di Patologia della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università della Pennsylvania<sup>7</sup> aveva osservato un aumento dell'incidenza delle reazioni vaccinali a localizzazione sottocutanea in questa specie. I due

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 3/6/2003 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 19/2/2004”.

ricercatori ne avevano correlato la maggior incidenza con l'introduzione, avvenuta nel 1987, della vaccinazione anti-rabbica, obbligatoria per il gatto nello stato della Pennsylvania. Successivamente, dal 1990, lo stesso centro aveva rilevato un aumento delle diagnosi di fibrosarcoma a localizzazione cutanea e sottocutanea, a carico delle regioni più frequentemente utilizzate per la somministrazione di vaccini (regione interscapolare e parte dorsale del collo).

Da allora sono state considerate molte variabili e sono state formulate molte teorie che potessero spiegare la patogenesi del sarcoma da inoculo nel gatto, teorie che comprendono manualità del veterinario, alluminio ed altri adiuvanti presenti nel vaccino, reazione infiammatoria abnorme e sensibilità di specie, fattori di crescita (*growth factors*), oncogeni (c-jun), geni oncosoppressori (p53) e agenti virali. Si sono inoltre considerati il diametro dell'ago usato, l'utilizzo della stessa siringa su pazienti diversi, la temperatura del vaccino al momento dell'inoculazione e l'abitudine di massaggiare il sito dell'iniezione<sup>3,8</sup>.

L'identificazione della presenza di alluminio, sotto forma di idrossido e fosfato, nelle lesioni post-vaccinali<sup>9</sup>, ha fatto ipotizzare un'implicazione di questa sostanza nella genesi del granuloma infiammatorio e, successivamente, della neoplasia. L'alluminio infatti è stato introdotto come adiuvante in una nuova generazione di vaccini nei confronti di rabbia e FeLV (Feline Leukemia Virus), introdotti negli Stati Uniti a partire dal 1985. Tali vaccini hanno avuto una notevole diffusione nel settore veterinario e poiché la loro comparsa sul mercato ha coinciso con l'aumento di incidenza delle reazioni vaccinali (benigne e maligne), secondo Hendrick e colleghi è possibile ipotizzare una relazione causale tra questi due eventi, ipotesi supportata dal riscontro della presenza di idrossido e fosfato di alluminio a livello della lesione<sup>9</sup> (Fig. 1).

Uno studio epidemiologico retrospettivo ha dimostrato l'effettiva esistenza di una relazione causale e temporale tra la vaccinazione per rabbia e/o per FeLV e la comparsa di un fibrosarcoma nel sito di inoculo<sup>1</sup>. Nello stesso studio sono stati analizzati tipi differenti di vaccini, per composi-

zione (con adiuvanti e senza) e per casa farmaceutica produttrice; al fine di valutare se fosse stato possibile associare uno specifico tipo di vaccino alla comparsa della neoplasia. Nel lavoro si confrontava la marca dei vaccini utilizzati in gatti che avevano sviluppato un fibrosarcoma nella zona di inoculo con quella dei vaccini utilizzati in gatti che avevano sviluppato un fibrosarcoma in altre regioni corporee. Tale studio non ha però messo in evidenza alcun tipo di relazione tra l'utilizzo di una determinata marca di vaccino (sia con, sia senza alluminio come adiuvante) e l'insorgenza della neoplasia. Non è ancora stato determinato quindi se la presenza di alluminio nella lesione post-vaccinale (infiammatoria o neoplastica) sia semplicemente il segno lasciato da una vaccinazione avvenuta in precedenza, oppure se possa rientrare tra i fattori coinvolti nella genesi neoplastica.

Secondo la teoria più diffusa, il sarcoma da inoculo si svilupperebbe da un'inappropriata o eccessiva reazione di tipo infiammatorio/immunitario associata alla persistenza di componenti vaccinali nel sito di inoculo<sup>10</sup>. Sarebbe proprio questo processo infiammatorio persistente la causa di un'incontrollata proliferazione di fibroblasti e miofibroblasti<sup>10</sup>, che dà origine alla neoplasia. In letteratura sono riportati casi clinici che confermano quest'ipotesi. Le lesioni descritte presentano aree di estesa flogosi granulomatosa a cui sono associati microscopici *foci* neoplastici<sup>9</sup>. Secondo gli autori si tratterebbe di lesioni che si trovano in uno stadio di transizione da processo infiammatorio a neoplasia. Diversi lavori hanno messo in evidenza come il gatto mostri una predisposizione del tutto particolare a sviluppare lesioni di tipo neoplastico nel punto in cui si sia verificato un trauma. Esempio ne sono i casi di sviluppo di un sarcoma<sup>11,12</sup> a seguito di un trauma oculare. Un recente lavoro contribuisce a sostenere la tesi secondo la quale sarebbe proprio un processo infiammatorio cronico, dovuto alla presenza di un corpo estraneo (filo da sutura non riassorbibile), il meccanismo alla base dello sviluppo neoplastico<sup>13</sup>.

Alcuni ricercatori ritengono che i *growth factors* (fattori di crescita, molecole essenziali nella regolazione degli eventi cellulari che portano alla formazione del tessuto di granulazione e alla riparazione tissutale) siano implicati nella progressione neoplastica delle lesioni post-vaccinali<sup>14,15</sup>. Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che, quando i fattori di crescita vengono aggiunti a colture di fibroblasti, le cellule assumono un fenotipo neoplastico<sup>15</sup>. Inoltre, una certa percentuale di tumori dell'uomo non solo possiede i recettori per i *growth factors*, ma è anche in grado di sintetizzarli, dando così luogo ad una stimolazione di tipo autocrino/paracrino<sup>16</sup>. Inoltre, oncogeni codificanti per i *growth factors* (come v-sis, che codifica per il PDGF [platelet derived growth factor – fattore di crescita derivato dalle piastrine], e v-erb che codifica per il recettore di EGF [epidermal growth factor – fattore di crescita epidermico]) possono promuovere lo sviluppo neoplastico inducendo un'esagerata espressione dei fattori di crescita e/o dei loro recettori<sup>15</sup>. È da notare che spesso questo evento non è dovuto a mutazioni dei geni codificanti per i *growth factors*, bensì sono i prodotti di altri oncogeni (quali *ras*) che ne provocano un'espressione esagerata<sup>16</sup>.

