ANDRESSA GIANOTTI CAMPOS NITRINI

Utilização da Fosfoetanolamina Sintética (FO-S) no sarcoma de aplicação felino – estudo clínico-cirúrgico, histopatológico, imuno-histoquímico, tomográfico e termográfico.

São Paulo

2019

ANDRESSA GIANOTTI CAMPOS NITRINI

Utilização da Fosfoetanolamina Sintética (FO-S) no sarcoma de aplicação felino – estudo clínico-cirúrgico, histopatológico, imuno-histoquímico, tomográfico e termográfico.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof.^a Dr.^a Julia Maria Matera

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3793
FMVZ

Nitrini, Andressa Gianotti Campos

Utilização da Fosfoetanolamina Sintética (FO-S) no sarcoma de aplicação felino: estudo clínico-cirúrgico, histopatológico, imuno-histoquímico, tomográfico e termográfico / Andressa Gianotti Campos Nitrini. – 2019.
119 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Julia Maria Matera.

1. Fosfoetanolamina Sintética. 2. Felino. 3. Fibrossarcoma. 4. Fosfolípidios antitumorais. 5. Injeção. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "UTILIZAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA (FO-S) NO SARCOMA DE APLICAÇÃO FELINO - ESTUDO CLÍNICO-CIRÚRGICO, HISTOPATOLÓGICO, IMUNOHISTOQUÍMICO E TERMOGRÁFICO.", protocolada sob o CEUA nº 2940110715, sob a responsabilidade de **Julia Maria Matera** e equipe; **Andressa Gianotti Campos Nitrini** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 02/03/2016.

We certify that the proposal "Synthetic Phosphoethanolamine in Feline Injection-Site Sarcoma: Clinical, Surgical, Immunohistochemical and Thermography Evaluation.", utilizing 20 Cats (20 males), protocol number CEUA 2940110715, under the responsibility of **Julia Maria Matera** and team; **Andressa Gianotti Campos Nitrini** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/02/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2015** a **08/2017**

Área: **Cirurgia**

Origem: **HOVET/FMVZ/USP**

Espécie: **Gatos**

sexo: **Machos**

Idade: **a**

N: **20**

Linagem: **N/A**

Peso: **a**

Resumo: Propõe-se a utilização de um novo tratamento adjuvante no Sarcoma de Aplicação Felino, composto por um fosfolípide antitumoral denominado Fosfoetanolamina Sintética, cuja aplicação em algumas neoplasias em humanos e animais de laboratório vem demonstrando resultados promissores.

Local do experimento:

São Paulo, 07 de outubro de 2016

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NITRINI, Andressa Gianotti Campos

Título: **Utilização da Fosfoetanolamina Sintética (FO-S) no sarcoma de aplicação felino – estudo clínico-cirúrgico, histopatológico, imuno-histoquímico, tomográfico e termográfico.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Ary** e **Irene** por tornarem deles, todos os meus sonhos.
E por não medirem esforços para realizá-los comigo.
Amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me abençoar diariamente com todas as oportunidades que alguém poderia desejar.

A querida professora e orientadora **Julia Maria Matera**, pela confiança e suporte inestimável em todos estes anos, na minha profissão e vida pessoal.

Aos meus maiores amores **Beto, Lucas e Felipe**, pelo incentivo, apoio, carinho e companheirismo nas horas boas e ruins.

Aos meus pais, **Ary Campos e Irene Gianotti Campos**, meu irmão **André Gianotti Campos**, minha super-cunhada-estatística **Juliana Bonini Campos** e minha sobrinha **Bianca Bonini Campos** sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos meus sogros **Ricardo e Roseli Nitrini**, por todo incentivo, entendendo meus períodos de ausência familiar para que eu pudesse me dedicar a mais este projeto.

Aos melhores enfermeiros **Clédson Lélis dos Santos, Jesus dos Anjos Vieira, José Miron Oliveira da Silva e Otávio Rodrigues dos Santos**, por toda ajuda na execução deste trabalho e pelo convívio que deixa tudo mais leve.

Aos amigos **Patrícia Ferreira de Castro** (parceira de escada rolante), **Ayne Murata, Claudia Inglez, Erik Januário, Erika Zanuto, Igor Santos, Samanta Melo e Sebastian Aristizabal** pelo suporte e amizade, dentro e fora do Serviço de Cirurgia.

Aos professores, técnicos e veterinária do **Serviço de Diagnóstico por Imagem**, pelo suporte na execução e avaliação das tomografias e radiografias.

As professoras e veterinárias do **Serviço de Anestesiologia** e de cuidados paliativos, pelo suporte na execução das cirurgias e tomografias, além do cuidado com os pacientes no pós-operatório.

A equipe do **Serviço de Patologia** pela execução dos exames de imuno-histoquímica.

A equipe do **Laboratório clínico** pela execução dos exames laboratoriais.

Aos amigos **Daniel Sanches e Carolina Gonçalves** do laboratório CVAP, pela execução dos exames histopatológicos.

Ao Prof. **Durvanei Augusto Maria** e toda sua equipe do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, pelo fornecimento da medicação Fosfoetanolamina-Sintética.

Aos queridos secretários **Belarmino Ney** e **Lívia Gimenes**, pelo suporte e apoio na execução deste projeto e em tantos outros momentos no HOVET.

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio financeiro concedido.

Ao laboratório **Ourofino** pelo auxílio financeiro concedido.

Aos **tutores** e seus **animais de estimação** que participaram deste projeto, com tanta confiança e dedicação.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”

Paulo Freire

RESUMO

NITRINI, A.G.C. **Utilização da Fosfoetanolamina Sintética (FO-S) no sarcoma de aplicação felino – estudo clínico-cirúrgico, histopatológico, imuno-histoquímico, tomográfico e termográfico**. 2019. 119f. Tese. (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Sarcoma de aplicação felino (SAF) é uma neoplasia cutânea mesenquimal que surge em locais de aplicação de vacina, medicamentos ou traumas frequentes, cujo tratamento se baseia nos princípios da cirurgia oncológica, ou seja, excisão com amplas margens, associada à radioterapia e/ou quimioterapia. Entretanto, pelo seu caráter maligno e infiltrativo, os índices de recidiva são altos e as terapias, com baixas taxas de sucesso. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do agente antitumoral Fosfoetanolamina Sintética (FO-S) como terapia neoadjuvante e adjuvante, a partir das características clínicas, termográficas, tomográficas, histológicas e imuno-histoquímicas dos SAF. Vinte e um felinos foram incluídos no estudo, com idade média de 9,1 anos, peso médio de 4,8kg, sendo 76% fêmeas e 24% machos, sendo 76% sem raça definida. Sete já haviam sido submetidos à cirurgia prévia para remoção do SAF, com recidiva em média 6,8 meses depois. A aplicação de FO-S foi realizada por via endovenosa, na dose de 70mg/kg, semanalmente, por quatro sessões, iniciando-se imediatamente após a cirurgia (G1 = 11 animais) ou quatro sessões pré e quatro pós procedimento cirúrgico (G2 = 10 animais). A maioria dos tumores se classificou como fibrossarcoma, sendo 57% grau II, 33% grau III e 10% grau I. As imagens termográficas obtidas por câmera infravermelha não detectaram diferença estatisticamente significativa nas temperaturas da área tumoral com relação à área saudável ao redor, nem entre as temperaturas do tumor antes e após o ciclo de aplicação da FO-S, nos animais do G2. A tomografia computadorizada mostrou diferença significativa na mensuração dorsoventral das lesões, quando comparada ao uso do paquímetro, porém o aspecto e tamanho dos tumores permaneceram inalterados depois do tratamento com FO-S. O mesmo pode ser observado na análise imuno-histoquímica, que não detectou diferença na expressão de Ki-67 e caspase-3 nos tumores do G1, quando comparados àqueles submetidos a FO-S, no G2. Durante o período de acompanhamento de 18 meses, a sobrevida média foi de 9 meses, a taxa de recidiva foi de 24% e o intervalo livre de doença

local foi, em média, 9 meses. Sem efeitos adversos importantes, a FO-S se mostrou segura à utilização em felinos, porém não alterou o tempo médio de intervalo livre de doença nem a sobrevida dos animais, quando comparada ao grupo controle. A inclusão de mais pacientes e maior tempo de observação se fazem necessários para avaliar a eficácia do agente no tratamento do SAF.

Palavras-chave: Fosfoetanolamina sintética. Felino. Fibrossarcoma. Fosfolipídios antitumorais. Injeção.

ABSTRACT

NITRINI, A.G.C. **Use of Synthetic Phosphoethanolamine (FO-S) in feline injection-site sarcoma – clinical, surgical, histopathological, immunohistochemical, tomographic and thermographic study.** 2019. 119f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Feline injection-site sarcoma (FISS) is a mesenchymal neoplasm that can develop within the skin at sites of previous application of vaccine, medications or frequent traumas, whose treatment is based on the principles of oncologic surgery, i.e., excision with wide margins, associated with radiotherapy and/or chemotherapy. However, due to its malignant and infiltrative character, the rates of recurrence are high and the therapies, with low success rates. The objective of this study was to evaluate the efficacy of the antitumor agent Synthetic Phosphoethanolamine (FO-S) as neoadjuvant and adjuvant therapy, based on the clinical, thermographic, tomographic, histological and immunohistochemistry characteristics of FISS. Twenty-one cats were included, with a mean age of 9.1 years, mean weight of 4.8kg, 76% females and 76% mixed breed. Seven cats had already undergone previous surgery for removal of FISS, with recurrence on average 6.8 months later. The application of FO-S was performed intravenously, at a dose of 70mg/kg, weekly, for four sessions, starting immediately after surgery (G1 = 11 cats) or four sessions before and four after the surgical procedure (G2 = 10 cats). Most tumors were classified as fibrosarcoma, being 57% grade II, 33% grade III and 10% grade I. The thermographic images obtained by infrared camera did not detect a statistically significant difference in the temperature of the tumor area in relation to the surrounding healthy area, nor between the tumor temperatures before and after the FO-S application cycle in animals of G2. Computed tomography showed a significant difference in the dorsoventral measurement of the lesions when compared to the use of the caliper, but the appearance and size of tumors remained unchanged after treatment with FO-S. The same could be observed in the immunohistochemical analysis, which did not detect difference in expression of Ki-67 and caspase-3 in the tumors of G1, when compared to those submitted to FO-S, in G2. During the 18-month follow-up period, the mean survival was 9 months, the recurrence rate was 24%, and disease-free interval was 9 months on average. Without significant adverse effects, FO-S proved

to be safe to use in cats but did not alter the mean time of disease-free interval or survival when compared to the control group. Inclusion of more patients and longer observation time are necessary to evaluate the efficacy of the agent in the treatment of FISS.

Key-words: Synthetic Phosphoethanolamine. Feline. Fibrosarcoma. Antitumor Phospholipids. Injection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química da fosfoetanolamina sintética	46
Figura 2 -	Felino nº18 (G2) - Fotografias do procedimento cirúrgico.....	65
Figura 3 -	Imagens termográficas (A,C,E,G) e imagens padrão correspondentes (B,D,F,H) de felinos com SAF, no momento do diagnóstico.....	69
Figura 4 -	Felino nº21 (G2) - Imagem termográfica. (A) antes do início da FO-S. (B) após o término do primeiro ciclo de FO-S.....	71
Figura 5 -	Imagem de tomografia computadorizada do felino nº18 (G2).	73
Figura 6 -	Imagens de tomografia computadorizada de felinos com SAF.	76
Figura 7 -	Fotomicrografias representativas das reações de imuno-histoquímica nos SAF.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação entre os grupos de acordo com idade, peso, tempo de progressão e tamanho tumoral.....	63
Tabela 2 -	Distribuição dos animais segundo ausência e presença de recidiva tumoral, de acordo com o grupo.....	64
Tabela 3 -	Distribuição dos animais segundo ausência e presença de metástase pulmonar, de acordo com o grupo.....	64
Tabela 4 -	Sobrevida média, de acordo com os grupos G0, G1 e G2...	64
Tabela 5 -	Efeitos adversos classificados segundo VCOG- CTCAE/ 2011, observados nos 21 felinos com SAF durante o tratamento com FO-S.	67
Tabela 6 -	Efeitos adversos classificados segundo VCOG- CTCAE/ 2011, observados nos 10 felinos do G2, durante o primeiro ciclo de FO-S.....	67
Tabela 7 -	Temperaturas obtidas por câmera termográfica da região do SAF, de acordo com o grau histológico	68
Tabela 8 -	Temperaturas obtidas por câmera termográfica em 10 felinos do G2, antes do início da FO-S e após a última sessão do primeiro ciclo de FO-S.	70
Tabela 9 -	Distribuição dos animais segundo os parâmetros avaliados na tomografia, antes do início do tratamento com FO-S, de acordo com o grau histológico do SAF.	74
Tabela 10 -	Comparação entre as médias do tamanho dos tumores (comprimento, largura e profundidade, em cm) antes e depois do ciclo de FO-S, nos animais do G2.....	75
Tabela 11 -	Graduação tumoral de acordo com os grupos.....	77

Tabela 12 -	Expressão imuno-histoquímica de Ki-67 (% de células marcadas) de acordo com graduação tumoral.....	78
Tabela 13 -	Expressão imuno-histoquímica de caspase-3 (escore de 0 a 3) de acordo com graduação tumoral.....	79
Tabela 14 -	Descrição dos pacientes e seus respectivos dados clínicos.....	119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Graduação tumoral, de acordo com grau de diferenciação celular, necrose e índice mitótico.	32
Quadro 2 -	Terminologia para classificação dos efeitos adversos durante tratamento quimioterápico.....	54
Quadro 3 -	Determinação da quantidade de células marcadas por imuno-histoquímica para caspase-3.....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVO.....	24
3	JUSTIFICATIVA.....	26
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	28
4.1	Epidemiologia e Caracterização.....	28
4.2	Diagnóstico e estadiamento.....	31
4.2.1	Citologia de aspirado por agulha fina.....	31
4.2.2	Histopatologia.....	31
4.2.3	Imuno-histoquímica.....	33
4.2.4	Exames de imagem.....	36
4.2.5	Termografia.....	38
4.3	Tratamento.....	39
4.3.1	Cirúrgico.....	39
4.3.2	Radioterapia.....	41
4.3.3	Quimioterapia.....	42
4.4	Fosfolipídios Antineoplásicos.....	44
4.4.1	Fosfoetanolamina Sintética – FO-S.....	46
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
5.1	Delineamento amostral	49
5.2	Desenho do estudo.....	50
5.3	Imagens Termográficas	51
5.4	Tomografia Computadorizada.....	51
5.5	Tratamento	53
5.5.1	Cirurgia	53
5.5.2	Fosfoetanolamina Sintética	54
5.6	Histologia e Imuno-histoquímica.....	56
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
7	RESULTADOS	62
7.1	Avaliação Clínica	62
7.2	Efeitos Colaterais	66

7.3	Avaliação termográfica	68
7.4	Avaliação tomográfica	72
7.5	Avaliação histológica	77
7.6	Avaliação imuno-histoquímica	78
7.6.1	Ki-67	78
7.6.2	Caspase	79
8	DISCUSSÃO	82
9	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXOS	119

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Sarcoma de aplicação felino (SAF) são tumores mesenquimais que se desenvolvem após injeção de vacina e outros medicamentos. Suas primeiras descrições ocorreram há mais de duas décadas, quando pesquisadores americanos notaram aumento da incidência dos tumores cutâneos em felinos submetidos à vacinação contra raiva (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991).

Normalmente apresentam-se como nódulos firmes e aderidos, de crescimento rápido após um período de latência variável (LADLOW, 2013). Embora sua patogenia permaneça incerta, diversas evidências o correlacionam com o processo inflamatório crônico secundário a inoculação de vacinas, medicamentos, traumas constantes, fios de sutura e implantes de microchips, associado à predisposição genética do animal (HARTMANN et al, 2015).

Apesar do baixo índice de metástases, seu caráter maligno e localmente invasivo tornam os protocolos cirúrgicos e medicamentosos desafiadores. Devido à alta taxa de recidiva mesmo após cirurgia radical, alguns medicamentos vêm sendo estudados como terapia adjuvante na tentativa de controlar a doença e aumentar a sobrevida do animal.

Em 2016, a mídia brasileira expôs um composto químico que vinha sendo utilizado em humanos desde a década de 90 como tratamento para o câncer. Produzido pelo Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP), a Fosfoetanolamina Sintética, ou FO-S, foi distribuída informalmente como cápsulas de uso oral e utilizada por milhares de pessoas que procuravam a cura de suas doenças (PIVETTA, 2016). De acordo com os estudos, tratava-se de um fosfolípido antitumoral que atuava de maneira diferente dos quimioterápicos tradicionais, causando morte celular por modificação da membrana citoplasmática e não de seu DNA (FERREIRA et al, 2014). Testes laboratoriais pré-clínicos *in vitro*, e em animais de laboratório demonstraram resultados satisfatórios no tratamento de algumas neoplasias com a utilização dos fosfolípides antitumorais (FERREIRA et al, 2013a; MURRAY et al, 2015).

A partir de então, o Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e Instituto Nacional do Câncer (INCA- RJ) iniciaram ensaios clínicos com objetivo de avaliar os efeitos da FO-S em humanos com 10 tipos de tumores: cabeça e pescoço,

pulmão, mama, cólon e reto, colo uterino, próstata, melanoma, pâncreas, estômago e fígado. Ao final dos ensaios, a medicação se mostrou segura, com ausência de toxicidade, porém não teve sua eficácia comprovada clinicamente nas doses estudadas (A FOSFO, 2017).

No presente trabalho, buscou-se analisar os possíveis benefícios da terapia com FO-S associada ao procedimento cirúrgico nos felinos acometidos por sarcoma de aplicação, avaliando sua segurança e eficácia no combate ao tumor.

2. OBJETIVOS

Nitrini, A.G.C., 2019

2. OBJETIVOS

O objetivo primário deste trabalho é:

- avaliar o tempo médio de intervalo livre de doença e sobrevida nos animais com SAF que receberam o tratamento com Fosfoetanolamina Sintética (FO-S) associado a cirurgia

Os objetivos secundários são:

- determinar as características clínicas do paciente e de cada tumor
- determinar e comparar a intensidade de marcação imuno-histoquímica de Ki-67 e caspase-3 nos diferentes grupos
- capturar e analisar imagens infravermelhas e tomográficas dos tumores antes e depois do primeiro ciclo de FO-S
- associar estas variáveis com a evolução da doença e verificar sua importância nesta associação

3. JUSTIFICATIVA

Nitrini, A.G.C., 2019

3. JUSTIFICATIVA

Frente ao elevado índice de recidiva do SAF com as terapias convencionais, estudos clínicos que abordem novas modalidades terapêuticas adquirem grande importância, na busca por agentes que aumentem o intervalo livre de doença e a sobrevida ao animal.

Por apresentar resultados prévios satisfatórios em pesquisas pré-clínicas no tratamento de outros tumores, e por não existirem trabalhos utilizando FO-S em felinos até o momento, o presente estudo se justifica com o objetivo de avaliar seus efeitos sobre o sarcoma de aplicação.

4. REVISÃO DE LITERATURA

Nitrini, A.G.C., 2019

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Epidemiologia e caracterização

Sarcoma de aplicação felino (SAF), antigamente chamado de sarcoma vacinal, são tumores mesenquimais malignos que podem se desenvolver no local da injeção de vacinas e outros medicamentos (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991; WEIGAND & BREWER, 1996). Sua incidência global varia de 0,6 a 13 animais a cada 10.000 felinos, representando cerca de 6 a 12% de todos os tumores nesta espécie (BOWLT, 2015).

Apresentam-se como nódulos cutâneos ou subcutâneos firmes, ulcerados ou não, podendo ser únicos ou difusos. São localmente invasivos, inicialmente indolores, com margens mal definidas e acometem geralmente animais de meia idade, sendo menos frequente em gatos jovens (KASS et al, 1993; BOWLT, 2015). Embora possa ocorrer em diferentes espécies, os felinos são particularmente suscetíveis ao desenvolvimento da neoplasia, numa evolução que pode variar de três meses a dez anos após a inoculação do medicamento (KASS et al, 1993; HENDRICK et al, 1994; SÉGUIN, 2002; KASS et al, 2003).

Embora a patogenia não esteja completamente estabelecida, acredita-se que o processo inflamatório crônico causado pela injeção e/ou pelos agentes inoculados desencadeie a transformação neoplásica dos fibroblastos. Por volta de 1987, estudo realizado na Pensilvânia observou aumento de 61% na frequência de reações inflamatórias em amostras biopsiadas de locais com aplicação prévia de vacina em cães e gatos, como região interescapular, cervical e femoral. Coincidentemente, dois anos antes a legislação americana foi modificada, tornando obrigatória a imunização dos felinos com vacina contra raiva fabricada com vírus inativado com adjuvante, ao invés do atenuado (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991).

Os primeiros relatos de fibrossarcoma acometendo locais tradicionalmente utilizados na vacinação ocorreram em 1991, quando Hendrick e Goldschmidt

descreveram os tumores após a administração subcutânea da vacina da raiva, em zona interescapular dos felinos, principalmente quando mais de uma aplicação era realizada no mesmo local (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991). A partir de então, diversos relatos de ocorrência do SAF no restante dos Estados Unidos e na Europa despertaram a atenção de estudiosos no mundo todo.

Outras vacinas como leucemia felina (FeLV), rinotraqueíte, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e panleucopenia felina passaram a ser correlacionadas com o aparecimento destes tumores (SÉGUIN, 2002; GOBAR & KASS, 2002). Assim como antibióticos de longa duração, corticoides, anti-inflamatórios não esteroidais, insulina, quimioterápicos, além de fios de sutura não absorvíveis, microchips e traumas constantes na mesma região (HENDRICK et al, 1994; SÉGUIN, 2002; MARTANO et al, 2012). Dubielzig, em 1984, relatou o desenvolvimento de sarcomas em gatos após reações inflamatórias como o trauma ocular e uveíte crônica.

Os achados histológicos, caracterizados por grande quantidade de células inflamatórias, muitas vezes contendo alumínio em seu interior, ao redor de área necrótica central, colaboram com a possível etiologia inflamatória da doença (COUTO et al, 2002). O hidróxido de alumínio é amplamente utilizado como adjuvante com o objetivo de aumentar a antigenicidade de vacinas com vírus inativado, e sabe-se que ele persiste no local da injeção por cerca de um ano nos animais e até cinco anos nos humanos (GUILLARD et al, 2012). Embora o SAF possa ocorrer mesmo com o uso de vacinas sem adjuvante, estudos comprovam que a reação inflamatória local é maior e mais prolongada com uso de vacinas com adjuvante, principalmente o hidróxido de alumínio, quando comparada às sem adjuvante (ABDELMAGEED et al, 2018). Na Suíça, observou-se redução importante na incidência de fibrossarcoma felino após a introdução de vacina sem adjuvante contra o vírus da leucemia felina, a partir de 2007 (GRAF et al, 2018).

Outro fator associado ao desenvolvimento do SAF é a quantidade de injeções realizadas no mesmo local. Estudos epidemiológicos realizados entre 1991 e 1992 demonstraram que uma única vacinação no espaço interescapular aumentou em 50% a chance de desenvolvimento da neoplasia, subindo para 175%, após três ou quatro vacinações no mesmo local (KASS et al, 1993). A aplicação da vacina em temperatura gelada parece aumentar predisposição ao aparecimento do tumor

quando comparada a vacina em temperatura ambiente. Já as práticas como misturar vacinas diferentes em uma mesma seringa, reutilizar materiais de injeção, massagear o local da aplicação e marcas de vacina não são considerados fatores de risco ao aparecimento da neoplasia (KASS et al, 2003; LADLOW, 2013).

Assim como nos humanos, a obesidade é considerada fator predisponente ao desenvolvimento de tumores. O tecido adiposo, por meio da produção e liberação de citocinas, age como órgão, exercendo funções metabólicas e endócrinas importantes. São as chamadas *adipocinas*, que incluem leptina, adiponectina, fator de necrose tumoral (TNF-alfa), interleucina-6, proteínas de fase aguda, fatores hemodinâmicos e hemostáticos, neurotrofinas, entre outros. As adipocinas podem agir em diferentes órgãos levando a anormalidades endócrinas associadas a diversos distúrbios, como diabetes mellitus tipo 2, osteoartrite, hipertensão, doenças cardíacas coronarianas, desordens reprodutivas e certos tipos de câncer (GERMAN et al, 2010). A hipóxia tecidual gerada pela perfusão insuficiente do grande volume de adipócitos, associada a liberação de adipocinas pró-inflamatórias estimulam a neoangiogênese necessária ao ambiente peritumoral, propiciando o desenvolvimento e progressão do tumor (DIVELLA et al, 2016). O excesso de peso também está associado ao aumento dos níveis de insulina, que por si só pode estimular o crescimento neoplásico, além de promover a produção de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), envolvida na proliferação celular, na inibição da apoptose e no desenvolvimento de metástases (GERMAN et al, 2010).

Embora poucos estudos na veterinária abordem o papel da obesidade nos tumores, nos cães ela é associada ao maior risco de desenvolver mastocitoma, tumores mamários e carcinoma de células de transição (WEETH et al, 2007). Nos felinos, estudos apontam maior prevalência de SAF nos indivíduos com maior escore corporal (CARNEIRO, 2012).

4.2. Diagnóstico e estadiamento

O diagnóstico do SAF deve se basear inicialmente no exame físico associado ao histórico de injeções no local da lesão, seguidos pelos exames laboratoriais como hemograma, perfil hepático, perfil renal e urinálise. Embora nenhum estudo tenha apontado relação entre o sarcoma e a infecção pelos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV), recomenda-se a sorologia como avaliação complementar da saúde do animal (HARTMANN et al., 2015).

4.2.1. Citologia de aspirado por agulha fina

O exame citológico de aspirado por agulha fina, além de ser um exame de fácil execução e de baixo custo, permite sugerir a origem mesenquimal da neoplasia. Porém, o grau de inflamação e as áreas de necrose tumoral podem dificultar a interpretação da citologia em quase 50% dos casos. Além disso, o rápido crescimento da massa e a área de necrose central propiciam o acúmulo de líquido cístico, sem a presença de células importantes ao diagnóstico citológico (MARTANO et al, 2011).

4.2.2. Histopatologia

O diagnóstico definitivo é obtido pela análise histológica por biópsia incisional, sendo que o local biopsiado deve ser posteriormente removido durante o procedimento cirúrgico. Biópsias excisionais são contraindicadas já que aumentam o volume de tecido a ser excisado posteriormente, além de alterar planos teciduais e diminuir a taxa de sucesso na cirurgia curativa (MARTANO et al, 2011).

Histologicamente, os tumores têm origem mesenquimal, caracterizando-se principalmente como fibrossarcomas, embora osteossarcoma, rabdomyossarcoma, condrossarcoma, lipossarcoma e histiocitoma maligno também foram descritos (LADLOW, 2013). Caracterizam-se por hipercromatismo nuclear, mitoses atípicas, formas multinucleadas e anaplasia (HENDRICK et al, 1998). Apresentam

vascularização periférica abundante, inflamação predominantemente linfóide do tipo T e células gigantes multinucleadas. Observam-se ainda células miofibroblásticas, que quando ativadas pelo tumor, envolvem os nódulos tumorais e dificultam a penetração de linfócitos T e macrófagos, justificando a presença destas células na periferia tumoral (MADEWELL et al, 2001; COUTO et al, 2002). Os macrófagos frequentemente contêm um material identificado como alumínio e oxigênio, que são componentes dos adjuvantes de diversas vacinas contendo vírus inativados (HENDRICK et al, 1994).

A graduação tumoral é feita através de esquema adaptado dos sarcomas em cães, baseado em três critérios histológicos: diferenciação celular (1- bem diferenciado; 2- moderadamente diferenciado; 3- pouco diferenciado), presença e extensão da necrose (1- sem necrose; 2- necrose em menos de 50% da área total; 3- necrose acima de 50% da área total) e índice mitótico (média do número de mitoses em 10 campos de 400x; 1- 1 a 9 mitoses; 2- 10 a 19 mitoses; 3- 20 ou mais). A somatória das pontuações finais determina o grau histológico do sarcoma: pontuações 3 ou 4 caracterizam o grau I, pontuações 5 ou 6, o grau II e pontuações 7, 8 ou 9, o grau III (Quadro 1) (COUTO et al, 2002).

Quadro 1 – Graduação tumoral, de acordo com grau de diferenciação celular, necrose e índice mitótico.

Grau	Diferenciação celular	Necrose	Índice mitótico
1	Bem diferenciado	ausente	< 1
2	Moderadamente diferenciado	<50%	> 1 a 2 <
3	Pouco diferenciado	>50%	> 2

Fonte: Couto et al, 2002.

Quando comparado ao sarcoma não vacinal, o SAF apresenta maior grau de pleomorfismo celular, de atividade mitótica e de necrose (COUTO et al, 2002; LIPTAK & FORESTER, 2007). Além disso, apresenta maior grau histológico: normalmente 3 a 25% das neoplasias são grau 1, 20 a 50% são grau 2 e 25 a 75% são grau 3 (VAN NIMWEGEN & KIRPENSTEIJN, 2012).

4.2.3 Imuno-histoquímica

Diversos fatores de crescimento estão associados ao desenvolvimento do SAF. Em 1998, Hendrick e colaboradores observaram imunorreatividade para fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e seus receptores, além do fator de crescimento transformante- β (TGF- β). Em teoria, os linfócitos do SAF secretariam PDGF para recrutar macrófagos, e levariam a proliferação de fibroblastos que por sua vez, causariam a super expressão de c-jun, um proto-oncogene associado a proliferação celular e oncogenese *in vitro* (MCENTEE & PAGE, 2001).

Em 2002, Couto e colaboradores estudaram amostras de SAF e observaram expressão de α -actina, marcador de células de musculatura lisa de vasos e miofibroblastos, e vimentina, marcador de filamentos proteicos presentes em células mesenquimais. Citocinas FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e TGF- α (fator de crescimento transformante- α) foram detectadas na maioria de 50 amostras de SAF analisadas por imuno-histoquímica, estando envolvidas no processo de transformação maligna à medida que estimulam a divisão e migração de células endoteliais vasculares, além de ativarem a síntese do DNA de células mesenquimais (NIETO et al, 2003).

Mais de 80% dos SAF contém mutação do gene supressor de tumor p53, e em metade destas amostras, é detectado p53 no citoplasma celular. Estes pacientes apresentam significativa redução do tempo de recidiva local do tumor do que nos gatos com p53 nuclear. Trinta por cento dos tumores apresentam mutação do p53 e de seu regulador negativo, MDM2, sendo estes tumores histologicamente mais anaplásicos (HERSHEY et al, 2005).

Estudo com sarcomas de tecidos moles em felinos demonstrou imunorreatividade para C-Kit, gene que codifica o receptor de membrana do fator de crescimento tirosina quinase, em 26% dos animais acometidos, não havendo correlação com o grau histológico, com a sobrevida nem a etiologia do tumor (espontânea ou por aplicação) (SMITH et al, 2009). Em 2019, Carneiro e colaboradores encontraram resultados semelhantes ao analisarem 21 felinos com SAF, observando marcação do C-Kit em 23% dos tumores, inclusive em células endoteliais, podendo sugerir associação com proliferação e invasividade

(CARNEIRO et al, 2019).

Outra proteína bastante estudada nos tumores são as ciclooxigenases. Também chamadas de COX, estas enzimas existem em duas diferentes isoformas e tem a função de catalisar a transformação do ácido araquidônico nas prostaglandinas ativas (COX-1 e COX-2) e tromboxanos. Enquanto a COX-1 é expressa de maneira fisiológica em diversas células e está envolvida na proteção da mucosa gástrica, na regulação do fluxo sanguíneo renal e na agregação plaquetária, a COX-2 é responsável pela modulação da inflamação e carcinogênese. Acredita-se que a COX-2 pode estar relacionada a neoangiogênese, a invasão tumoral nos tecidos e na resistência a apoptose, sendo sua elevada expressão associada ao desenvolvimento e progressão tumoral (LIU et al, 2015).