Uno studio immunostochimico svolto per determinare la presenza di *growth factors* in questa patologia felina ha

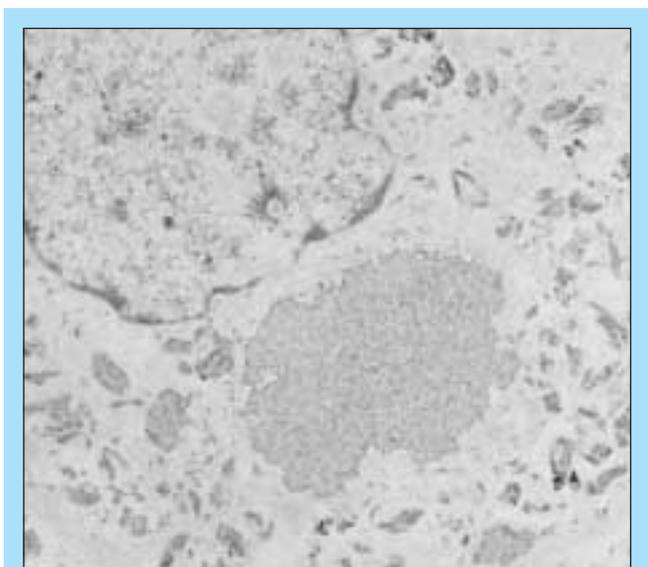


FIGURA 1 - Microscopia elettronica: è possibile osservare il contenuto amorfo intracitoplasmatico, riconducibile a depositi di alluminio, in un macrofago (per gentile concessione di Mattie Hendrick).

dimostrato la positività del sarcoma da inoculo nei confronti di EGF e del suo recettore, di PDGF e del suo recettore e di TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$  - fattore di crescita trasformante). Al contrario, i fibrosarcomi non associati ai siti di inoculo risultano negativi, o molto debolmente positivi, alla ricerca degli stessi fattori<sup>14</sup>. In particolare, nel sarcoma da inoculo i linfociti, i macrofagi e le cellule neoplastiche adiacenti agli infiltrati linfocitari mostrano un'intensa immunoreattività nei confronti di PDGF. Inoltre i linfociti coinvolti in sarcomi non vaccinali, o che si trovano in linfonodi sani, mostrano una reazione negativa verso il PDGF<sup>14</sup>. Tutto ciò ha portato alcuni ricercatori a formulare l'ipotesi che, nei sarcomi da inoculo, sia proprio la secrezione di PDGF ad opera dei linfociti ad arruolare i macrofagi e a promuovere la proliferazione dei fibroblasti<sup>15</sup>.

Un altro fattore che pare implicato nella genesi di questa neoplasia è c-jun. C-jun è un proto-oncogene che codifica per una proteina a localizzazione nucleare, l'AP-1 (Activator Protein-1), coinvolta nella trascrizione del DNA<sup>17,18</sup>. L'espressione di questa proteina rientra nel processo di trasduzione del segnale che induce la proliferazione cellulare. È stato dimostrato però che c-jun può avere un ruolo importante anche nella genesi tumorale. Nell'uomo infatti c-jun è in grado di mediare la stimolazione indotta dai *growth factors* durante la carcinogenesi<sup>19</sup>. Sembra inoltre che l'omologo di c-jun, v-jun, sia anch'esso implicato nella genesi tumorale. Studi compiuti su modelli sperimentali animali (topo e pollo) hanno trovato un'associazione tra l'espressione di v-jun e lo sviluppo di un sarcoma a partire da una soluzione di continuo<sup>20,21</sup>. In questi lavori si ipotizza un'interazione tra l'oncogene v-jun e i fattori coinvolti nel normale processo di riparazione della ferita<sup>21</sup>. Di tale oncogene è stata dimostrata l'aumentata espressione nel sarcoma da inoculo, grazie ad una tecnica immunostochimica<sup>14</sup>. Lo stesso lavoro dimostra inoltre la negatività dei sarcomi non vaccinali per l'aumento di espressione di c-jun. Tutti i fattori considerati finora hanno permesso di formulare la teoria secondo cui sarebbe l'aumentata stimolazione subita dai fibroblasti, ad opera dei *growth factors* rilasciati dai linfociti, a promuovere l'induzione e l'aumento di espressione di c-jun<sup>15</sup>.

Altri ricercatori hanno studiato l'implicazione del gene oncosoppressore p53 nella genesi del sarcoma da inoculo<sup>22</sup>. L'azione di questa proteina è essenziale nel permettere alla cellula di riparare i danni subiti dal DNA e, nel caso questi siano troppo estesi, è in grado di indurre l'apoptosi della cellula danneggiata; qualunque tipo di mutazione subita dalla sequenza del gene p53 è potenzialmente in grado di inibirne o ridurne l'attività, favorendo eventualmente la crescita neoplastica (questo tipo di mutazione pare sia l'alterazione genetica più comune nei tumori umani<sup>23</sup>). La prevalenza delle mutazioni a carico del gene p53 varia dallo 0 al 60% nei diversi tipi di neoplasie che colpiscono l'uomo, con un massimo di prevalenza dell'80% in alcuni sottotipi istologici<sup>23</sup>. Studi recenti hanno dimostrato che anche in alcuni tumori del gatto (istiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma, carcinoma mammario) sono presenti mutazioni del gene p53<sup>24,25</sup>. Sebbene l'incidenza di tali mutazioni sia piuttosto bassa (15% delle neoplasie feline studiate<sup>24</sup>), un gruppo di ricercatori ne ha valutato l'espressione nel sarcoma da inoculo felino: i risultati ottenuti da Nambiar e colle-

ghi dimostrano che difficilmente le mutazioni al gene p53 possono predisporre allo sviluppo di un sarcoma da inoculo, anche se in alcuni casi possono aver influito nel promuovere la crescita neoplastica<sup>22</sup>.

Gli studi compiuti fino ad oggi non hanno messo in luce alcun tipo di relazione tra infezione virale e genesi della neoplasia: sono stati studiati il virus dell'immunodeficienza felina (FIV)<sup>26</sup>, il poliomavirus<sup>27</sup> e il papillomavirus<sup>28</sup>. Nessuno di questi sembra avere alcun tipo di coinvolgimento nella patogenesi del sarcoma da inoculo e apparentemente non sono coinvolti neanche FeLV e FeSV (Feline Sarcoma Virus)<sup>29</sup>. Uno studio che ha tentato di mettere in relazione l'aumento di replicazione e/o espressione della sequenza di FeLV endogena con la patogenesi del sarcoma da inoculo<sup>30</sup> ha dato risultati che dimostrano che non esiste alcun tipo di legame tra i due fattori.