Estudo conduzido em 21 felinos observou que 62% dos sarcomas expressaram COX-2, sugerindo uma potencial terapia alvo com os anti-inflamatórios seletivos (CARNEIRO et al, 2019). Em 2015, Queiroga e colaboradores observaram expressão imuno-histoquímica em 70% de 32 amostras de SAF, sendo mais evidente nos tumores de grau III (QUEIROGA et al, 2015). Magi e colaboradores (2010) também encontraram marcação em 97% dos tumores estudados embora sem correlação com o grau do tumor. Outra pesquisa, realizada em 117 amostras de SAF, observou correlação positiva entre a expressão imuno-histoquímica de COX-2 com o grau de inflamação peritumoral. Já com relação a diferenciação celular, a marcação de COX-2 nos tumores de grau 1 e 2 foi semelhante, enquanto que nos tumores de grau 3 ela foi significativamente menor, o que pode refletir a perda da capacidade de síntese desta substância nas células altamente anaplásicas (SANTELICES IGLESIAS et al, 2018).

Sabe-se que o elevado índice de proliferação celular é uma das características da malignidade tumoral. Ki-67 é uma proteína de localização intranuclear, expressa em todas as fases do ciclo celular, com exceção da fase de repouso. Durante a fase G1 e S, sua expressão é baixa, aumentando rapidamente na fase G2 até atingir o pico na mitose. Este padrão faz com que seja um ótimo marcador de proliferação celular, bastante utilizado no prognóstico de tumores de mama em humanos, assim como avaliação da resposta a terapia. Estudos apontam que marcação acima de 14% das células mamárias tumorais está associada a menor sobrevida e maior taxa de recidiva (CHEANG et al, 2009).

Achados semelhantes são relatados em felinos com neoplasia mamária, onde altos índices de Ki-67 estão associados a pior prognóstico. Em 2016, Soares e colaboradores correlacionaram índices de Ki-67 acima de 14% à tumores maiores, indiferenciados e com mais áreas necróticas, além de maior predisposição a metástases regionais e a distância. Outros autores também referiram pior prognóstico embora sem associação com o tipo histológico ou graduação do tumor (SILVA et al, 2017). Estudos comprovaram ainda maior marcação nas metástases que no tumor primário (34% versus 24%, respectivamente), confirmando o alto índice proliferativo da lesão metastática, fator importante na progressão do tumor de mama (DE CAMPOS et al, 2016).

Nos felinos, além dos carcinomas mamários, estudos mostraram correlação positiva entre elevada marcação de Ki-67 com pior prognóstico nos carcinomas de células escamosas em cavidade oral (BERGKVIST et al, 2011). Em 2018, estudo retrospectivo com 50 felinos portadores de tumores melanocíticos extra-oculares observou expressão média de Ki-67 em 28% das células, sendo que marcação acima de 20% estaria associada a pior prognóstico. Da mesma forma, índice mitótico acima de 5 se correlacionaria com menor sobrevida (SABATTINI et al, 2018).

Em 2014, Sysel e colaboradores avaliaram a expressão de Ki-67 em diversos tumores felinos, observando expressão imuno-histoquímica em 34% das células dos SAF, contra 16% das células dos sarcomas não vacinais. Ainda de acordo com o estudo, as neoplasias mais proliferativas foram o linfoma intestinal e o adenocarcinoma intestinal, com 71 e 49% de marcação, respectivamente (SYSEL et al, 2014).

Assim como a marcação da proliferação celular exerce papel importante na determinação do prognóstico de alguns tumores, a utilização de marcadores apoptóticos também é utilizada na caracterização do comportamento biológico das neoplasias. Também conhecida como morte celular programada, a apoptose é fundamental para manter a homeostase do tecido, remover células lesadas e garantir a reciclagem de componentes celulares. Além do controle da morte celular, ela também atua na inflamação, regeneração, diferenciação tecidual, desenvolvimento neural e pode estar associada a tumorigênese, através da liberação de fatores parácrinos, que promovem proliferação compensatória dos tecidos saudáveis ao redor do tumor, repovoamento tumoral e resistência a

radioterapia (SHALINI et al, 2015).

A apoptose ocorre através de dois mecanismos diferentes, porém correlacionados entre si: o extrínseco, através da ativação de receptores apoptóticos na superfície celular, como por exemplo o receptor de TNF- α , e o intrínseco, dependente da ativação das mitocôndrias e consequente liberação de citocromo C. Neste caso, o processo é desencadeado por citocinas ou em resposta à estímulo letal intracelular, como dano ao DNA, hipóxia, estresse oxidativo e drogas quimioterápicas. Ambos mecanismos levam à ativação das caspases (BURZ et al, 2009).

A família das enzimas *caspases* representa a principal via de regulação da apoptose, sendo expressa no citoplasma da maioria das células vivas, na sua forma inativa. Acredita-se que elas causem a apoptose degradando diversos substratos celulares considerados importantes na homeostasia celular. O desbalanço entre a proliferação e a morte celular pode contribuir para a carcinogênese e a progressão tumoral, justificando o aumento da caspase juntamente com o alto índice de proliferação, observado em muitos tumores malignos (BURZ et al, 2009). Estudo com neoplasias mamárias em cadelas observou marcação fortemente positiva em 65,7% das células, associada a mau prognóstico (TERZIAN et al, 2007). Marcação menos expressiva foi observada nas neoplasias mamárias em felinos, na média de 21,2% das células tumorais, não havendo correlação com o grau histológico (SILVA et al, 2017).

A marcação da caspase-3, considerada a mais prevalente nas células, também tem sido utilizada no acompanhamento de terapias anticancerígenas. A mensuração de sua atividade por ensaios de luminescência ou imuno-histoquímica serviria para determinar a habilidade da droga de interesse em induzir apoptose e combater o tumor revelando fácil aplicabilidade e alta sensibilidade (BURZ et al, 2009; PIEGOLS et al, 2018).

4.2.4. Exames de imagem

Radiografias de tórax e ultrassom abdominal são indicadas na pesquisa de metástases, comuns em 10 a 25% dos casos, sendo os locais mais acometidos os

pulmões, tecidos subcutâneos, fígado e linfonodos regionais (LADLOW, 2013). Por meio das imagens radiográficas da região tumoral pode-se ainda identificar áreas de lise ou proliferação óssea, sugerindo o comprometimento de costelas, vértebras ou escápula, por exemplo (LADLOW, 2013, BOLT, 2015).

Ressonância magnética (RM) ou Tomografia Computadorizada (TC) permitem estimar o tamanho do tumor e sua relação com os tecidos adjacentes, avaliando a invasão muscular e comprometimento ósseo. O tumor pode ainda ser classificado pelas características de realce após a administração intravenosa de meio de contraste (TRAVETTI et al, 2013). Tais avaliações são necessárias para o planejamento cirúrgico, visto que normalmente o volume do tumor determinado pela TC ou RM é maior que o notado pela palpação. Estudo realizado com 53 felinos com SAF revelou discrepância significativa entre a mensuração tumoral por palpação e da TC, sendo maior a diferença quanto maior for o tamanho do tumor (FERRARI et al, 2015).

Outra finalidade da TC e da RM no SAF é o acompanhamento da evolução após tratamento quimio ou radioterápico, frequentemente associados à cirurgia (TRAVETTI et al, 2013). Na medicina humana, o método de avaliação RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) é amplamente utilizado e baseia-se na mensuração unidimensional da lesão em seu maior diâmetro, por meio de imagens tomográficas ou ressonância magnética, em corte transversal. E a partir do acompanhamento das imagens durante o tratamento, o RECIST classifica a doença em quatro categorias: remissão completa (RC), remissão parcial (RP), doença estável (DE) e doença progressiva (DP). A RC caracteriza-se pelo desaparecimento completo da lesão; RP quando ocorre diminuição de pelo menos 30% do maior diâmetro da lesão; DE, quando os critérios não se enquadram nem em RC nem RP, e DP quando há o aparecimento de novos tumores e/ou o aumento do tamanho do tumor em pelo menos 20% (STACCHIOTTI et al, 2009).

Apesar de ser um método simples, de fácil aplicação e bastante utilizado, o RECIST pode não prever corretamente o prognóstico em determinados tumores. Tumores estromais gastrointestinais (GISTs), por exemplo, quando submetidos à quimioterapia com imatinib, podem não reduzir de tamanho, mas apresentam hipotenuação do parênquima na TC controle, associada a grande quantidade de necrose aos exames histopatológicos, comprovando boa resposta a terapia

instituída. Por este motivo, alguns autores sugeriram novos critérios de avaliação da resposta tumoral ao tratamento, que levasse em consideração não só o tamanho do tumor, mas também alterações na atenuação tumoral após a administração de contraste na TC, no chamado método CHOI, considerado mais preditivo da resposta de alguns tumores sólidos ao tratamento (STACCHIOTTI et al, 2009).

4.2.5. Termografia

Além da avaliação dos marcadores imuno-histoquímicos, outros fatores diagnósticos e prognósticos vêm sendo estudados no SAF como a termografia, também chamada de imagem termográfica (HERSHEY et al, 2000, HERSHEY et al, 2005; MARTANO et al, 2011). Trata-se de um método simples, não invasivo, seguro, que permite avaliar a temperatura da superfície corpórea por meio da mensuração da radiação infravermelha emitida pelo próprio corpo (TEPPER & GANNOT, 2015). O uso da termografia infravermelha para fins médicos foi iniciado por volta de 1950 na Alemanha, tendo se aperfeiçoado no final da década de 90, quando surgiram os sensores infravermelhos de alta sensibilidade (BERZ & SAUER, 2007). Câmeras infravermelhas modernas são dez vezes mais sensíveis que os dedos humanos em detectar variações de temperatura cutânea, de até 0,02°C (BRIOSCHI et al, 2003).

Seu uso na oncologia se baseia no fato de que os tumores geralmente possuem um aumento do fluxo sanguíneo e da angiogênese, além de um aumento na taxa metabólica, acarretando elevação da temperatura em relação aos tecidos normais circundantes. A detecção destes gradientes e pontos diferenciados pode representar um auxílio na identificação, graduação da malignidade tumoral e acompanhamento da evolução da doença (MIKULSKA, 2006; ARORA et al, 2008).

Para a realização do exame, a temperatura ambiente ideal deve ser de 22°C, sem variação durante a aferição. Preferencialmente, as salas devem ser equipadas com blindagens externas ou telas para que se evite a passagem de luz solar, utilizando-se luzes fluorescentes para a iluminação do ambiente (BRIOSCHI et al, 2003). A região a ser fotografada deve ser tricotomizada, devendo-se então aguardar 15 minutos antes da exposição ao termógrafo (LOUGHIN & MARINO, 2007).

A técnica foi inicialmente aplicada em humanos, no diagnóstico e acompanhamento de neoplasias mamárias. Estudo realizado em 60 mulheres com suspeita de doença mamária comparou as imagens termográficas, ultrassonográficas e resultado de biópsia, obtendo sensibilidade de até 75% na localização da lesão com a termografia. Quando considerada a assimetria das imagens da mama contralateral, tal sensibilidade chegou a 100% (ZADEH et al, 2015).

Na medicina veterinária, estudos também foram conduzidos em neoplasias mamárias. Pavelski e colaboradores compararam 20 cães com neoplasias mamárias com 30 saudáveis, e observaram que a temperatura na glândula acometida pela neoplasia era significativamente maior que nas glândulas normais, independentemente do tamanho do tumor (PAVELSKI et al, 2015). Em 2015, Melo e colaboradores observaram diferença significativa na temperatura de mastocitomas cutâneos em cães, apresentando-se mais quentes ou mais frios que os tecidos ao redor, embora tais variações não se correlacionassem com o grau histológico, com o estágio da doença ou sobrevida dos pacientes. Em estudo realizado em cinco felinos com fibrossarcoma, a termografia revelou temperaturas mais elevadas na zona tumoral, variando entre 41 a 43,6°C, enquanto que nas áreas periféricas da lesão a temperatura variou de 37,5 a 38,9°C (MOCANU et al, 2004).

De modo geral, embora altamente sensível, a avaliação termográfica apresenta baixa especificidade, já que não mostra habilidade em determinar a etiologia da afecção, apenas a alteração de temperatura local (REDAELLI et al, 2014).

4.3. Tratamento

4.3.1. Cirúrgico

Com altas taxas de recorrência local e baixa sobrevida, o tratamento do SAF é considerado desafiador. Excisão cirúrgica com margens laterais menores que três centímetros e apenas um plano em profundidade é considerada inadequada, observando-se comprometimento tumoral das margens em 46 a 75% dos casos, além de recidiva em mais de 70% dos casos (HENDRICK et al, 1994; KUNTZ et al,

1997; COUTO & MACY, 1998; HERSHEY et al, 2000).

Quando realizada com margens laterais de três a cinco centímetros além de dois planos teciduais em profundidade, muitas vezes incluindo ressecções de costela e processos espinhosos vertebrais, amputação de membro ou escapulectomia, o procedimento cirúrgico garante margens histologicamente limpas em 97% dos casos e redução da taxa de recidiva para até 14% (PHELPS et al, 2011).

O tempo médio de recidiva tumoral observado nos estudos é variável, já que muitos não especificam a localização e o tamanho tumoral, a largura e profundidade da ressecção cirúrgica, se a neoplasia era primária ou recidivante, além de não detalharem o método de avaliação das margens cirúrgicas nem o período de acompanhamento pós-operatório. De modo geral, este intervalo pode ser de apenas 3 meses após excisão cirúrgica incompleta, subindo para 21 meses nas excisões radicais (HERSHEY et al, 2000; MCENTEE & PAGE, 2001; SÉGUIN, 2002, PHELPS et al, 2011; MÜLLER & KESSLER, 2018), tendendo a ser maior quando a cirurgia é realizada em hospitais de referência e por equipe experiente, quando comparado a cirurgias sem a prática de conduta neste tipo de neoplasia (HERSHEY et al, 2000). A localização do tumor não parece ser fator predisponente a recidiva (OGILVIE & MOORE, 2001).

O controle de dor peri-operatório é de grande importância nos felinos submetidos a cirurgias extensas e deve ser realizado com abordagem analgésica multimodal e preemptiva, com início antes do procedimento cirúrgico com objetivo de minimizar a sensibilização central à dor. A combinação de diferentes classes de analgésicos como os opióides, anti-inflamatórios não esteroidais e anestésicos locais, através de drenos subcutâneos ou cateteres epidurais, reduz a dor e, consequentemente, as comorbidades no pós-operatório (DAVIS et al, 2007; ROBERTSON & LASCELLES, 2010). A colocação de sonda esofágica, além de ser um procedimento tecnicamente simples, permite a administração de analgésicos e antibióticos, assim como o aporte nutricional adequado favorecendo a recuperação do paciente (DAVIS et al, 2007). A ferida cirúrgica deve permanecer com bandagens e ser inspecionada e higienizada com frequência.

Entre as complicações mais comuns relatam-se dor, infecção, seroma e deiscência, ocorrendo principalmente nas cirurgias de longa duração (CANTATORE

et al, 2014; ZABIELSKA-KOCZYWAS et al, 2017). A longo prazo, pode-se observar perda da sensibilidade ou hiperalgesia no local operado e dor neuropática crônica, frequentemente associada a lambadura constante, feridas por autotraumatismo e alodinia (ROBERTSON & LASCELLES, 2010).

Embora a excisão cirúrgica seja considerada a primeira opção, a *Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task-Force* (VAFSTF), força-tarefa composta por diversas associações de especialistas norte-americanos, recomenda múltipla abordagem de combate, associando-se radio, quimio e/ou imunoterapia (MORRISON et al, 2001).

4.3.2. Radioterapia

A radiação realizada no pré-operatório tem maior efeito sobre as células tumorais, visto que o leito vascular e a oxigenação celular ainda não foram alterados pela cirurgia. Além disso, o procedimento permite reduzir o tamanho da formação, facilitando a excisão e diminuindo a chance de contaminação das margens por células neoplásicas. Entretanto, pode haver maior predisposição a deiscência da sutura, especialmente nos casos de ampla excisão (KOBAYASHI et al, 2002).

Embora alguns estudos relatem intervalo livre da doença maior com o uso da radioterapia neoadjuvante, podendo atingir 986 dias, a recidiva local chega a 42% nos pacientes submetidos à radiação prévia à cirurgia com amplas margens (KOBAYASHI et al, 2002; BOWLT, 2015).

Quando realizada no pós-operatório, a radioterapia tem maior efeito sobre a doença microscópica, devendo ser aplicada na cicatriz cirúrgica e três centímetros ao seu redor. Nos casos de deiscência e presença de ferida, seu início deve ser postergado até a total cicatrização. Observa-se aumento do intervalo livre da doença, podendo chegar a 1110 dias nos pacientes submetidos à cirurgia com amplas margens, embora a taxa de recidiva local permaneça alta, de aproximadamente 45% (CRONIN et al, 1998; ECKSTEIN et al, 2009).

Em 2019, Rossi e colaboradores avaliaram os efeitos da radioterapia curativa (48 ou 52Gy, diariamente, por até 16 sessões) e paliativa (36Gy, duas vezes por semana, por 6 sessões) em 59 felinos com margens cirúrgicas comprometidas por

células neoplásicas, observando que o intervalo livre de doença não se alterou de acordo com o protocolo (média de 233 e 395 dias, respectivamente), nos casos de tumores recidivantes. Da mesma forma, a taxa de recidiva foi de 34 e 38%, respectivamente. Já no caso dos tumores primários, houve aumento significativo do intervalo livre de doença com uso da radioterapia curativa (em média de 1430 dias).

Alguns efeitos colaterais da radioterapia incluem necrose de pele devido a exposição prolongada ou excessiva de radiação no local, além de fibrose, atrofia muscular, danos vasculares e neurológicos a longo prazo (ZABIELSKA-KOCZYWAS et al, 2017).

4.3.3. Quimioterapia

Outra opção terapêutica é a quimioterapia, indicada para tratamento dos sarcomas de alto grau, na doença metastática ou quando a cirurgia não pode ser realizada (HARTMANN et al, 2015). A droga citotóxica mais utilizada é a doxorrubicina, além da ifosfamida, carboplatina, ciclofosfamida, mitoxantrona e vincristina (DAVIS et al, 2007; ZABIELSKA-KOCZYWAS et al, 2017). Alguns estudos apontam aumento no intervalo livre da doença, de 78 dias para 399 dias em felinos com doença microscópica, e redução da taxa de metástase para 5,6% (POIRIER et al, 2002).

Já Martano e colaboradores, em 2005, estudaram 69 felinos submetidos à excisão cirúrgica radical, associada ou não a quimioterapia com doxorrubicina. No grupo submetido ao tratamento adjuvante, a taxa de recidiva foi de 40,8%, comparado a 35% no outro grupo, diferença estatisticamente insignificante, colaborando com outros autores que questionam a eficácia do tratamento quimioterápico complementar.

Do mesmo modo, em 25 felinos submetidos a cirurgia e radioterapia, o acréscimo de quimioterapia com doxorrubicina não alterou o tempo de sobrevida dos pacientes (BREGAZZI et al, 2001). Já a associação de quimioterapia neoadjuvante com adjuvante em 21 felinos demonstrou redução da taxa de recidiva local para 14%. Os autores não descrevem o tempo médio de sobrevida já que a maioria dos pacientes permanecia vivo até o momento de conclusão do trabalho (BRAY &

POLTON, 2014).

Como efeitos adversos da administração da doxorrubicina citam-se baixa biodistribuição plasmática da droga, levando a baixa concentração no tumor, além de anemia, mielossupressão e nefrotoxicidade, contraindicando seu uso nos pacientes nefropatas, com desordens sanguíneas ou de medula óssea (POIRIER et al, 2002).

De modo geral, a associação de cirurgia ampla e radioterapia, com ou sem quimioterapia, aumentou o tempo de intervalo livre da doença, de 398 dias para 810 dias e a sobrevida de 520 dias para 1290 dias, enquanto que a taxa de recidiva local foi de 41 a 45% e o índice de metástases, de 12 a 21% dos pacientes estudados (CRONIN et al, 1998; KOBAYASHI et al, 2002; ECKSTEIN et al, 2009).

Eletroquimioterapia com bleomicina pode atuar como tratamento adjuvante, aumentando o intervalo livre da doença para 570 dias. Mesmo em situações de recidiva, novas aplicações resultam em resposta favorável por seis meses ou mais (SPUGNINI et al, 2007).

A utilização de bloqueadores de receptores tirosina-quinase, como o mesilato de imatinib, foi testada com resultados promissores em cultura de células de SAF, inibindo os receptores de PDGF e a proliferação celular, e sensibilizando as células tumorais a doxorrubicina e carboplatina, porém mais estudos são necessários para avaliação de sua eficácia *in vivo* (KATAYAMA et al, 2004). Da mesma forma, masitinib também mostrou resultados satisfatórios *in vitro*, com efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos dose-dependentes (LAWRENCE et al, 2011). Já estudo com fosfato de toceranib, revelou ausência de marcação imuno-histoquímica do receptor Kit, não havendo resposta clínica em 18 felinos com SAF não operáveis (HOLTERMANN et al, 2017).

Imunoterapia adjuvante demonstrou resultados satisfatórios em pesquisas com SAF. Foi utilizada interleucina-2 felina expressa por vírus canarypox recombinante, uma potente citocina estimulante de células T, associada à cirurgia e radioterapia, em 48 felinos com sarcoma de aplicação, observando boa tolerância a medicação e aumento significativo do intervalo livre da doença, com média acima de 730 dias (JAS et al, 2015).

4.4. Fosfolipídios Antineoplásicos

Os fosfolipídios antineoplásicos (AFTs) são considerados uma diferente classe de agentes antitumorais que não apresentam como alvo o DNA, mas atuam modificando o *turnover* na membrana celular, induzindo morte por apoptose com alta seletividade para as células tumorais (RÍOS-MARCO et al, 2011). Edelfosina, miltefosina, perifosina, erucilfosfocolina, erufosina e fosfatidiletanolamina são representantes desta classe de agentes antitumorais estruturalmente relacionados, essencialmente constituídos por uma longa cadeia de hidrocarbonetos apolares (VAN BLITTERSWIJK & VERHEIJ, 2013).

Fosfatidiletanolamina é o lipídeo mais abundante na camada citoplasmática da membrana celular animal, estando envolvido com diversos processos celulares como ciclo celular, fusão de membranas, autofagia, fagocitose, apoptose, metabolismo mitocondrial, síntese de acetilcolina, síntese hormonal e função cognitiva (VAN BLITTERSWIJK & VERHEIJ, 2013).

Seu precursor, a *fosfoetanolamina* (FO) foi isolada em 1936 por Outhouse em tumores malignos bovinos, fornecendo a primeira comprovação da existência deste composto no estado livre na natureza (OUTHOUSE, 1936). Após seus trabalhos, outros pesquisadores encontraram a FO em intestinos de ratos saudáveis e em tecidos cerebrais de bovinos (AWAPARA et al, 1950; FOLSCH et al, 1959). Por estarem presentes em tecidos orgânicos, surgiu um especial interesse científico nos compostos fosforilados, com objetivo de se elucidar os diferentes comportamentos químicos das fosfoproteínas (FOLSCH et al, 1959).

O mecanismo de ação dos AFTs difere dos quimioterápicos clássicos, tendo como alvo a membrana celular, ao invés do DNA. Sua estrutura química permite que se insiram facilmente na bicamada lipídica da membrana (VAN BLITTERSWIJK & VERHEIJ, 2013). Quando inseridos, os AFTs desencadeiam uma série de efeitos antitumorais, incluindo rompimento dos *rafts* lipídicos, presentes em maior concentração nas membranas das células tumorais do que nas normais, causando alteração na concentração de colesterol intracitoplasmático e estimulando receptores pró-apoptóticos. Em alguns tipos celulares, os AFTs desencadeiam a produção de radicais livres e alteram o potencial de membrana das mitocôndrias, facilitando a

liberação de citocromo C, ativador da via intrínseca da apoptose, promovendo morte celular (RÍOS-MARCO et al, 2011; MURRAY et al, 2015).

Inibem ainda a enzima CPT: fosfocolina-citidiltransferase, responsável pela síntese de fosfatidilcolina, substância essencial para a manutenção da membrana plasmática e consequentemente, para a sobrevivência celular (SPRONG et al, 2001; GIBELLINI & SMITH, 2010; HUANG et al, 2011). A produção deficitária da fosfatidilcolina leva ainda ao estresse do retículo endoplasmático, ativando fatores pró-apoptóticos da família Bcl-2, como Bax e Bad (MURRAY et al, 2015).

Induz ainda a ativação de enzimas quinase-inibitória, promovendo parada do ciclo celular na fase G2/M, além de inibir enzimas como ERK e PI3K, algumas responsáveis pela proliferação celular (MURRAY et al, 2015). Tendo propriedades de detergente, eles mesmos podem causar a lise das células, quando em concentrações elevadas (VAN BLITTERSWIJK & VERHEIJ, 2008; VAN BLITTERSWIJK & VERHEIJ, 2013).

Na prática clínica, a principal aplicação da edelfosina, fosfolípídio disponível comercialmente, é no tratamento de leucemias agudas, tanto mieloides quanto linfóides, nas quais sua utilização provoca apoptose das células leucêmicas (VOGLER et al, 1996; MOLLINEDO et al, 2010).

Miltefosina tópica a 6% demonstrou resultados satisfatórios no tratamento de metástases cutâneas de neoplasia mamária e linfomas cutâneos em humanos, observando-se 18% de remissão completa, 25% de remissão parcial e 36% de estabilização da doença (DUMMER et al, 1993; TERWOGT et al, 1999).

Os resultados obtidos com a utilização de perifosina oral em pacientes com carcinoma colorretal metastático mostraram-se promissores, com aumento de sobrevida e maior tempo de progressão da doença, quando associados à quimioterapia convencional (BENDELL et al, 2011). Outro estudo, com pacientes portadores de tumores sólidos em estágio avançado, demonstrou resposta parcial e poucos efeitos colaterais, principalmente gastroentéricos, enquanto que supressão medular foi raramente reportada (VAN UMMERSEN et al, 2004).

4.4.1. Fosfoetanolamina Sintética - FO-S

Na década de 90, foi desenvolvida pelo Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo a forma sintética da fosfoetanolamina (*Fosfoetanolamina Sintética* - FO-S), sendo o composto aplicado em diversos estudos envolvendo neoplasias em culturas celulares e animais de laboratório. Corresponde a uma estrutura química simples formada por um grupo fosfato e uma amina terminal. Como um fosfomonoéster, os átomos de hidrogênio são ionizáveis em solução aquosa (AL-ASFOUR, 2008) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura química da fosfoetanolamina sintética

Fonte: NETTO (2018).

Embora o mecanismo antitumoral da FO-S não esteja completamente esclarecido, estudos demonstram alto grau de citotoxicidade contra uma ampla variedade de células neoplásicas resistentes a drogas quimioterápicas (FERREIRA et al, 2012b; FERREIRA et al, 2013a).

Em 2011, Ferreira e colaboradores avaliaram os efeitos da FO-S em camundongos portadores de melanoma e revelaram redução do volume tumoral significativamente maior quando comparado ao tratamento com agente quimioterápico paclitaxel. O grupo tratado com FO-S apresentou maior sobrevida e menor incidência de metástase, além de ausência de efeitos sobre as células saudáveis como fibroblastos. A análise de citometria de fluxo observou inibição da proliferação celular com parada das células na fase G2/M do ciclo celular, redução da capacidade de síntese de DNA e ativação da via caspase-3, moduladora do processo de apoptose celular (MENEGUELO, 2007; FERREIRA et al, 2011, FERREIRA et al, 2012a).

O mesmo efeito apoptótico foi observado *in vitro*, em células de mesotelioma pleural, melanoma e carcinoma mamário humanos, além de carcinoma renal em

Nitrini, A.G.C., 2019

ratos, sem afetar a capacidade proliferativa de células normais (FERREIRA et al, 2013a; FERREIRA et al, 2013b; KAKU et al, 2014).

Estudo com camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich tratados com FO-S demonstrou melhora clínica dos sintomas, sem efeitos colaterais significativos (FERREIRA et al, 2012b).

Embora bem tolerado, relata-se toxicidade gastrointestinal e potencial hemolítico dos fosfolípides antitumorais. Outros efeitos relatados incluem febre, mialgia, artrite e dor, em efeitos dose dependentes (MURRAY et al, 2015). Estes efeitos parecem ser minimizados com o uso da nanoterapia, utilizando-se FO-S encapsulada em lipossomas catiônicos, como o cloreto de dioctadecildimetilamonio (DODAC). Estudos em células de melanoma e carcinoma hepatocelular de ratos sugerem ainda, maior seletividade do composto às células tumorais quando utilizada esta tecnologia (LUNA et al, 2016).

Em humanos os resultados *in vivo* não foram tão favoráveis quanto os obtidos *in vitro* e em testes com camundongos. Em 2016, estudo clínico com voluntários saudáveis revelou ausência de toxicidade, após a administração oral de FO-S em diferentes dosagens. A fase 2 do ensaio incluiu 72 pacientes com diferentes tipos de tumor, sendo que apenas um deles, com melanoma, apresentou uma resposta parcial. Do restante, 69,7% tiveram piora e 28,8% permaneceram estáveis. Entre os 21 portadores de câncer colorretal, o tipo em que foi possível reunir um maior número de voluntários, nenhum teve a resposta esperada conforme padrões internacionais: uma redução de pelo menos 30% das lesões tumorais, sendo a pesquisa interrompida (A FOSFO, 2017; NETTO, 2018).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Nitrini, A.G.C., 2019

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Delineamento amostral

Foram incluídos na pesquisa felinos de ambos os sexos, qualquer idade ou raça, que apresentassem formações neoplásicas em locais habitualmente utilizados para injeções, atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Departamento de Cirurgia - Hospital Veterinário - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, entre julho de 2015 e julho de 2018. Todos os tutores concordaram com a participação no estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, protocolo nº 2940110715/2015.

Inicialmente, os animais foram submetidos ao exame clínico com anamnese e exame físico. As formações foram medidas por paquímetro manual, em três sentidos: comprimento, caracterizado pela maior medida obtida no eixo craniocaudal, largura, a maior medida obtida no eixo látero-lateral e profundidade, maior medida obtida no eixo dorsoventral, perpendicular ao plano abaixo do tumor.

Em seguida, as formações foram submetidas à análise termográfica, conforme delineamento descrito a seguir. A colheita de material para citologia foi feita somente após a realização da termografia, a fim de se evitar interferência da manipulação e punção do tumor nas imagens termográficas.

Os animais cujo diagnóstico clínico e/ou citológico foi sugestivo de sarcoma realizaram exames de radiografia de tórax, exames laboratoriais de hemograma e bioquímica, tais como perfil renal, perfil hepático, dosagem de colesterol e triglicérides séricos, e avaliação cardiológica pré-anestésica, composta por eletrocardiograma e, quando indicado, ecocardiograma. Não havendo contraindicação anestésica, os animais foram então encaminhados para a realização de tomografia computadorizada.

5.2. Desenho do estudo

Após realização dos exames laboratoriais e de imagem, os animais foram alocados de forma aleatória em dois grupos:

Grupo 1 (G1) - Os animais foram submetidos ao tratamento cirúrgico, seguindo as técnicas já estabelecidas em literatura. No pós-operatório imediato passaram a receber tratamento adjuvante com FO-S, em aplicações endovenosas semanais, na dose de 70mg/kg (FERREIRA et al, 2012a; FERREIRA et al, 2012b), diluída em 20ml de solução fisiológica a 0,9% estéril, numa taxa de infusão de aproximadamente 3ml/kg/hora. O ciclo de tratamento foi de 4 semanas. Antes de cada aplicação, novos exames laboratoriais de hemograma completo, perfil hepático, perfil renal, dosagem de triglicérides e colesterol foram realizados.

Grupo 2 (G2) - Os animais foram submetidos primeiramente ao tratamento com FO-S, na mesma dose e intervalo aplicados ao G1. Antes de cada aplicação, novas imagens termográficas foram realizadas na área tumoral, juntamente com os exames laboratoriais de hemograma completo, perfil hepático, perfil renal, dosagem de triglicérides e colesterol. Após o término das quatro sessões, os animais foram novamente submetidos ao exame de tomografia computadorizada e análise termográfica da região tumoral, e então encaminhados ao procedimento cirúrgico. Um novo ciclo de 4 sessões semanais de FO-S se iniciou no pós-operatório imediato.

Como grupo controle (*G0*) foram analisados retrospectivamente os prontuários de felinos portadores de sarcoma de aplicação, atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Departamento de Cirurgia - Hospital Veterinário - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, entre janeiro de 2005 e junho de 2016, submetidos a cirurgia com excisão em bloco, com margens laterais de 3 a 5 cm e dois planos em profundidade, com ausência de metástases pulmonares e que não receberam nenhum tratamento quimioterápico complementar. Além das características clínicas destes pacientes, foram avaliados dados como tamanho da formação, tempo de progressão do tumor, análise histopatológica,

presença de recidiva, além do tempo de intervalo livre de doença local e de sobrevida após cirurgia.