## LA LESIONE

Quando si iniziò a parlare di sarcoma da inoculo nel gatto, la lesione descritta venne istologicamente identificata come un fibrosarcoma (Fig. 2). A differenza del fibrosarcoma classico, questo dimostrava un'intensa reazione infiammatoria prevalentemente linfocitaria perilesionale (Figg. 3 e 4) ed era caratterizzato dalla presenza di un cer-

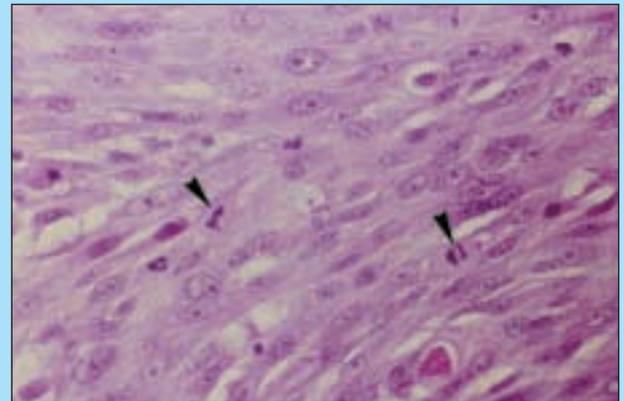


FIGURA 2 - Fibroblasti neoplastici organizzati in fasci irregolari con evidenti caratteristiche di malignità, nuclei irregolari con nucleoli prominenti, anisocitosi, anisocariosi e due mitosi (X 600, ematossilina-eosina).

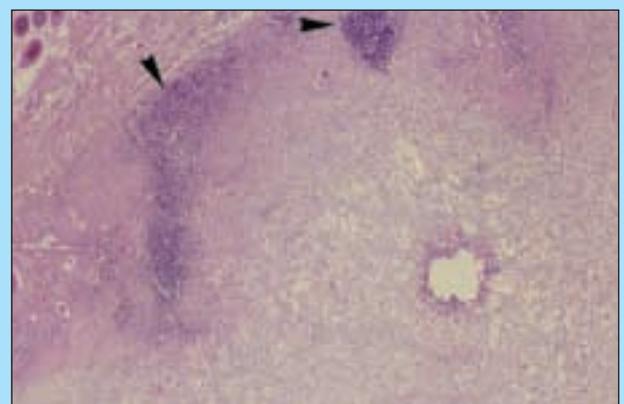


FIGURA 3 - Infiltrato infiammatorio linfocitario alla periferia della lesione neoplastica (X 40, ematossilina-eosina).

to numero di macrofagi contenenti materiale marrone-giastro nel citoplasma<sup>7</sup> (Fig. 5), identificato come residuo vaccinale. Occasionalmente era possibile osservare la presenza di formazioni pseudocistiche a contenuto amorfo riconducibili al tentativo dell'organismo di circoscrivere il materiale esogeno inoculato (Figg. 6 e 7).

Studi compiuti negli anni successivi hanno dimostrato come fosse errato parlare solo di fibrosarcoma da inoculo<sup>31</sup>, per cui attualmente si preferisce utilizzare la definizione più generica di *sarcomi da inoculo felini*. Tra le neoplasie iniezione-indotte, Hendrick e Brooks<sup>31</sup> hanno riconosciuto i seguenti diversi istotipi: il *fibrosarcoma*, caratterizzato dalla presenza di cellule fusiformi organizzate in fasci; l'*istiocitoma fibroso maligno*, in cui le cellule fusate dimostrano un andamento storiforme, associato alla presenza di cellule istiocitoidi atipiche; il *rabdomiosarcoma*, caratterizzato dalla presenza di cellule rotondeggianti con nuclei grandi, rotondi, con citoplasma leggermente eosinofilo, organizzate a formare strutture nidiformi; l'*osteosarcoma*, con morfologia simile a quella di un fibrosarcoma o di un istiocitoma fibroso maligno, in cui compaiono *foci* di tessuto osseo e/o di matrice osteoide neoplastica; il *condrosarcoma*, che si presenta composto da strati di cellule di forma variabile, da rotonda a poligonale, racchiuse in lacu-

ne circondate da uno stroma debolmente azzurrofilo, compatibile con una matrice cartilaginea.

Nello stesso studio, le differenze istologiche evidenziate sono state comprovate da un'indagine immunoistochimica compiuta su cinque casi rappresentativi delle diverse neoplasie (Tab. 1). Con questa indagine si è constatata l'immunoreattività nei confronti della vimentina, il filamento intermedio tipico delle cellule mesenchimali, in quattro dei cinque casi esaminati. Inoltre, quattro campioni hanno mostrato reattività per uno o più *markers* muscolari (desmina, actina muscolo-specifica, actina della muscolatura liscia). Il caso di condrosarcoma è risultato positivo nei confronti della proteina S100, confermando la diagnosi istologica. Inoltre, l'intensa positività di una delle lesioni nei confronti della proteina muscolare desmina contribuisce a sostenere l'ipotesi dell'esistenza di un rabdomiosarcoma tra i sarcomi da inoculo studiati, anche se non è sufficiente, da sola, a confermarne la diagnosi. La diversa positività nei confronti dei *markers* impiegati e l'aspetto istologico delle lesioni considerate hanno permesso di indicare un fenotipo fibroblastico/miofibroblastico per i sarcomi da inoculo felini.

La maggior parte dei sarcomi da inoculo si sviluppa nel sottocute della regione interscapolare. Altri siti in cui la

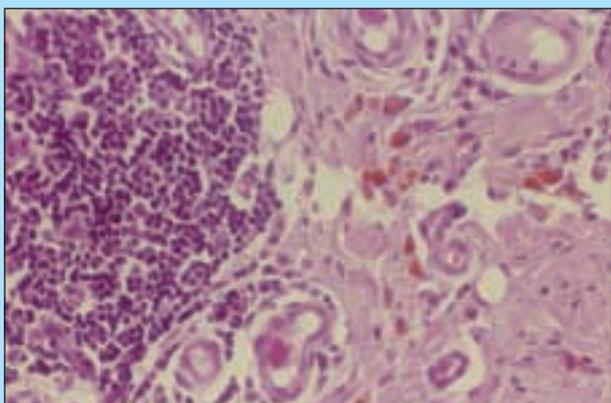


FIGURA 4 - Infiltrato infiammatorio linfocitario perilesionale (X 400, ematossilina-eosina).