5.3. Imagens Termográficas

Para a obtenção das imagens termográficas foi utilizada a câmera FLIR T650sc¹ (câmera termográfica WI-FI com resolução de 307,000 pixels, sensibilidade de 30mK). Foram realizadas imagens da formação no momento do diagnóstico, e ao longo do tratamento no G2, antes de cada aplicação, nas diferentes fases do tratamento. Para efeito de comparação, utilizou-se as imagens no momento do diagnóstico e imediatamente antes do preparo para a cirurgia.

Tricotomia ampla foi realizada 15 minutos antes da realização das imagens infravermelhas, permanecendo o animal sobre a mesa de aço inox, em ambiente fechado, com temperatura controlada de 22°C e sem fluxo de ar. As imagens termográficas foram obtidas com a câmera a uma distância aproximada de 50 cm da superfície da pele, formando ângulo de 90 graus entre o operador e o paciente. Nenhum gato foi sedado ou anestesiado previamente, evitando-se a interferência dos fármacos na perda de calor pela pele.

As imagens obtidas foram posteriormente analisadas por meio de programa de computador Flir Tools Ink^{®2}, com mensuração dos seguintes parâmetros:

- TA – “tumoral area” - Área circular, abrangendo a porção central da neoplasia
- nTA – “non tumoral area” - Área circular, do mesmo diâmetro de TA, distante pelo menos 3 cm do bordo da neoplasia

5.4. Tomografia computadorizada

A região acometida foi avaliada por exame de tomografia computadorizada, para determinação da extensão da lesão, permanecendo o animal em decúbito esternal durante a aquisição das imagens. O protocolo anestésico foi estabelecido pelo Serviço de Anestesiologia do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP,

¹ Câmera FLIR T650sc – FLIR Systems

² Flir Tools Software – FLIR Systems

constando de pré-medicação com acepromazina (0,02mg/kg, SC) e metadona (0,3 mg/kg SC), indução com propofol (5mg/kg, IV) e manutenção com isoflurano e oxigênio.

Utilizou-se tomógrafo helicoidal de 16 canais Philips³. O ajuste da técnica foi definido conforme o pré-estabelecido para a região estudada, sendo preconizado 120 kV, 240 mA e cortes transversais de 2mm de espessura com incremento de 1mm. Após a primeira aquisição de imagens, administrou-se o meio de contraste iodado não iônico hidrossolúvel Iohexol⁴, na dose de 1,5 ml/kg por via intravenosa, realizando-se nova aquisição de imagens mantendo os mesmos parâmetros da imagem pré-contraste.

Foram avaliados os seguintes parâmetros pré e pós-contraste: dimensões (comprimento - maior medida obtida no eixo craniocaudal; largura - maior medida obtida no eixo látero-lateral; profundidade - maior medida obtida no eixo dorsoventral), aspecto das margens tumorais (indefinidas ou definidas), atenuação do parênquima tumoral (homogênea ou heterogênea), borramento de gordura adjacente, presença de áreas cavitárias e mineralização, envolvimento de musculatura e ossos adjacentes, linfonodomegalia regional, além da vascularização periférica.

Ao término dos exames, os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Animais acometidos por metástases pulmonares
- Animais acometidos por comorbidades que contraindicassem o procedimento anestésico e/ou cirúrgico
- Formações inoperáveis, segundo avaliação clínica e tomográfica
- Animais submetidos a tratamento quimioterápico prévio
- Animais cujos tutores não autorizassem sua inclusão no estudo

³ Philips® - Mx 8000 IDT

⁴ Omnipaque® - GE Healthcare, Shanghai, China.

5.5. Tratamento

5.5.1. Cirurgia

Para realização da cirurgia, os felinos foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico previamente utilizado na realização da tomografia. Após preparo da região, a excisão do tumor foi feita em bloco, com auxílio de eletrocautério, com margens laterais de 3 a 5 cm e dois planos de profundidade. O defeito cirúrgico foi corrigido por aposição direta dos tecidos vizinhos usando *flaps* musculares ou com uso de malhas de polipropileno, quando os *flaps* não puderam ser usados. A hemostasia de grandes vasos, assim como a sutura de planos musculares, subcutâneos e pele foi realizada com fio de náilon 4-0, em padrão simples separado.

Em 16 animais, foi mantida sonda flexível (uretral nº4) no subcutâneo do leito cirúrgico, para analgesia no pós-operatório através de infusão de anestésico local bupivacaína (0,5mg/kg, a cada 8hs por 2 dias, em média). Em oito animais foi mantida sonda esofágica por 7 dias, em média, para facilitar manejo medicamentoso e dietético no pós-operatório.

Após procedimento cirúrgico, todos os animais receberam antibioticoterapia sistêmica (amoxicilina + ácido clavulânico, 20mg/kg, via oral, 12-12hs, por 7 a 10 dias) e analgesia (dipirona, 12mg/kg, via oral, 12-12hs por 5 a 7 dias; cloridrato de tramadol, 2 mg/kg, via oral, 12-12hs, por 5 a 7 dias; meloxicam, 0,1mg/kg, via oral, 24-24hs, por 2 a 3 dias). A área operada foi mantida com bandagem, trocada no mínimo a cada 4 dias, utilizando-se no local sabão de clorexidina a 1%⁵, creme cicatrizante a base de clostebol e neomicina⁶ ou spray de tartarato de ketanserina e asiaticosídeo⁷. Os pontos de sutura da pele foram removidos com 30 dias de pós-operatório.

Ao término da cirurgia, a amostra tumoral foi encaminhada para realização de exames histopatológicos e imuno-histoquímicos, especificados a seguir.

⁵ Sept Clean® - Agener

⁶ Trofodermim® - Pfizer

⁷ Regepil® - Ourofino

5.5.2. Fosfoetanolamina Sintética

A Fosfoetanolamina Sintética (FO-S) utilizada neste projeto foi preparada pelo Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP), com grau de pureza de 99%, confirmada por cromatografia de alta performance (HPLC). Após dissolução, foi armazenada em geladeira a 5°C durante o experimento. O tratamento seguiu conforme o delineamento acima especificado.

Para análise de segurança da quimioterapia, os animais foram submetidos aos critérios de avaliação de toxicidade comum para felinos do *Veterinary Co-operative Oncology Group (Common Terminology Criteria for Adverse Events – VCOG-CTCAE/ 2011)*, que utiliza escala com 5 graus, de acordo com a severidade dos sinais apresentados, sendo grau 1 o mais brando e 5 o mais severo, segundo cada parâmetro (Quadro 2).

Quadro 2 - Terminologia para classificação dos efeitos adversos durante tratamento quimioterápico.

Efeito Adverso	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5
Anemia (hematócrito)	25 a 30%	20 a 25%	20 a 15%	<15%	óbito
Neutropenia	1500 a 3000/ μ L	1000 - 1499/ μ L	500 - 999/ μ L	< 500/ μ L	óbito
Trombocitopenia	100.000 a 200.000/ uL	50.000 a 99.000/uL	25.000 a 49.000/uL	25.000/uL	óbito
Toxicidade hepática (ALT)	Aumento 1,25x do valor normal	Aumento de 1,25 a 1,5x do valor normal	Aumento de 1,5 a 2x do valor normal	Aumento > 2x do valor normal	óbito
Toxicidade renal (Creatinina)	Aumento 1,5x do valor normal de	Aumento de 1,5 a 2x do valor normal	Aumento de 2 a 3x do valor normal	Aumento >3 do valor normal	óbito
Anorexia	Alteração da dieta para manter apetite	Diminuição da ingestão de alimento (< 3 dias) sem perda de peso, indicado o uso de estimulantes de apetite	Diminuição da ingestão de alimento por 3 a 5 dias de duração, com perda de peso. Necessidade de nutrição enteral por sonda e fluidoterapia.	Duração mais que 5 dias, consequências potencialmente fatais, indicado o uso de nutrição parenteral	óbito
Emese	< 3 episódios em 24hs. Tratamento médico não necessário	3-5 episódios em 24 horas ou 3 episódios por dia, por mais que 3 dias, indicado tratamento suporte	Mais que 5 episódios em 24hs indicada a hospitalização	Consequências potencialmente fatais (colapso hemodinâmico)	óbito

Diarreia	Mais que 2 episódios e diminuição da consistência	De 3 a 6 episódios, indicado uso de fluidoterapia IV ou SC	Mais que 6 episódios, incontinência, indicada a hospitalização	Consequências potencialmente fatais (colapso hemodinâmico)	óbito
Constipação	Ocasional ou intermitente.	Persistente, indicado laxante ou enema.	Sintomas interferem nas atividades diárias. Necessária remoção manual das fezes.	Consequências potencialmente fatais (megacólon, obstrução, etc)	óbito
Cistite (hematúria, polaquiúria)	Assintomática, hematúria microscópica	Polaciúria com disúria, hematúria macroscópica, esporádica.	Necessário uso de analgésicos e antiespasmódicos. Pode ser indicada transfusão de sangue.	Intenso sangramento, pode até ser indicado procedimento cirúrgico	óbito
Letargia	Letargia leve, mas capaz de interagir	Letargia moderada, alguma dificuldade nas atividades diárias	Dificuldade de deambulação, severo comprometimento das atividades diárias.	Incapaz de se locomover	óbito

Fonte: VCOG- CTCAE, 2011.

Avaliou-se os efeitos da medicação sobre o hemograma, perfil hepático, perfil renal, triglicérides e colesterol, alterações gastrointestinais como anorexia, emese, diarreia ou constipação, alterações urinárias, como disúria ou hematúria e comportamentais, como letargia ou excitação.

O acompanhamento clínico se deu por avaliações semanais no primeiro mês, seguido por avaliações semestrais, durante 18 meses. A cada retorno semestral foram realizados exames de sangue e radiografias de tórax buscando detectar metástases pulmonares. Em casos de recidiva da formação, novos exames de citologia de aspirado por agulha fina foram realizados a fim de se confirmar a recorrência da neoplasia.

Buscou-se determinar o intervalo livre de doença e o tempo de sobrevida dos animais incluídos no estudo. O intervalo livre de doença foi definido como o tempo entre o procedimento cirúrgico e a recorrência local, e foi calculada apenas naqueles pacientes que efetivamente apresentam recorrência. O tempo de sobrevida foi definido como o tempo entre o procedimento cirúrgico e o óbito.

5.6. Histologia e imuno-histoquímica

Após a excisão cirúrgica, as formações foram conservadas em formol a 10% e encaminhadas para análise histopatológica para graduação da neoplasia e avaliação das margens cirúrgicas. Cortes histológicos de 5 μ m, obtidos em lâminas silanizadas⁸, foram submetidos ao procedimento imuno-histoquímico para determinação do subtipo histológico do tumor mesenquimal (sarcoma) observado em cada paciente, assim como para a determinação do índice de proliferação celular (marcação de Ki-67) e grau de apoptose (marcação de caspase-3). Os cortes histológicos foram desparafinizados, hidratados e submetidos ao desmascaramento antigênico em proteinase K, tampão citrato (pH 6,0) ou EDTA (pH 9,0), em banho-maria ou panela de pressão, por 10 a 60 minutos. Posteriormente, as lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de H₂O₂ (10 volumes), a 37°C, por 30 minutos, protegidas da luz. Após lavagens em água corrente, água destilada e em tampão de lavagem (TTBS), foi realizado o bloqueio de proteínas em solução de leite desnatado 5% Molico^{®9}, durante 30 minutos à 37°C; em seguida as lâminas foram novamente lavadas em TTBS (3 lavagens, 3x) e submetidas ao bloqueio em Protein Block (Novocastra Leica Biosystems)¹⁰, durante 10 minutos em estufa a 25°C. Após lavagens em TTBS (3x), as lâminas foram incubadas, em câmara úmida escura pelo período de 16 horas e à 4°C, com os seguintes anticorpos primários: Ki-67 (Dako¹¹, 1:800), alfa-actina de músculo liso (Sigma, 1:10000), GFAP (Leica, 1:500), Enolase (Dako, 1:2000), S-100 (Dako, 1:3000), Desmina (Dako, 1:200), Vimentina (Dako, 1:5000), CD204 (CosmoBio¹², 1:1000), PNL-2 (Santa Cruz Biotechnology¹³, 1:100), CD31 (Dako, 1:100), Caspase-3 ativada (Cell Signaling¹⁴, 1:500), CD3 (Leica, 1:1000) e CD20 (Thermo Fischer¹⁵, 1:100). Após incubação, as lâminas foram lavadas em TTBS (3x) e incubadas com o reagente pós-primário (Novocastra Leica Biosystems), por 30 minutos em temperatura de 20 a 25°C. Após lavagem em TTBS (3x), o polímero Novolink™ Max Polymer Detection System (Novocastra Leica Biosystems) foi aplicado por 30

⁸ Starfrost® - SPlab - São Paulo, SP, Brasil

⁹ Molico® Desnatado – Nestlé - São Paulo, SP, Brasil

¹⁰ Novocastra - Leica Biosystems – São Paulo, SP, Brasil

¹¹ Dako – Aligent, Santa Clara, CA, EUA

¹² CosmoBio International – Tokio, Japan

¹³ Santa Cruz Biotechnology - Dalas, TX, EUA.

¹⁴ Cell Signaling Technology – San Diego, CA, EUA

¹⁵ Thermo Fischer -Newton Drive, Carlsbad, EUA

minutos em temperatura de 20 a 25°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em TTBS (3x) e reveladas pelo cromógeno tetracloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB, Novocastra, Leica Biosystems) por 5 minutos e em temperatura ambiente. Após lavagens em água corrente e destilada, as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris (Merck), lavadas em água corrente e destilada e realizados 2 banhos rápidos em água amoniacal (0,5%). Por fim, as lâminas foram submetidas à bateria de desidratação e diafanização. Para montagem, utilizou-se lamínulas e a resina *Permount* (ThermoFischer).

Todas as reações foram acompanhadas de tecidos para o controle positivo de cada anticorpo. O controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário da reação e substituição pelo diluente.

Os subtipos tumorais foram determinados pela avaliação da positividade dos marcadores alfa-actina de músculo liso, GFAP, Enolase, S-100, Desmina, Vimentina, CD204, PNL-2, CD31, CD3 e CD20 nas células tumorais (RAMOS-VARA & BORST, 2016).

Para determinação do índice de proliferação celular, os cortes histológicos submetidos à reação imuno-histoquímica para Ki-67 foram utilizados para a determinação da porcentagem de núcleos positivos, em um total de 1000 células tumorais. A quantificação foi realizada nas regiões com maior visualização de células positivas (*hotspots*), com o auxílio do sistema computadorizado de imagens Image-ProPlus, versão 4.5 (Media Cybernetics Inc¹⁶). As imagens foram obtidas em aumento de 400x (objetiva de 40x), pela câmera ICC50W (Leica Microsystems), acoplada ao microscópio DM750 (Leica Microsystems).

Para determinação do grau de apoptose, os tumores foram avaliados de acordo com o percentual de células marcadas para caspase-3 ativada. Foi adotada a seguinte classificação semi quantitativa: score 0 ou negativo (ausência de marcação), score 1 ou discreto (marcação em até 25% das células tumorais), score 2 ou moderado (marcação em 25 a 75% das células tumorais) e score 3 ou intenso (marcação em mais de 75% das células tumorais) (DOLKA et al., 2016). (Quadro 3).

¹⁶ Image Pro Plus - Rockville, MD, USA

Quadro 3 - Determinação da quantidade de células marcadas por imuno-histoquímica para caspase-3.

Score	Marcação	Quantidade de células positivas
0	Negativa	zero
1	Discreta	< 25% de células positivas
2	Moderada	25 a 75% de células positivas
3	Intensa	> 75% de células positivas

Fonte: DOLKA et al., 2016

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nitrini, A.G.C., 2019

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos variaram de acordo com os dados a serem analisados.

Comparação entre as médias de idade, peso, progressão e tamanho dos tumores (comprimento, largura e profundidade) entre os diferentes grupos foi realizada a partir de análise de variância (ANOVA). Os pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk: $p > 0,05$) e homocedasticidade (teste de Levene: $p > 0,05$) foram checados. Frente ao não atendimento da homocedasticidade, utilizou-se correção de Welch. As comparações múltiplas foram realizadas a partir do pós-teste de Tukey e Games-Howell para dados homocedásticos e heterocedásticos, respectivamente.

A comparação da sobrevida entre os 3 grupos foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis, uma vez que a normalidade dos dados (teste de Shapiro Wilk) foi rejeitada ($p < 0,001$). Felinos que permaneciam vivos ao término dos 18 meses foram excluídos da análise de sobrevida.

A relação entre os grupos e a prevalência de recidiva e de deiscência dos pontos após a cirurgia foi avaliada pelo teste exato de Fisher, utilizando $\alpha = 5\%$.

Para comparação da temperatura tumoral e fora da área tumoral, de acordo com os grupos, foi realizada ANOVA para medidas repetidas mista, após verificados e atendidos os pressupostos. A comparação entre o tamanho tumoral (média de comprimento, largura e profundidade) nos animais do G2, antes do primeiro ciclo de FOS e após o término do primeiro ciclo, foi realizada utilizando-se análise de variância para medidas repetidas.

Para tomada de decisão foi utilizado nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando o programa SPSS¹⁷

¹⁷ Software SPSS v.22, An IBM Company, Chicago, IL, EUA.

7. RESULTADOS

Nitrini, A.G.C., 2019

7. RESULTADOS

7.1. Avaliação clínica

No período entre julho de 2015 e julho de 2018 foram atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da FMVZ-USP, 5345 casos novos, sendo 970 felinos (18%) com as mais diversas afecções. Dentre estes, 110 apresentaram-se com neoplasias cutâneas, sendo que em 36 o diagnóstico foi sugestivo de SAF. Após a aplicação dos critérios de exclusão, 21 felinos participaram da pesquisa, sendo 16 fêmeas (76%) e 5 machos (24%), todos castrados e com histórico de pelo menos, uma vacinação ao longo da vida. A idade variou de quatro a 16 anos (média de 9,1 anos $\pm$ 4), sendo 16 sem raça definida (76%), seguidos por quatro Siameses (19%) e um Ragdoll (5%). O peso médio dos animais foi de 4,8kg ($\pm$ 1,4) e o tempo de evolução das formações variou de quinze dias a 24 meses, com média de 5,3 meses.

O aspecto das neoplasias variou entre os pacientes, sendo a maioria de consistência firme (81%), superfície irregular (85%), não alopecico (66%), não ulcerado (61%), parcialmente aderido (52%) ou aderido (33%) e localizado em região abdominal (80%). O tamanho obtido pelo paquímetro variou de 1,5 a 9,5 cm de comprimento (média 4,9cm $\pm$ 2,5), de 1,1 a 8,2 cm de largura (média 4,2 cm $\pm$ 2,3) e de 0,5 a 6 cm de profundidade (média 2,3 cm $\pm$ 1,4). Dos 21 felinos, sete (33%) já haviam sido submetidos a cirurgias prévias para excisão dos sarcomas, com recidiva da neoplasia em média, após 6,8 meses da primeira intervenção.

O exame de citologia por aspirado com agulha fina foi conclusivo para neoplasia mesenquimal maligna em 71% dos casos (n=15). Nos demais, a presença de processo inflamatório e/ou contaminação sanguínea tornou o exame inconclusivo. Visto que um dos critérios de exclusão foi presença de metástases no momento do diagnóstico, todos os animais apresentaram radiografias torácicas com padrões radiográficos dentro da normalidade.

No grupo controle (G0) foram incluídos 13 animais, 8 fêmeas (53%) e 5 machos (47%), sendo a maioria dos animais sem raça definida (n=12), seguida por um Siamês. A idade variou de 3 a 15 anos (média de 9 anos $\pm$ 3), com peso médio

de 4,9kg ($\pm 0,7$). O tempo de evolução das formações variou de um a 6 meses, com média de três meses. O tamanho dos tumores variou de 2 a 9 cm de comprimento (média 4,8cm $\pm 2,6$), de 1,5 a 4,2 cm de largura (média 2,8 cm ± 1) e de 2 a 6 cm de profundidade (média 2,5 cm $\pm 1,4$), sendo que 46% estavam localizados em região abdominal (n=6), seguidos por membros (24%, n=3), região torácica (15%, n=2) e interescapular (15%, n=2). Dos 13 felinos, dois tumores tinham histórico de excisão cirúrgica prévia, em média cinco meses após a intervenção. As análises histológicas foram compatíveis com sarcoma, não sendo especificada a graduação tumoral. Também não foi possível determinar seu subtipo, já que as amostras não foram submetidas a análise imuno-histoquímica. De acordo com as análises estatísticas, não houve diferença significativa entre os grupos G1, G2 e G0, com relação as variáveis: idade, peso, tempo de progressão e tamanho do tumor, conforme observado na tabela 1.

Tabela 1 - Comparação entre os grupos de acordo com idade, peso, tempo de progressão e tamanho tumoral.

	G0	G1	G2	F	p
Idade (meses)	8,7 $\pm$ 3,5	9,2 $\pm$ 3,6	9,0 $\pm$ 4,6	0,49	0,952
Peso (kg)	4,9 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 1,6	4,9 $\pm$ 1,2	0,75	0,928
Progressão (meses)	1,6 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 2,6	7,4 $\pm$ 7,0	3,660	0,370
Comprimento (cm)	3,0 $\pm$ 1,9	4,5 $\pm$ 2,6	5,4 $\pm$ 2,4	0,321	0,728
Largura (cm)	4,8 $\pm$ 2,6	4,1 $\pm$ 2,3	4,4 $\pm$ 2,4	2,493	0,099
Profundidade (cm)	2,7 $\pm$ 1,0	2,2 $\pm$ 1,2	2,5 $\pm$ 1,6	0,109	0,897

Fonte: Nitrini, 2019

Os 21 animais da pesquisa foram submetidos à cirurgia com amplas margens laterais (3 a 5 cm) e profundas, incluindo ressecção de costelas caudais em 3 pacientes (2, 3 e 6 costelas, respectivamente). Onze animais (52%) receberam malha de polipropileno¹⁸ na reconstrução muscular após ressecção tumoral (Figura 2). Observou-se deiscência dos pontos cutâneos em oito animais (38%), sendo dois no G1 e seis no G2, sem diferença estatística entre os grupos (p=0,08).

Dos 21 animais, cinco (24%) apresentaram recidiva do tumor, em média 9 meses após a cirurgia. No grupo controle, observou-se recidiva em 7 felinos (53%), em média 10 meses após a cirurgia, não havendo diferença estatística entre os grupos (tabela 2).

¹⁸ Marlex ® - Cirúrgica Brasil Comercial E Importadora Ltda, Brasil.

Tabela 2 - Distribuição dos animais segundo ausência e presença de recidiva tumoral, de acordo com o grupo.

Grupo	Ausência	Presença	Total	p
G0	6	7	13	0,453
G1	7	3	10	
G2	6	2	8	
Total	19	12	31	

Fonte: Nitrini, 2019

O número de animais acometidos por metástases pulmonares, assim como o momento de seu diagnóstico, encontra-se na tabela 3, não havendo diferença estatística entre os grupos.

Tabela 3 - Distribuição dos animais segundo ausência e presença de metástase pulmonar, e momento do diagnóstico, de acordo com o grupo.

Grupo	Ausência	Presença	Total	Tempo médio (meses)	p
G0	0	2	2	15	0,130
G1	7	2	9	9	
G2	4	4	8	9	
Total	11	8	19		

Fonte: Nitrini, 2019

O tempo médio de sobrevida dos animais de acordo com o grupo encontra-se na tabela 4, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles.

Tabela 4 - Sobrevida média, de acordo com os grupos G0, G1 e G2.

	G0	G1	G2	F	p
Sobrevida em meses (média $\pm$ DP)	13,2 ($\pm$ 4,3)	11,3 ($\pm$ 6,6)	10,7 ($\pm$ 7,9)	0,553	0,585

Fonte: Nitrini, 2019.

Figura 2 - Felino nº18 (G2) - Fotografias do procedimento cirúrgico.

(A) posicionamento e preparo pré-operatório. (B) SAF em região torácica lateral esquerda. (C) incisão de pele e musculatura com 4 cm de margens laterais e divulsão de músculos paravertebrais. (D) desarticulação da 8ª à 13ª costela. (E) aspecto transoperatório após excisão de SAF em bloco, com visualização do diafragma desinserido. (F) sutura de malha de polipropileno no defeito muscular. (G) aspecto final da cirurgia, após sutura da pele e colocação de tudo esofágico. (H) Aspecto da região, ao 7º mês de pós-operatório.

Fonte: Nitrini, 2019.

7.2. Efeitos colaterais

De modo geral, a Fosfoetanolamina Sintética foi bem tolerada pelos felinos. O acesso venoso foi realizado por cateter em veia cefálica, e a administração da medicação diluída em solução fisiológica durou de 60 a 90 minutos, não sendo observado desconforto ou irritação local durante a administração.

Os efeitos colaterais mais observados durante o tratamento do SAF foram anorexia (16/21), anemia (9/21), emese (9/21), constipação (9/21) e prostração (4/21), com ocorrência principalmente no pós-operatório. Observou-se ainda diarreia (2/21), anúria (1/21), hematúria (1/21), neutropenia (1/21), aumento dos níveis de ureia e creatinina (1/21) e aumento de ALT (1/21).

Quando avaliados apenas os efeitos que aconteceram durante o primeiro ciclo de FO-S no G2 e, portanto, sem influência da intervenção cirúrgica, observou-se anemia (3/10), emese (2/10) e prostração (1/10).

Um dos animais já se encontrava anêmico (hematócrito= 30%), permanecendo estável durante o tratamento com FO-S. Da mesma forma, dois felinos que já apresentavam níveis de ureia e creatinina elevados antes do início do tratamento, mantiveram os mesmos níveis bioquímicos, havendo piora da função renal no período pós-operatório.

Os valores de linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, proteína total, albumina, fosfatase alcalina, GGT, triglicérides e colesterol não sofreram alteração nos gatos submetidos ao tratamento com FO-S, em nenhum dos grupos. Nenhum paciente apresentou hemólise, febre, mialgia ou artrite, sintomas relatados em literatura com o uso de fosfolipídios antitumorais.

Os efeitos adversos encontram-se resumidos nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Efeitos adversos classificados segundo VCOG- CTCAE/ 2011, observados nos 21 felinos com SAF durante o tratamento com FO-S.

Efeitos adversos	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Anorexia	9	5	2	-
Anemia	6	1	1	1
Emese	7	2	-	-
Constipação	7	2	-	-
Prostração	2	2	-	-
Diarréia	2	-	-	-
Anúria	1	-	-	-
Hematúria	-	1	-	-
Neutropenia	-	-	1	-
Aumento de ureia e creatinina	-	-	1	-
Aumento de ALT	-	-	-	1

Fonte: Nitrini (2019).

Tabela 6 – Efeitos adversos classificados segundo VCOG- CTCAE/ 2011, observados nos 10 felinos do G2, durante o primeiro ciclo de FO-S.

Efeitos adversos	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Anorexia	-	-	-	-
Anemia	2	1	-	-
Emese	1	1	-	-
Constipação	-	-	-	-
Prostração	1	-	-	-
Diarréia	-	-	-	-
Anúria	-	-	-	-
Hematúria	-	-	-	-
Neutropenia	-	-	-	-
Aumento de ureia e creatinina	-	-	-	-
Aumento de ALT	-	-	-	-

Fonte: Nitrini (2019).

7.3. Avaliação termográfica

No momento do diagnóstico, as temperaturas da área tumoral (TA) variaram de 32,1 a 38,4°C, sendo a média **35,6°C ($\pm 1,7$)**. Já nas áreas saudáveis, distantes pelo menos três centímetros do tumor (nTA), as temperaturas variaram de 31,9 a 37,8°C, sendo a média de **35,1°C ($\pm 1,6$)**, não havendo diferença estatística com relação à área tumoral ($F=3,338$ e $p=0,083$) (Figura 3).

Quando avaliados individualmente, doze tumores se apresentaram mais quentes que os tecidos ao redor, entre 0,2 a 3,1°C (média de $1,4 \pm 1$), enquanto que oito se apresentaram mais frios, entre 0,1 a 1,8°C (média de $0,7 \pm 0,7$) sugerindo grande variação no padrão termográfico dos sarcomas de aplicação. Um dos tumores apresentou a mesma temperatura que os tecidos saudáveis ao redor.

Quando avaliadas as temperaturas de acordo com o grau histológico do SAF, não se observou diferença significativa na temperatura tumoral nem na área sadia ao redor (Tabela 7).

Tabela 7 – Temperaturas obtidas por câmera termográfica da região do SAF, de acordo com o grau histológico.

Grau histológico	Temperatura (média $\pm$ DP)	
	TA	nTA
Grau I	33,95 $\pm$ 2,62	33,05 $\pm$ 1,63
Grau II	35,87 $\pm$ 1,81	35,08 $\pm$ 1,43
Grau III	35,74 $\pm$ 1,38	35,74 $\pm$ 1,50
F(p)	1,071 (0,364)	2,629 (0,100)

Legenda: TA- área tumoral; nTA- área não-tumoral

Fonte: Nitrini (2019).

Figura 3 - Imagens termográficas (A,C,E,G) e imagens padrão correspondentes (B,D,F,H) de felinos com SAF, no momento do diagnóstico.

Legenda(A) e (B): Felino nº3; (C) e (D): Felino nº15; (E) e (F): Felino nº18; (G) e (H): Felino nº1.

Fonte: Imagem do arquivo do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais da FMVZ/USP.

Nos animais do G2, seis formações apresentaram redução da temperatura após tratamento com FO-S, numa média de $1,5^{\circ}\text{C} \pm 1,1$, enquanto que nas demais houve aumento da temperatura, numa média de $1^{\circ}\text{C} \pm 0,4$ (Tabela 8). Não houve diferença estatisticamente significativa nas temperaturas, após o uso do fosfolípide antitumoral.

Tabela 8 - Temperaturas obtidas por câmera termográfica em 10 felinos do G2, antes do início da FO-S e após a última sessão do primeiro ciclo de FO-S.

Felino nº	TA	TA pós FOS	TA pós FOS - TA	F	p
12	35,7	35,3	-0,4	0,930	p=0,360
13	38,4	36,3	-2,1		
14	35,2	31,9	-3,3		
15	34,2	35,5	1,3		
16	33,2	34,5	1,3		
17	37,3	36	-1,3		
18	33,6	34,7	1,1		
19	32,4	31,9	-0,5		
20	37	35,8	-1,2		
21	37,2	37,6	0,4		
Média	35,4	35,0	-0,5		
DP	2,0	1,8	1,5		

Legenda: TA- área tumoral; TA pós FOS- área tumoral pós tratamento com FO-S; TA pós FOS - TA - diferença de temperatura tumoral antes e após FOS, em $^{\circ}\text{C}$

Fonte: Nitrini (2019).

Figura 4 - Felino nº21 (G2) - Imagem termográfica. (A) antes do início da FO-S. (B) após o término do primeiro ciclo de FO-S.

Legenda: EI1 Average: média de temperatura de área tumoral (TA, em °C). EI2 Average: média de temperatura de área não tumoral (nTA, em °C).

Fonte: Imagem do arquivo do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais da FMVZ/USP

7.4. Avaliação tomográfica

Tomografia computadorizada foi realizada em 20 felinos, sendo que três pacientes não receberam contraste iodado endovenoso por apresentar alteração nos níveis de ureia e creatinina séricas, realizando apenas a avaliação tomográfica simples.

Na avaliação pré-contraste, a maioria dos tumores apresentou-se como formação única (n= 17, 85%), amorfa (n=15, 75%), com margens definidas (n=14, 70%), com áreas cavitárias hipoatenuantes (n=18, 90%) e sem mineralização (n=17, 85%), com suspeita de comprometimento de musculatura adjacente em 14 (70%). Setenta por cento dos tumores revelou-se de atenuação homogênea (n=14). Oito animais apresentaram borramento de gordura adjacente à formação (40%) e sete apresentaram linfonodomegalia torácica ou abdominal (35%).