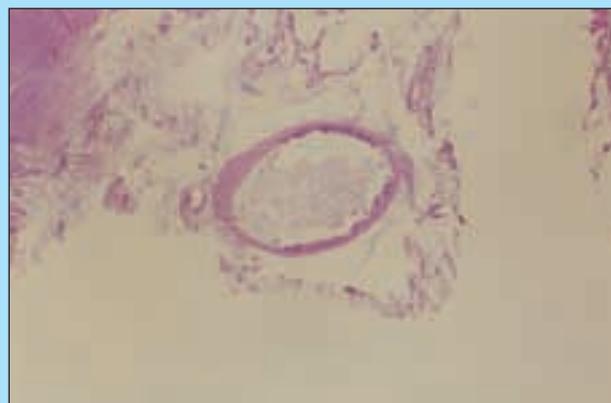


FIGURA 6 - In prossimità della lesione neoplastica si osserva la presenza di una formazione cistica contenente materiale amorfo riconducibile a probabile materiale inoculato (X 40, ematossilina-eosina).

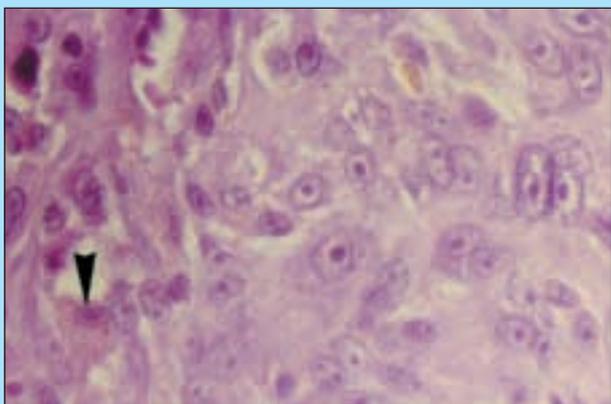


FIGURA 5 - Fibroblasti neoplastici con evidenti caratteristiche di malignità, nuclei irregolari con nucleoli prominenti, anisocitosi, anisocariosi e un macrofago (➤) con citoplasma contenente materiale amorfo di colore bruno (X 1000, ematossilina-eosina).

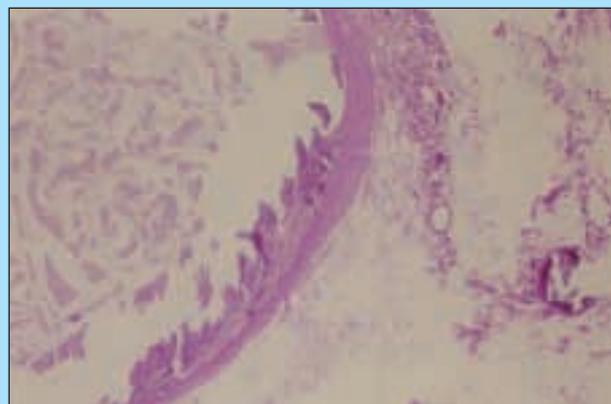


FIGURA 7 - Formazione cistica contenente materiale amorfo riconducibile a probabile materiale inoculato (particolare della Figura 6; X 250, ematossilina-eosina).

**Tabella 1**  
**Risultati immunohistochimici di cinque casi rappresentativi di sarcoma da inoculo felino (Hendrick e Brooks, 1994)**

Numero di caso	Vimentina	Desmina	Actina Muscolo-specifica	Actina della muscolatura liscia	S100	Diagnosi
1	-	-	-	-	-	Fibrosarcoma
2	4+	-	2+	2+	-	IFM*
3	1+	-	-	1+	-	Fibrosarcoma a cell. giganti
4	3+	-	1+	1+	2+	Condrosarcoma
5	4+	2+	-	-	-	Rabdomiosarcoma

- = assenza di colorazione; 1+=2-10% di cellule positive; 2+=10-25% di cellule positive; 3+= 25-50% di cellule positive; 4+= >50% di cellule positive.  
 \*Istiocitoma Fibroso Maligno.

neoplasia insorge, anche se in misura minore, sono il torace nelle sue parti dorsale e laterale, i fianchi e la muscolatura della coscia<sup>32</sup>. In ogni caso, la distribuzione delle lesioni corrisponde a quella dei siti anatomici più frequentemente utilizzati per la somministrazione di vaccini e farmaci per via sottocutanea o intramuscolare.

Macroscopicamente questi tumori si presentano di colore bianco-grigiastro, solidi e spesso ben demarcati o parzialmente incapsulati. Anche se appaiono facilmente isolabili dai tessuti circostanti, istologicamente dimostrano delle digitazioni che si infiltrano lungo i piani fasciali. Le dimensioni sono variabili, ma la maggior parte di essi ha un diametro di circa 4 centimetri al momento della diagnosi<sup>4</sup>. Spesso al centro della lesione è presente necrosi, che può conferire un aspetto pseudocistico alla massa<sup>32</sup>.

Poiché non esiste un unico tipo di sarcoma da inoculo, la descrizione dell'aspetto istologico è differenziata a seconda della categoria di appartenenza (fibrosarcoma, istiocitoma fibroso maligno, rabdomiosarcoma, osteosarcoma, condrosarcoma); i sottotipi maggiormente rappresentati sono il fibrosarcoma<sup>33</sup> e l'istiocitoma fibroso maligno<sup>31</sup>.

In ogni caso, nell'eseguire l'esame istologico del pezzo anatomico è importante valutare tutti i margini, laterali e profondo, al fine di fornire al clinico informazioni sull'effettiva completezza dell'escissione chirurgica (Figg. 8

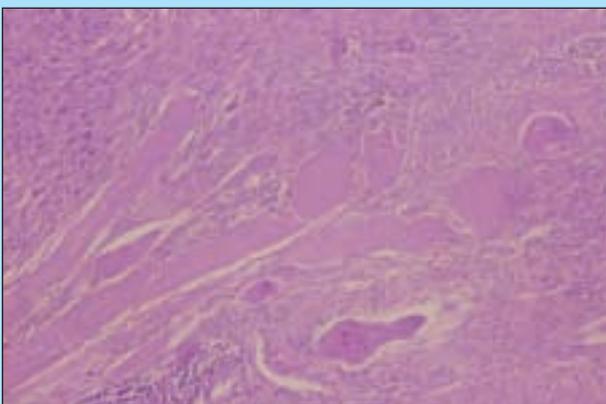
e 9). Questo aspetto è di estrema importanza data la caratteristica capacità di questo tipo di neoplasie nell'infiltrare i tessuti circostanti. Per facilitare questo tipo di valutazione è opportuno ricorrere alla identificazione dei margini di escissione mediante colorazione (ad esempio con inchiostro di china) al fine di renderne possibile la valutazione istopatologica dei margini della lesione asportata.