Os cortes tomográficos contrastados revelaram realce ao contraste em todas as formações. A maioria dos tumores passou a se mostrar com margens pouco definidas (n=12, 70%), de parênquima heterogêneo (n=14, 82%) e com vascularização periférica proeminente (n=12, 70%). O tamanho das formações foi medido nos mesmos eixos utilizados na mensuração por paquímetro, descritos previamente, considerando-se todo tecido tumoral e peritumoral alterado na tomografia. O comprimento variou de 2,2 a 14,3 cm (média de $5,9 \pm 2,8$), a largura variou de 0,9 a 8,0cm (média de $4,7 \pm 1,9$) e a profundidade variou de 0,8 a 7,0 cm (média de $3,4 \pm 2$). Ao comparar as medidas obtidas pelo exame físico com as da tomografia, observa-se diferença estatística na mensuração da profundidade, sendo maior pelo paquímetro e menor pela tomografia ($t= 3,260$ e $p=0,004$). Não houve diferença nas mensurações do comprimento ($t= -0,406$, e $p=0,689$) nem na largura ($t= 0,709$ e $p= 0,487$).

Figura 5 - Imagem de tomografia computadorizada do Felino nº18 (G2).

Legenda: (A) corte dorsal de região tóraco-abdominal, evidenciando formação em parede lateral esquerda. (B) vista lateral oblíqua da mesma formação, em reconstrução 3D com renderização de volume.

Fonte: Imagem do arquivo do Serviço de Diagnóstico por Imagem da FMVZ/USP.

Avaliou-se ainda os aspectos tomográficos de acordo com o grau histológico do tumor. A distribuição dos animais segundo os parâmetros avaliados antes do início do tratamento com FO-S encontra-se na tabela 9. Não houve variabilidade suficiente para a realização de inferência estatística.

Tabela 9 - Distribuição dos animais segundo os parâmetros avaliados na tomografia, antes do início do tratamento com FO-S, de acordo com o grau histológico do SAF.

Parâmetros tomográficos	Grau histológico			Total
	1	2	3	
Margens				
Definidas	2	9	3	14
Parcialmente definidas	-	3	3	6
Áreas cavitárias				
Ausente	2	-	-	2
Presente	-	12	6	18
Mineralização				
Ausente	2	11	4	17
Presente	-	1	2	3
Atenuação tumoral*				
Heterogênea	-	10	6	16
Homogênea	1	-	-	1
Vascularização periférica*				
Ausente	1	3	1	5
Presente	-	7	5	12
Borramento de gordura (lesões peritumorais)				
Ausente	2	5	5	12
Presente	-	7	1	8
Invasão muscular				
Ausente	2	3	1	6
Presente	-	9	5	14
Linfonodomegalia periférica				
Ausente	2	8	3	13
Presente	-	4	3	7

* Considerados apenas animais submetidos ao contraste endovenoso.

Fonte: Nitrini (2019).

Quando comparados os aspectos tomográficos dos tumores primários com as recidivas observou-se que ambos apresentaram margens definidas ou parcialmente definidas, com presença de áreas cavitárias em todos os tumores, com exceção de um animal em cada grupo. O grau de mineralização também foi semelhante, assim como a atenuação tumoral, que se mostrou heterogênea independente do tumor ser primário ou recidiva. A vascularização periférica foi observada em 66% dos tumores primários, contra 80% das recidivas. O borramento de gordura foi observado em 38% dos tumores primários e 42% das recidivas. Ambos grupos apresentaram suspeita de invasão muscular em aproximadamente 70% tumores. O aumento de linfonodos regionais foi observado em 30% dos tumores primários e em 42% das recidivas. O tamanho dos tumores foi semelhante entre os grupos, tendo os tumores primários em média $5,3 \pm 2$ cm de comprimento, $4,8 \pm 1,8$ cm de largura e $3,2 \pm 2$ cm de

profundidade. Já as recidivas mediram em média 7cm de comprimento ($\pm 3,9$), 4,6cm de largura ($\pm 2,3$) e 3,8 cm de profundidade (± 2).

Dentre os animais do G2, sete fizeram a tomografia antes do início e depois do término do primeiro ciclo de FO-S. As dimensões dos tumores pré e pós tratamento neoadjuvante com FOS encontram-se na tabela 10.

Tabela 10 - Comparação entre as médias do tamanho dos tumores (comprimento, largura e profundidade, em cm) pré e pós o ciclo de FO-S, nos animais do G2.

	Pré	Pós	F	p
Comprimento	5,26 $\pm$ 2,3	5,64 $\pm$ 2,96	1,133	0,328
Largura	5,24 $\pm$ 1,86	5,88 $\pm$ 2,43	2,431	0,170
Profundidade	3,80 $\pm$ 2,23	4,28 $\pm$ 2,76	2,678	0,153

Fonte: Nitrini (2019).

Não se observou alterações significativas nas médias dos valores das medidas tumorais após tratamento com FO-S. As margens permaneceram parcialmente definidas e irregulares, com o mesmo grau de mineralização e o parênquima, de atenuação heterogênea, com realce ao contraste. Não se observou alteração na vascularização periférica, na invasão muscular adjacente nem no borramento da gordura peritumoral. As áreas cavitárias que antes estavam presentes na maioria dos tumores em quantidade moderada, passaram a se apresentar em quantidade acentuada em 71% das formações. Linfonodomegalia regional, antes observada em dois destes sete animais, tornou-se evidente em cinco deles, sendo os linfonodos inguinais os mais acometidos. O número de animais não permitiu inferir, através da análise estatística, a relação existente entre o uso da FO-S e as alterações encontradas na tomografia controle.

Figura 6 – Imagens de tomografia computadorizada de felinos com SAF.

Felino nº13 G2 - (A) corte transversal, antes do início da FO-S; (B) - após término do primeiro ciclo de FO-S. **Felino nº16 G2** - (C) corte transversal, antes do início da FO-S; (D) após término do primeiro ciclo de FO-S. **Felino nº18 G2** – Reconstrução em projeção de intensidade máxima: (E) corte sagital antes do início da FO-S; (F) corte transversal antes do início da FO-S; (G) corte dorsal, antes do início da FO-S.

Fonte: Imagem do arquivo do Serviço de Diagnóstico por Imagem da FMVZ/USP.

7.5. Avaliação histológica

Na análise histológica, levando-se em consideração diferenciação celular, grau de necrose e índice mitótico (COUTO et al, 2002), observou-se que 10% dos tumores (n=2) foram classificados como grau I, 57% como grau II (n=12), e 33% com grau III (n=7), distribuídos nos grupos conforme tabela 11.

Tabela 11 - Graduação tumoral de acordo com os grupos.

	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Total
Grupo 1	2	6	3	11
Grupo 2	0	6	4	10
Total	2	12	7	

Fonte: Nitrini, 2019.

As margens laterais e profundas apresentaram-se livres de células neoplásicas em todos os pacientes. Após avaliação imuno-histoquímica, a maioria dos tumores se classificou como fibrossarcoma (n=11, 52%), seguido por sarcoma pleomórfico (n=7, 33%), sarcoma histiocítico (n=2, 10%) e rabdomiossarcoma (n=1, 5%).

7.6. Avaliação imuno-histoquímica

7.6.1. Ki-67

Todos os tumores expressaram Ki-67, numa porcentagem que variou de 13 a 57% das células marcadas (média **37% ± 10**). Buscou-se comparar a diferença de expressão entre os grupos G1 e G2, com objetivo de avaliar se a FO-S atuaria de alguma maneira na proliferação celular, diminuindo a expressão de Ki-67 nos tumores do G2.

Nos onze animais do G1, a análise imuno-histoquímica revelou marcação por Ki-67 em 13 a 58% das células, sendo a média de **35%**. Nas dez formações do G2, ou seja, naqueles tumores submetidos a ação da FO-S, a expressão variou de 33 a 55% das células, sendo a média de **40%**. Não houve diferença estatística na expressão de Ki-67, entre os grupos G1 e G2 ($T=-1,07$ e $p=0,298$).

Quando avaliados de acordo com o grau do tumor, aqueles que mais expressaram Ki-67 foram os de grau II, em 40% de suas células, seguidos pelo grau III, em 38% das células, e grau I, em 18% das células. Houve diferença estatística na expressão dos tumores de grau I com relação aos demais. Já entre os de grau 2 e 3, não houve diferença na marcação de ki-67, conforme mostra a tabela 12.

Tabela 12 - Expressão imuno-histoquímica de Ki-67 (% de células marcadas) de acordo com graduação tumoral

Graduação tumoral	Média (%)	Dp	F	p
Grau I	18 ^a	6,6	6,383	0,008
Grau II	40 ^b	9,5		
Grau III	38 ^b	5,2		

^{a, b} Letras diferentes indicam diferença estatística (teste de Tukey)

Fonte: Nitrini, 2019.

7.6.2. Caspase-3

Dos 21 tumores, dez não expressaram caspase. Em oito tumores, a expressão foi discreta, e em três, foi moderada. Assim como no Ki-67, buscou-se comparar a expressão de caspase-3 entre os grupos a fim de determinar possível efeito apoptótico pela FO-S nos tumores do G2, submetidos a medicação previamente a cirurgia.

Nos animais do G1, a marcação imuno-histoquímica de caspase-3 foi ausente em quatro tumores (36%) e presente, em sete (64%), sendo que na maioria destes (71%), ela foi considerada discreta (score 1). Apenas dois tumores apresentaram marcação moderada (score 2). No G2, houve marcação em apenas quatro tumores (40%), sendo que em três, ela ocorreu em quantidade discreta (score 1), e um, em quantidade moderada (score 2). Não houve diferença estatística na expressão de caspase-3, entre G1 e G2, conforme tabela 13.

Tabela 13 - Expressão imuno-histoquímica de caspase-3 (escore de 0 a 3) de acordo com graduação tumoral.

Grupo	Expressão da caspase-3				p
	Score 0 (ausente)	Score 1	Score 2	Score 3	
G1	4	5	2	0	0,331
G2	6	3	1	0	

Fonte: Nitrini, 2019

Também não se observou diferença estatisticamente significativa na expressão de caspase-3 de acordo com o grau histológico do SAF ($p=0,759$).

Figura 7 - Fotomicrografias representativas das reações de imuno-histoquímica nos SAF.

Legenda: (A) - **Felino nº.6 G1** - expressão imuno-histoquímica de Ki-67, caracterizada pela marcação nuclear marrom-acastanhada, em 39,8% das células (40x). (B) - **Felino nº.19 G2** - expressão imuno-histoquímica de Ki-67, em 55,1% das células (40x). (C) - **Felino nº.10 G1** - expressão imuno-histoquímica de caspase-3, score 1, caracterizada pela marcação citoplasmática marrom-acastanhada (20x). (D) - **Felino nº.21 G2** - expressão imuno-histoquímica de caspase-3, score 2 (20x). Fonte: Imagem do arquivo do Serviço de Patologia da FMVZ/USP

8. DISCUSSÃO

Nitrini, A.G.C., 2019

8. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a eficácia da Fosfoetanolamina Sintética (FO-S) quando associada ao procedimento cirúrgico em 21 felinos com SAF.

A prevalência do SAF foi de 3,7% dos felinos atendidos, valor bem acima da média encontrada na literatura. Alguns fatores podem justificar esta diferença, como o local de origem dos estudos. No Reino Unido, por exemplo, a vacinação contra raiva não é rotineiramente realizada e a prevalência reportada é de 1 a cada 10.000 a 20.000 felinos consultados. No Brasil, a imunização anual contra raiva é obrigatória e fornecida gratuitamente pelo governo durante as campanhas de vacinação. Soma-se a isso, o encaminhamento de muitos casos de SAF pelos clínicos particulares a um hospital escola de referência como o HOVET-USP, devido à complexidade do tratamento exigido. Mais estudos abrangendo outras clínicas e hospitais veterinários de diversas regiões seriam necessários para se definir com mais precisão a incidência da doença na cidade de São Paulo.

A idade média dos animais acometidos foi de 9 anos, dado semelhante ao encontrado em literatura que indica acometimento de animais mais jovens que naqueles portadores de sarcoma não vacinal (HENDRICK et al, 1994). A maioria dos animais (76%) eram fêmeas, todas castradas, concordando com os achados de Graf e colaboradores (2016), que observaram maior probabilidade das fêmeas, principalmente as castradas, de desenvolverem fibrossarcoma (GRAF et al, 2016).

A maioria dos felinos não apresentou raça definida, podendo estar relacionado à alta prevalência de felinos sem raça definida na população onde foi realizado o estudo. De 2015 a 2018, 87% de todos os felinos atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais da FMVZ/USP apresentavam miscigenação racial.

O exame citológico demonstrou ser um exame rápido, de fácil execução, de baixo custo e baixo risco, sendo compatível com neoplasia mesenquimal em 71% dos casos. Nos demais, a ausência de células e/ou contaminação sanguínea tornou o exame inconclusivo, corroborando com os dados de literatura sobre as limitações do exame (MARTANO et al, 2011). O diagnóstico citológico de processo inflamatório crônico, observado em quatro animais e posteriormente confirmados na histologia

como neoplasia mesenquimal, traduz a importância de maior investigação no diagnóstico, evitando a demora no tratamento por julgar estar diante apenas de eventual reação inflamatória transitória à vacina.

Estudos prévios demonstram que o subtipo histológico mais comum do SAF é o fibrossarcoma, representando cerca de 80 a 90% destes tumores. (COUTO et al. 2002; ROMANELLI et al. 2008; CARNEIRO, 2012). Os achados da presente pesquisa também revelaram elevada incidência de fibrossarcoma, mas numa proporção menor (52%), seguido pelo sarcoma pleomórfico, também chamado de sarcoma anaplásico com células gigantes ou histiocitoma fibroso maligno. Embora seja importante a determinação do subtipo histológico, sabe-se que não há correlação com o comportamento biológico tumoral ou prognóstico (ROMANELLI et al. 2008). Com relação a graduação histológica, a maioria dos tumores se classificou como grau II, seguidos pelo grau III, mesma proporção observada na literatura (VAN NIMWEGEN & KIRPENSTEIJN, 2012), também não havendo correlação do grau com a sobrevida ou recidiva, o que colabora com os achados de alguns autores (KUNTZ et al, 1997; MARTANO et al, 2011).

Não foi possível inferir sobre a taxa de metástase no momento do diagnóstico visto que animais cuja radiografia de tórax sugeria lesões suspeitas para metástase pulmonar não foram considerados candidatos a cirurgia e, portanto, foram excluídos do estudo.

Em 1999, um grupo composto por diversas associações americanas criou a *Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task-Force* (VAFSTF), com objetivo de ampliar os estudos sobre a neoplasia (MORRISON et al, 2001). Dada a necessidade de se obter margens cirúrgicas amplas e na dificuldade do controle do SAF interescapular, publicou-se as seguintes recomendações de locais para vacinação: vacina antirrábica: região distal de membro pélvico direito; vírus da leucemia felina (FeLV): região distal de membro pélvico esquerdo; outras vacinas: região distal de membro torácico direito. Desde esta publicação, a prevalência do SAF não mudou, mas o diagnóstico do tumor no subcutâneo dos membros e na lateral do abdome aumentou, assim como o da região interescapular diminuiu (SHAW et al, 2009). Entretanto, em alguns países como a Suíça, não se observou alterações significativas na localização tumoral com o passar dos anos, apesar das recomendações da Associação Suíça de Medicina Veterinária para que se

evitassem injeções na região interescapular (GRAF et al, 2018). No presente estudo, nenhuma formação dos felinos do G1 ou G2 estava localizada em região cervical ou interescapular, podendo refletir uma mudança nos hábitos dos clínicos com relação ao local escolhido para vacinação, visto que antigamente a incidência de sarcoma nesta região era alta, assim como a prática de injeções neste local. Porém, isso pode ser resultado de viés de seleção amostral já que a população do presente estudo incluiu apenas tumores considerados operáveis, o que é mais difícil de acontecer nos tumores em região interescapular.

A região abdominal lateral foi a mais acometida, provavelmente por ser um local bastante utilizado na aplicação de injeções subcutâneas nos felinos. Por ser também uma região típica de acúmulo de gordura, o desenvolvimento destes tumores pode sugerir influência do ambiente rico em tecido adiposo. Na medicina humana diversos estudos epidemiológicos já comprovam a relação do excesso de tecido adiposo com o câncer, sendo a obesidade considerada como fator prognóstico negativo nos tumores de mama, cólon e fígado (DIVELLA et al, 2016). O tecido adiposo pode influenciar o desenvolvimento tumoral devido a alteração do metabolismo dos hormônios sexuais, assim como pela produção de adipocinas inflamatórias. Os adipócitos provêm a energia necessária ao rápido crescimento das células tumorais, enquanto que o microambiente de hipóxia faz aumentar a produção e liberação de fatores de crescimento endoteliais, favorecendo a formação de novos vasos e a disseminação tumoral (ZOICO et al, 2018).