## FIBROSARCOMA DA INOCULO

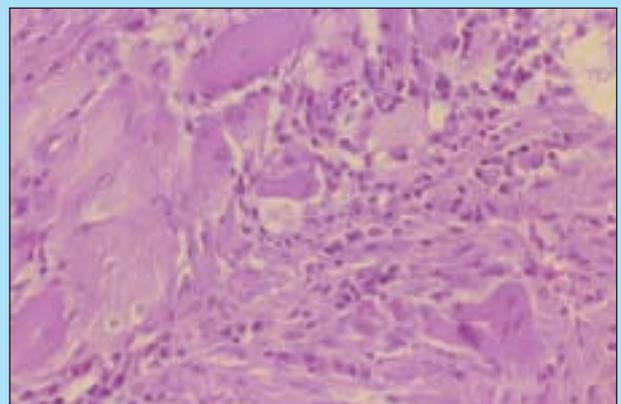
Si definisce come tale la neoplasia che origina dai fibroblasti e si sviluppa a partire dai siti di inoculo. È caratterizzata da un comportamento localmente aggressivo e da un alto tasso di recidiva locale.

Istologicamente, alla periferia del tumore sono visibili aggregati linfoistiocitari in cui le cellule istiocitarie possono contenere, nel citoplasma, depositi di materiale globulare di colore marrone-grigiastro identificato come residuo vaccinale<sup>34</sup>. Le cellule neoplastiche sono caratterizzate da ipercromasia nucleare ed anaplasia; non sono infrequenti cellule multinucleate.

Uno studio compiuto da Doddy e collaboratori<sup>5</sup> ha messo in evidenza le principali differenze tra il fibrosarcoma da inoculo felino e il fibrosarcoma felino non vaccinale. I



**FIGURA 8** - Fibroblasti neoplastici organizzati in fasci irregolari che infiltrano il tessuto muscolare perineoplastico e un piccolo infiltrato di cellule infiammatorie rappresentate da linfociti bene differenziati, (X 40, ematossilina-eosina).



**FIGURA 9** - Tessuto muscolare adiacente alla neoplasia infiltrato da cellule neoplastiche ed alcuni linfociti (X 400, ematossilina-eosina).

risultati di questo studio dimostrano l'esistenza di alcuni caratteri espressi in misura maggiore dai fibrosarcomi vaccinali rispetto a quelli non vaccinali<sup>5</sup>. Essi sono i seguenti (Tab. 2):

- *localizzazione*: il fibrosarcoma da inoculo è una neoplasia prevalentemente sottocutanea, mentre i fibrosarcomi non vaccinali, quando colpiscono la cute, si localizzano soprattutto nel derma;
- *necrosi*: il riscontro di aree di necrosi è molto più frequente nei fibrosarcomi da inoculo. In particolare, nel 25% dei casi esaminati le aree necrotiche contengono detriti nucleari ed un numero variabile di macrofagi e granulociti neutrofili;
- *infiammazione*: la presenza di infiammazione è prevalentemente associata al fibrosarcoma da inoculo. Tra le cellule che compongono l'infiltrato infiammatorio prevalgono i linfociti, ma nel tessuto circostante sono presenti anche macrofagi;
- *mitosi*: le figure mitotiche sono più frequenti nei fibrosarcomi da inoculo rispetto ai fibrosarcomi non vaccinali;
- *pleomorfismo cellulare*: è significativamente più evidente nei fibrosarcomi da inoculo rispetto a quelli non vaccinali;
- *matrice extracellulare*: entrambi i tipi di fibrosarcoma hanno una matrice extracellulare costituita prevalentemente da collagene, ma l'organizzazione di questa e delle cellule fusate tipiche della neoplasia è molto meno uniforme nel fibrosarcoma da inoculo. Inoltre, il fibrosarcoma da inoculo può dimostrare una certa variabilità nella composizione della matrice extracellulare, che può presentarsi di tipo mixomatoso, osteoide o condroide.

Un'analisi statistica compiuta a partire da queste caratteristiche interpolate con l'età dell'animale, ritenuta statisticamente significativa nella genesi di questa patologia, ha dimostrato che all'aumentare dell'età decresce la probabilità di sviluppare un fibrosarcoma da inoculo ( $P = 0,003$ ).

## ISTIOCITOMA FIBROSO MALIGNO

L'istiocitoma fibroso maligno, contemplato nella classificazione WHO (World Health Organization)<sup>34</sup>, è una neoplasia maligna caratterizzata da elevato pleomorfismo cel-

lulare, in cui si ha la proliferazione di due differenti componenti cellulari neoplastiche, una di tipo fusato e l'altra costituita da cellule giganti multinucleate (Figg. 10 e 11). La lesione mostra un fenotipo fibroblastico/miofibroblastico e probabilmente origina da cellule mesenchimali indifferenziate<sup>34</sup>.

L'istiocitoma fibroso maligno colpisce diverse specie di animali domestici ed è osservato più frequentemente nel cane, dove può presentarsi sotto forma di una massa singola in espansione, a localizzazione cutanea o splenica, oppure in forma multicentrica in diversi organi quali polmoni, milza, fegato, reni<sup>34</sup>.

Nel gatto l'istiocitoma fibroso maligno è una variante del sarcoma da inoculo<sup>34</sup>.

Nell'uomo è stato suddiviso in 5 sottotipi: storiforme-pleomorfo, infiammatorio, a cellule giganti, mixoide e angiomatoide, a seconda del tipo cellulare predominante e dell'organizzazione istologica del tumore<sup>34</sup>. I primi tre sottotipi sono stati segnalati negli animali domestici<sup>34</sup>.

*Storiforme-pleomorfo*: è caratterizzato da cellule fibroblasto-simili organizzate a raggiera e da cellule istiocitoidi. Nella lesione è tipicamente presente un infiltrato di linfociti, plasmacellule, neutrofili e rari granulociti eosinofili.

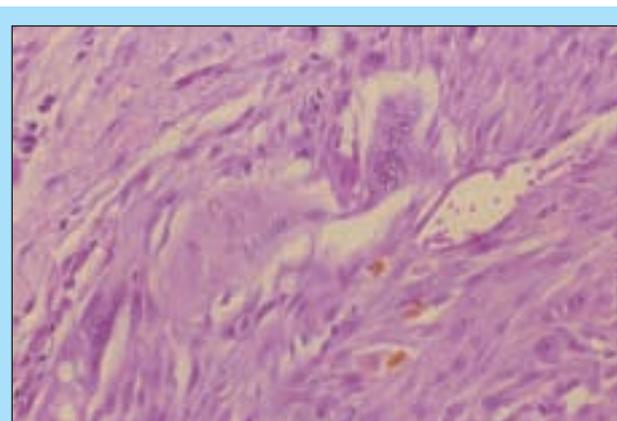


FIGURA 10 - Istiocitoma fibroso maligno: nel preparato si osservano fasci irregolari di fibroblasti neoplastici e due cellule giganti, con nuclei atipici, multipli ed evidenti criteri di anisocariosi (X 400, ematossilina-eosina).

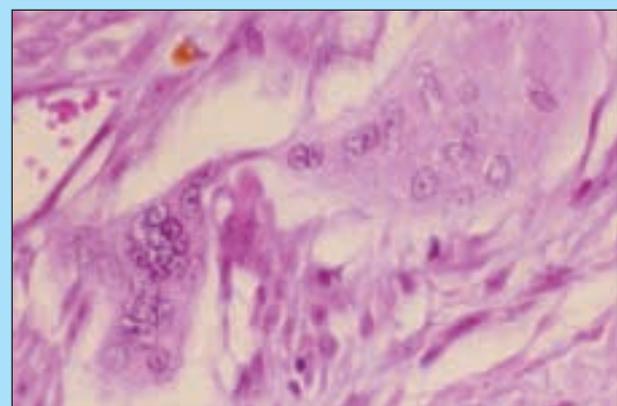


FIGURA 11 - Istiocitoma fibroso maligno: nel preparato si osservano fibroblasti neoplastici organizzati in fasci irregolari e due cellule giganti con nuclei atipici, multipli, ed evidenti criteri di anisocariosi (particolare della Figura 6; X 1000, ematossilina-eosina).

**Tabella 2**  
Analisi univariata di 165 fibrosarcomi felini  
(fibrosarcomi da inoculo vs fibrosarcomi non vaccinali)  
(Doddy et al., 1996; modificato)

Caratteristiche microscopiche	P
Localizzazione cutanea	< 0,001*
Necrosi del tumore	< 0,001*
Infiammazione	< 0,001*
Mitosi / 10 campi a 400X	0,021*
Pleomorfismo cellulare	< 0,001*
Variabilità nella densità della matrice extracellulare	< 0,001*

\*Analisi del  $\chi^2$

• t-Test

Le cellule istiocitoidi sono frequentemente cariomegaliche o multinucleate e presentano atipia nucleare.

*Infiammatorio*: in questo sottotipo, occasionali e bizzarre cellule istiocitoidi sono parzialmente nascoste da un infiltrato di cellule infiammatorie costituito da linfociti, plasmacellule, eosinofili e rari granulociti neutrofili.

*A cellule giganti*: questi tumori sono caratterizzati dalla presenza di numerose cellule giganti multinucleate associate a cellule fusate e ad istiociti mononucleati. Questo sottotipo è il più frequente nel gatto, in cui viene definito anche *tumore a cellule giganti dei tessuti molli*.

## IL GRADO ISTOLOGICO

Per i sarcomi dei tessuti molli le caratteristiche istologiche considerate nella valutazione del grado istologico sono: la cellularità della lesione, il grado di differenziazione cellulare, la quantità di stroma presente, l'entità della vascolarizzazione della neoplasia, la presenza di necrosi e l'attività mitotica (Tab. 3).

In base a questi parametri le neoplasie vengono suddivise in 3 categorie: a basso grado istologico, a grado istologico intermedio, ad elevato grado istologico.

Recentemente Couto e coll.<sup>33</sup> hanno proposto un sistema di *grading* alternativo, già adattato alle neoplasie canine, per la valutazione dei fibrosarcomi da inoculo.

**Tabella 3**  
Grado istologico dei sarcomi dei tessuti molli  
(MacEwen e Withrow, 1996)

Basso grado istologico	Alto grado istologico
Bassa cellularità	Elevata cellularità
Elevata differenziazione cellulare	Scarsa differenziazione cellulare
Elevata quantità di stroma	Scarsa quantità di stroma
Scarsa vascolarizzazione	Elevata vascolarizzazione
Scarsa presenza di necrosi	Elevata presenza di necrosi
Meno di 5 mitosi / 10 campi ad elevato ingrandimento	Più di 5 mitosi / 10 campi ad elevato ingrandimento

I parametri considerati sono i seguenti: differenziazione cellulare, indice mitotico, estensione della necrosi presente nella lesione (Tab. 4). Per ognuno di questi caratteri viene attribuito un punteggio specifico (da 1 a 3) a seconda delle caratteristiche istologiche presenti nella lesione. La valutazione finale del grado istologico viene compiuta sommando i punteggi ottenuti: il *grado 1* corrisponde a punteggi pari a 3 o 4; il *grado 2* corrisponde ad un punteggio complessivo di 5 o 6; il *grado 3* è da attribuire alle neoplasie che ottengono punteggi di 7, 8 o 9.

Un fattore correlato positivamente con il grado istologico dei fibrosarcomi da inoculo è rappresentato dalla presenza di cellule giganti neoplastiche multinucleate<sup>33</sup>. I risultati del lavoro di Couto e coll.<sup>33</sup> dimostrano che il numero di cellule giganti multinucleate cresce con l'aumentare del grado istologico ( $P < 0,001$ ). Infatti, è possibile riscontrare la presenza di queste cellule nel 75% dei tumori di grado 3, nel 61,9% dei tumori di grado 2, mentre esse sono assenti nelle neoplasie di grado 1. Da quest'analisi si suppone che la presenza, nel tumore, di cellule giganti neoplastiche multinucleate sia associata ad un fenotipo neoplastico maggiormente indifferenziato.

## COMPORAMENTO BIOLOGICO

Tra i sarcomi da inoculo il fibrosarcoma è il sottotipo istologico riscontrato più di frequente<sup>31,33</sup>. Per questo motivo la maggior parte dei lavori che studiano il comportamento biologico di queste neoplasie porta come esempio le caratteristiche del fibrosarcoma da inoculo, spesso paragonandolo al fibrosarcoma felino non associato alle vaccinazioni.

## Crescita

Il fibrosarcoma da inoculo si presenta più localmente invasivo rispetto al fibrosarcoma non vaccinale ( $P = 0,014$ )<sup>5</sup> rispetto al quale pare caratterizzato anche da una crescita più rapida. Confermano quest'ipotesi le maggiori dimensioni del tumore al momento dell'asportazione chirurgica<sup>4</sup> e la maggiore presenza di necrosi e cavitazioni

**Tabella 4**  
Punteggi associati alle caratteristiche istologiche del tumore (Couto et al., 2002)

Punteggio	Caratteristiche istologiche del tumore		
	Differenziazione cellulare	Attività mitotica	Necrosi
1	Cellule neoplastiche altamente somiglianti a cellule ben differenziate e mature	Da 1 a 9 figure mitotiche in 10 campi microscopici (x 400)	Necrosi assente
2	Tumore che presenta un fenotipo istologico ben differenziato	Da 10 a 19 figure mitotiche in 10 campi microscopici (x 400)	Minore del 50% dell'area totale del campione
3	Tumore scarsamente differenziato	20 o più figure mitotiche in 10 campi microscopici (x 400)	Maggiore del 50% dell'area totale del campione

Nella valutazione del grading va sommato il punteggio (1, 2 o 3) ottenuto per ogni categoria.

nella massa neoplastica<sup>5</sup>. Queste ultime, infatti, potrebbero essere indice di una rapida crescita del tessuto neoplastico, tale da superare in velocità anche lo sviluppo di un adeguato apporto ematico<sup>5</sup>. Recentemente, Couto e colleghi<sup>33</sup> hanno ipotizzato che la presenza di necrosi nella massa tumorale sia conseguenza di una caratteristica biologica tipica della crescita del fibrosarcoma da inoculo. Infatti, dalle indagini immunoistochimiche compiute (ricerca del fattore VIII per l'analisi della densità vascolare) risulta che la densità vascolare media alla periferia dei tumori esaminati è significativamente maggiore rispetto a quella presente al centro delle lesioni ( $P < 0,001$ ). Contemporaneamente, non è stata rilevata alcuna differenza dell'indice di proliferazione cellulare, mediante valutazione immunoistochimica del Ki-67, tra la periferia e il centro della neoplasia ( $P = 0,086$ )<sup>33</sup>.

La conclusione tratta è che le aree di necrosi e le cavità presenti nel tumore sono da attribuire ad una differenza nella vascolarizzazione tra le parti periferiche ed interne della lesione. Essendo l'indice di proliferazione costante in tutte le aree della neoplasia, è logico aspettarsi necrosi e morte cellulare nei punti in cui l'apporto ematico è minore. In ogni caso non è escluso che parte della necrosi presente nella neoplasia (in modo particolare le cavità circondate dal tessuto di granulazione) sia da attribuire ad una reazione necrotizzante conseguente all'inoculazione di xenobiotici<sup>5,32,33</sup>.

## Recidive

Il fibrosarcoma da inoculo felino sviluppa recidive nel 62,1% dei casi<sup>4</sup>. Inoltre è caratterizzato da una probabilità maggiore di dare recidive rispetto al fibrosarcoma felino non vaccinale ( $P = 0,03$ )<sup>4</sup> (Tab. 5).

Risultati analoghi sono stati ottenuti da Couto e Macy<sup>36</sup>, i quali sostengono che i sarcomi da inoculo sviluppano recidive, in seguito ad asportazione chirurgica, dal 30 al 70% dei casi.

Hendrick e colleghi<sup>4</sup> hanno evidenziato come la maggior parte delle recidive (86%) si sviluppino entro i 6 mesi dall'asportazione chirurgica della massa neoplastica primaria. È stato anche riscontrato che nel 22% degli animali la neoplasia può recidivare fino a 2, 3 o 4 volte in un arco di tempo di due anni. Le recidive generalmente si sviluppano nello stesso sito della massa primaria o alla periferia dell'incisione chirurgica.

**Tabella 5**  
Percentuale di recidive dei fibrosarcomi felini, dopo asportazione chirurgica, negli anni 1991-1992 (Hendrick et al., 1994; modificato)

Fibrosarcoma	% Recidive
Associato al sito di inoculo	62,1
Non associato al sito di inoculo	42,6

## Metastasi

La percentuale di metastasi dei sarcomi da inoculo felini, segnalata in letteratura, varia dal 10 al 25%<sup>36-38</sup>. È stato notato che le metastasi insorgono contemporaneamente, o subito dopo la comparsa di recidiva del tumore primario<sup>38</sup>. Gli autori ipotizzano che le asportazioni chirurgiche -ripetute nel tempo- delle recidive possano portare alla selezione di una popolazione di cellule neoplastiche più aggressive, con maggiori capacità di colonizzare tessuti lontani<sup>38</sup>. Non è da escludere che il protrarsi del periodo in cui l'animale è soggetto a trattamenti terapeutici (escisioni multiple delle recidive) dia alle metastasi il tempo per svilupparsi<sup>38</sup>.

In letteratura è segnalato un caso di metastasi localizzate a livello mediastinico e polmonare, originatesi da un fibrosarcoma da inoculo a localizzazione interscapolare<sup>39</sup>. A tre mesi dall'intervento di rimozione del tumore primario, il soggetto ha manifestato difficoltà respiratorie aggravatescenti. Con l'esame radiografico del torace era stata evidenziata la presenza di un'area di radio-opacità a livello cardiaco, oltre alla presenza di diversi noduli polmonari. La diagnosi certa di metastasi è stata ottenuta tramite l'esame autoptico dell'animale con cui è stata rilevata la presenza di noduli metastatici nel mediastino craniale, nelle pleure e nei polmoni. L'esame istologico dei noduli polmonari e mediastinici e del tumore primario aveva dimostrato una discreta somiglianza morfologica tra questi. Il tumore primario, però, era caratterizzato dalla presenza di un numero maggiore di cellule multinucleate neoplastiche, presenza di aree più estese di necrosi coagulativa, maggiore pleomorfismo cellulare e invasione vascolare da parte delle cellule neoplastiche.

## CONCLUSIONI

Allo stato attuale non esistono ancora dati definitivi ed inequivocabili che dimostrino una eziopatogenesi univoca del sarcoma da sito di inoculo felino. Come descritto, tale neoplasia si manifesta con aspetti variabili, anche se si può affermare che un punto in comune potrebbe essere costituito da insulti di vario tipo, che interessano i tessuti sottocutanei. Sebbene siano noti alcuni fattori prognostici, l'approccio clinico rimane pressoché invariato indipendentemente dal tipo istologico. Il trattamento si basa sull'escisione "en bloc", eventualmente associata alla chemioterapia con doxorubicina e a radioterapia. In ogni caso la conoscenza dei dettagli patogenetici e patologici di questa "patologia" felina, appare utile come approfondimento dei meccanismi ad essa sottostanti il che ne consente di acquisire un approccio conoscitivo più completo.

Attualmente, al fine di determinare gli esatti meccanismi patogenetici, sono necessari ulteriori studi di approfondimento sui meccanismi scatenanti questa patologia, utili in primo luogo a cercare di prevenirne l'insorgenza. Tali indagini dovrebbero comprendere quindi sia studi istomorfologici sia studi clinici che permettano di chiarire maggiormente i meccanismi coinvolti nella genesi e nella crescita tumorale. Tali risultati potrebbero quindi non solo permettere di comprendere meglio la patologia in sé, ma anche orientarci verso nuove e più utili terapie, applicabili a ciascun caso.

## Ringraziamenti

Si ringrazia la Dr.ssa Mattie Hendrik per aver fornito la Figura 1 e per la cortese e preziosa collaborazione la Dr.ssa Ester Arcicasa.

## Parole chiave

Sarcoma vaccino-indotto felino, sarcoma da sito di inoculo felino, immunohistochimica, patogenesi, patologia.

## Key words

Feline vaccine-associated sarcoma, feline injection site sarcoma, immunohistochemistry, pathogenesis, pathology.

## Bibliografia

- Kass PH, Barnes WG, Spangler WL, et al. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. JAVMA 203:396-405, 1993.
- Coyne MJ, Reeves NC, Rosen DK Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992. JAVMA 210:249-251, 1997.
- Martano M, Buracco P Sarcomi iniezione-indotti del gatto: stato dell'arte. Medicina felina 2:7-11, 2001.
- Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, et al. Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at non-vaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). JAVMA 205:1425-1429, 1994.
- Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW, Janovitz EB Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. J Comp Path 114:165-174, 1996.
- Cohen M, Wright JC, Brawner WR Jr., et al. Use of surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine-associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000). JAVMA 219:1582-1589, 2001.
- Hendrick MJ, Goldschmidt MH Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? JAVMA 199:968, 1991.
- McEntee MC, Page RL Feline Vaccine-Associated Sarcomas. J Vet Intern Med 15:176-182, 2001.
- Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, et al. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminium. Cancer Research 52:5391-5394, 1992.
- Hendrick MJ Historical review and current knowledge of risk factors involved in feline vaccine-associated sarcomas. JAVMA 213:1422-1423, 1998.
- Dubielzig RR Ocular sarcoma following trauma in three cats. JAVMA 184:578-581, 1984.
- Dubielzig RR, Everitt J, Shaddock JA, Albert DM Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. Vet Pathol 27:62-65, 1990.
- Buracco P, Martano M, Morello E, Ratto A Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat. The Vet Journal 163:105-107, 2002.
- Dambach D, Carlson J, Riddle D, Hendrick MJ Immunohistochemical identification and localization of growth factors in feline postvaccinal lesions. Vet Pathol 33:A 150, 1996.
- Hendrick MJ Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis. JAVMA 213:1425-1426, 1998.
- Kumar, Cotran, Robbins. Chapter 6, Neoplasia. In: Basic Pathology. Saunders Company, Philadelphia. Seventh edition, 2002, pp:165-210.
- Bohmann D, Bos TJ, Admon A, et al. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. Science 238:1386-1392, 1987.
- Angel P, Allegretto EA, Okino ST, et al. Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. Nature 332:166-171, 1988.
- Szabo E, Riffe ME, Steinberg SM, et al. Altered c-jun expression: an early event in human lung carcinogenesis. Cancer Research 56:305-315, 1996.
- Shalaby F, Schuh AC, Breitmann ML Two distinct target cells for v-jun mediated wound tumorigenesis. Oncogene 9:2579-2588, 1994.
- Marshall GM, Vanhamme L, Wong W-Y, et al. Wounding acts as a tumor promoter in chickens inoculated with avian sarcoma virus 17. Virology 188:373-377, 1992.
- Nambiar PR, Haines DM, Ellis JA, et al. Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. Am J Vet Research 61 (10):1277-1281, 2000.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Research 54:4855-4878, 1994.
- Mayr B, Reifinger M, Alton K, Schaffner G Novel p53 tumor suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. Vet Research Comm 22:249-255, 1998.
- Mayr B, Blauensteiner J, Edlinger A, et al. Presence of p53 mutations in feline neoplasms. Research in Vet Science 68:63-69, 2000.
- Kidney BA, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. Am J Vet Research 61 (9):1037-1041, 2000.
- Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, et al. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for polyomavirus DNA and antigen. Am J Vet Research; 62 (6):828-832, 2001.
- Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, et al. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen. Am J Vet Research 62 (6):833-839, 2001.
- Ellis JA, Jackson ML, Bartsch RC, et al. Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. JAVMA 209:767-771, 1996.
- Kidney BA, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas. Am J Vet Research 62 (12):1990-1994, 2001.
- Hendrick MJ, Brooks JJ Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry Vet Pathol 31:126-129, 1994.
- Hendrick MJ Feline vaccine-associated sarcomas. Cancer Investigation 17 (4):273-277, 1999.
- Couto SS, Griffey SM, Duarte PC, Madewell BR Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. Vet Pathol 39:33-41, 2002.
- Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore FM, et al. Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. Second series, Volume II, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., 1998.
- Couto CG, Macy DW: Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma. JAVMA 213:1426-1427, 1998.
- Cronin K, Page RL, Spodnick G, et al. Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats. Vet Radiol Ultrasound 39 (1):51-56, 1998.
- Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, et al. Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). JAVMA 216:58-61, 2000.
- Rutmann DG, Van Alstine WG, Doddy F, et al. Pulmonary and mediastinal metastases of a vaccination-site sarcoma in a cat. Vet Pathol 33:466-469, 1996.