Nos felinos domiciliados, estima-se que 50% são obesos, contra 30% daqueles com livre acesso à rua (SLOTH, 1992). Estudo realizado com 46 animais detectou diferença significativa no peso e escore corporal de felinos com SAF, quando comparados ao grupo controle, embora a autora tenha ressaltado que os animais deste último grupo portavam algum tipo de doença crônica, capaz de levar a diminuição do peso corpóreo (CARNEIRO, 2012). Da mesma forma, Zardo e colaboradores observaram que 75% dos felinos com SAF apresentavam-se com sobrepeso, apoiando a hipótese que felinos obesos tem maior predisposição a doença (ZARDO et al, 2015). O presente trabalho não avaliou o escore corporal, mas a evidência de grande quantidade de gordura peritumoral observada durante o procedimento cirúrgico na maioria dos animais justifica estudos futuros sobre a influência da obesidade no SAF.

Imagens termográficas

As neoplasias comumente mostram aumento da perfusão tecidual, e do metabolismo, e consequente elevação de temperatura com relação ao tecido saudável. A detecção destes gradientes de temperatura através da termografia auxilia o diagnóstico precoce e o estadiamento tumoral (REDAELLI et al, 2014). A imagem termográfica permite detectar a atividade tumoral assim que o suprimento sanguíneo começa a se desenvolver para sustentar o crescimento da massa, diferente de outros exames complementares como a radiografia, onde o tamanho da lesão é fundamental ao diagnóstico (MILOSEVIC et al, 2014).

Diversos estudos foram realizados na medicina humana, buscando avaliar a sensibilidade e especificidade da termografia no diagnóstico de neoplasias mamárias em mulheres, e os resultados são controversos. Revisão sistemática publicada em 2013 observou grande variação na sensibilidade (25 a 97%) e especificidade (12 a 85%) da termografia, concluindo não haver evidência suficiente para recomendar o uso da técnica no diagnóstico da neoplasia mamária, embora os autores tenham ressaltado que a elevada heterogeneidade do grupo de mulheres incluídas possa ter limitado as conclusões do estudo (VREUGDENBURG et al, 2013).

Resultados mais favoráveis foram obtidos em estudo multicêntrico realizado em 769 pacientes, que buscou determinar a eficácia da termografia em distinguir lesões benignas e malignas em pacientes submetidos à biópsia com base nos achados da mamografia. Os autores observaram sensibilidade de 97% e especificidade de 14% da termografia, com aumento significativo da última, quando a análise era feita em mamas densas, ao contrário de mamas com grandes proporções de tecido adiposo (PARISKY et al, 2003). Os autores ressaltam que, embora não seja indicada como método substitutivo da mamografia, a termografia pode ser usada como método complementar de diagnóstico nos casos de neoplasias mamárias.

Ainda em medicina humana, Yahara e colaboradores observaram correlação positiva entre a densidade de vasos e o aumento de temperatura nas lesões mamárias malignas em mulheres (YAHARA et al, 2003). Do mesmo modo, Wishart e colaboradores obtiveram alta sensibilidade e especificidade (78 e 75%,

respectivamente) na termografia quando usada na avaliação de mamas em mulheres abaixo de 50 anos. Estes autores ressaltaram que nas mamas de mulheres idosas, o grau de vascularização é naturalmente menor, o que pode comprometer a eficácia do exame (WISHART et al, 2010).

No presente estudo, a temperatura média dos tumores não foi estatisticamente diferente dos tecidos saudáveis ao redor. Estes achados diferem dos encontrados por Tolón e colaboradores, que observaram aumento bem maior da temperatura (2 a 5°C) na zona tumoral quando comparado aos tecidos ao redor, embora o relato tenha se baseado em apenas dois felinos com fibrossarcoma (SANZ-TOLÓN et al, 2008). Resultados semelhantes foram obtidos por Mocanu e colaboradores (2004), em cinco felinos com fibrossarcoma, onde a termografia revelou temperaturas mais elevadas na zona tumoral, variando entre 41,0 a 43,6°C, enquanto que nas áreas periféricas da lesão a temperatura variou de 37,5 a 38,9°C.

Enquanto a maioria dos estudos aponta aumento da temperatura dos tumores, outros revelam resultados opostos. Ratos submetidos a implante subcutâneo de células de adenocarcinoma não apresentaram elevação da temperatura no local onde se desenvolveu o tumor, mesmo sendo este de característica altamente invasiva e vascularizada. Pelo contrário, uma constante redução da temperatura foi observada mesmo nos tumores de menor volume (0,5cm de diâmetro). Uma das hipóteses para este achado seria o rápido crescimento do tumor implantado, enquanto que em outros tumores, como nas neoplasias mamárias, o desenvolvimento ocorre numa progressão consideravelmente mais lenta. Uma segunda hipótese seria o fato de que na angiogênese induzida por tumor os novos vasos seriam anômalos e afuncionais e, portanto, muitos tumores sólidos exibiriam hipovascularização e diminuição do fluxo sanguíneo comparado aos tecidos saudáveis (XIE et al, 2003).

No presente trabalho, 38% dos SAFs se mostraram mais frios que os tecidos ao redor, o que também poderia ser justificado pelo crescimento rápido e desenvolvimento de áreas de necrose central. Achados semelhantes foram obtidos por Poljak-Blazi e colaboradores, ao observarem redução da temperatura na área tumoral após implante de células de carcinoma Walker 256 em ratos. Os autores acreditam que a injeção das células neoplásicas desencadearia resposta inflamatória aguda com citotoxicidade às células tumorais, formação de necrose,

associada a um microambiente ainda pobre de neovascularização (POLJAK-BLAZI et al, 2009).

Dentre os demais SAF, 57% se apresentaram mais quentes que os tecidos ao redor, sugerindo variação no padrão termográfico destes tumores, assim como Pavelski e colaboradores observaram nas neoplasias mamárias em cadelas em 2015. No mesmo ano, Melo e colaboradores também observaram variação de temperatura nos mastocitomas caninos, e da mesma forma que no presente estudo, também não houve correlação da temperatura tumoral com o grau histológico. (MELO et al, 2015).

Para a realização do exame, a temperatura ambiente foi controlada em 22°C e sem corrente de ar. Estudos conduzidos em cavalos mostraram correlação positiva entre o aumento da temperatura da região articular e a temperatura ambiente, demonstrando a necessidade de se realizar o exame em local com temperatura controlada (BRIOSCHI et al, 2003; MACHADO et al, 2013).

Outro requisito indispensável para obtenção das imagens termográficas é a tricotomia prévia, realizada em todos os animais do presente estudo. Redaelli e colaboradores (2014) avaliaram 110 animais com as mais diversas afecções, incluindo seis felinos com fibrossarcoma cutâneo, e concluíram que a termografia não favoreceu a localização da neoplasia naqueles pacientes, ressaltando, os próprios autores, que a presença de pelos longos e espessos comprometeu a adequada obtenção das imagens. Tal fato pode ser observado no presente estudo, quando do acompanhamento das imagens termográficas realizadas antes de cada aplicação de FO-S, constatou-se que o mínimo crescimento dos pelos já era suficiente para modificar a temperatura aferida no local.

Uma das limitações do exame diz respeito a avaliação de tecidos profundos, já que a termografia afere apenas a temperatura superficial da pele, não atingindo planos maiores do que alguns centímetros em profundidade (REDAELLI et al, 2014). Em mulheres com neoplasia mamária, especialmente as obesas ou com mamas acentuadamente volumosas, a aferição da temperatura dos tecidos mamários torna-se prejudicada pelo tecido adiposo superficial da pele (ARORA et al, 2008). No presente estudo, este fato não comprometeu as análises das imagens visto que os sarcomas de aplicação são tumores que normalmente se localizam na superfície da pele.

De acordo com a literatura, a termografia permite o monitoramento tumoral quando utilizada de maneira contínua durante o tratamento, à medida que o gradiente de temperatura tende a diminuir com os danos teciduais causados pela terapia instituída. Tais mudanças metabólicas, e consequentemente termográficas, podem se manifestar antes ainda da redução do volume tumoral, permitindo uma avaliação precoce da resposta à terapia (TEPPER & GANNOT, 2015). Neste estudo, não houve alteração da temperatura dos tumores de maneira estatisticamente significativa após o tratamento com FO-S. Alguns tumores tornaram-se mais frios após o tratamento, porém não é possível inferir se foi efeito da diminuição da taxa metabólica e da neoangiogênese causada pela medicação, ou se foi pela evolução da necrose tumoral. Uma das limitações desta pesquisa foi a ausência de um grupo de animais portadores de SAF, não submetidos a nenhum tratamento quimioterápico ou cirúrgico, para que pudesse ser avaliado o padrão termográfico evolutivo da doença.

A termografia parece ser um bom método para avaliação de lesões cutâneas, dada sua sensibilidade na detecção das variações nas temperaturas com relação as áreas saudáveis. Entretanto, mais análises com um número maior de pacientes são necessárias, para determinar o impacto desta técnica no diagnóstico e acompanhamento clínico do sarcoma de aplicação felino.

Tomografia computadorizada

Por seu caráter infiltrativo e altas taxas de recidiva, o correto planejamento cirúrgico se faz indispensável para o sucesso do tratamento no SAF. Para tanto, os exames de imagem, principalmente a TC, assumem grande importância na mensuração da extensão do tumor e na detecção das infiltrações peritumorais.

Uma das características do SAF é a proeminente inflamação e a vascularização peritumorais, consideradas como parte efetiva da neoplasia e, portanto, devem ser incluídas no planejamento cirúrgico. No presente trabalho, a grande maioria das formações apresentou vascularização periférica proeminente e heterogeneidade do parênquima, com realce após o contraste em 100% das formações. Em 2013, estudo com 22 SAF observou ausência de realce em apenas uma formação, sendo atribuído pelos autores as suas pequenas dimensões

(0,1cm³), quando o tumor ainda estaria em fase inicial, com pouca vascularização (TRAVETTI et al, 2013).

O mesmo padrão heterogêneo do parênquima citado pela literatura pode ser observado em 94% dos tumores no presente estudo, caracterizando-se pela presença de áreas hiperatenuantes entremeadas a áreas únicas ou múltiplas com hipoatenuação, normalmente correspondentes a centros necróticos. Comparando-se o aspecto tomográfico dos tumores primários com os redicivantes, não houve diferença significativa, nem correlação com o grau de malignidade, achados semelhantes aos descritos em literatura por Zardo e colaboradores, ao avaliarem 32 felinos com SAF (ZARDO et al, 2015).

Com relação a mensuração do tumor, diversos estudos ressaltam a discrepância entre a medida clínica com a obtida pela TC (FERRARI et al, 2015). No presente trabalho, as medidas obtidas pela tomografia foram semelhantes às obtidas pelo paquímetro, com exceção do eixo dorsoventral (profundidade), que mostrou medidas estatisticamente maiores pelo exame clínico. Tal fato pode ser justificado pela dificuldade da mensuração deste eixo, dependendo do tamanho e formato do tumor, gerando resultados pouco confiáveis. Por esta razão, muitos autores desconsideram esta medida, tornando a TC ainda mais importante na avaliação das dimensões do SAF (TRAVETTI et al, 2013).

Em 2017, estudo comparou o tamanho medido pela avaliação clínica com a TC em 32 sarcomas de aplicação, obtendo valores maiores no eixo craniocaudal pela TC, observando ainda que as imagens tomográficas pós-contraste demarcaram com mais clareza as margens do tumor e definiram de forma mais criteriosa o seu tamanho (ZARDO et al, 2017).

Em concordância com estes autores, no presente estudo observou-se que as projeções periféricas do tumor foram detectadas apenas com a tomografia, assim como o borramento da gordura ao redor, e embora a diferenciação entre processo inflamatório e neoplásico tenha sido possível apenas com exame histopatológico, todo tecido anormal foi incluído na intervenção cirúrgica, dentro das margens planejadas. Alguns autores ressaltam que as lesões peritumorais visibilizadas nestes exames de imagem não devem ser necessariamente caracterizadas como tumorais. Estudo realizado em 10 felinos com SAF submetidos à cirurgia com amplas margens avaliou histologicamente 87 lesões peritumorais, definidas como estruturas de tecido

mole imediatamente adjacentes ou próximas à massa tumoral, com aparência diferente da periferia do tumor e dos tecidos normais, identificadas pela TC e RM. Quando analisadas microscopicamente, apenas 20% delas foram diagnosticadas como neoplásicas (NEMANIC et al, 2016).

No presente estudo, observou-se correlação entre o tamanho do tumor e a ausência de plano de clivagem, embora alguns autores ressaltem que mesmo lesões pequenas podem apresentar caráter infiltrativo nas estruturas musculoesqueléticas ao redor (LONGO et al, 2017).

Embora nenhum tumor tenha se localizado na região interescapular, estudo conduzido com 84 felinos com SAF neste local observou medidas diferentes de infiltração tecidual, dependendo da posição dos membros torácicos durante a TC. Em alguns pacientes do estudo, a TC com os membros fletidos caudalmente, próximo ao corpo, mostrou infiltração menor que na posição com os membros posicionados cranialmente. As estruturas musculoesqueléticas que se mostravam infiltradas nas duas posições teriam maior probabilidade de serem neoplásicas, ressaltando os autores, a importância da realização do exame nos dois posicionamentos (LONGO et al, 2017).

Nos animais do G2, o exame de TC realizado antes e depois do primeiro ciclo de FO-S buscou achados que sugerissem seu efeito antitumoral. Utilizando-se o critério RECIST, seis tumores foram classificados como doença estável (85%) e um (14%) como doença progressiva. Quando consideradas as três dimensões dos SAF, e não apenas a maior, observou-se grande variação nas dimensões em alguns tumores. Alguns deles regrediram até 10% de seu comprimento inicial, enquanto outros, aumentaram quase 28%. Um dos tumores regrediu 2% de sua largura inicial, enquanto outro apresentou aumento de 49%. O mesmo ocorreu com a profundidade, que em um dos tumores diminuiu 10% enquanto que em outro, aumentou 83% após tratamento com a FO-S. No geral, os tumores aumentaram de tamanho após o tratamento com FO-S, embora de maneira não significativa ($p>0,05$).

Quando avaliados pelo critério CHOI, 100% dos tumores se classificaram por doença estável, visto que não houve alteração na atenuação tumoral após o tratamento com FO-S.

Tratamento

A complicação maior do procedimento cirúrgico foi a deiscência parcial de pontos, presente em 38% dos felinos, valor semelhante ao descrito por Carneiro (2012), não havendo diferença estatística com relação ao grupo. Cantatore e colaboradores (2014) observaram a mesma complicação em 37% dos felinos após excisão cirúrgica radical do SAF, relacionada principalmente a remoção de grande extensão de musculatura e pele, e elevada tensão sobre os pontos de sutura. O tempo prolongado de cirurgia também foi inferido como fator predisponente, indiretamente relacionado ao tamanho tumoral e complexidade do procedimento cirúrgico.

No presente estudo o uso da malha de polipropileno permitiu reconstruções de grandes defeitos e não aumentou a incidência de deiscência, visto que dos onze animais que receberam o implante, cinco apresentaram esta complicação, em pequenas proporções, cujo tratamento conservativo foi suficiente para a resolução da ferida. Phelps e colaboradores (2011) relataram outra possível complicação com o uso das malhas: a formação de trajetos fistulosos crônicos, observado em 1% dos animais operados. Como opção ao uso das malhas sintéticas, os autores citam a utilização de flaps musculares autólogos, avanço do diafragma ou omento.

Com relação ao tratamento com FO-S, assim como relatado em literatura, observou-se raros efeitos colaterais, sendo a maioria deles atribuídos ao procedimento cirúrgico (ressecção radical, inapetência, dor pós-operatória, etc), visto que se manifestaram apenas depois da cirurgia. Três pacientes desenvolveram anemia após o primeiro ciclo de FO-S. Pelas características hematológicas e por se tratar de tumores de grandes proporções, sendo dois deles ulcerados, acredita-se que a anemia se deu por perda sanguínea crônica, e não por hemólise, como descrito em literatura como possível efeito da FO-S. De acordo com alguns autores, a seletividade da FO-S por células neoplásicas justifica o baixo índice de efeitos colaterais nos pacientes (FERREIRA et al, 2013a).

Embora bem tolerada pelos felinos com SAF, os resultados obtidos não foram encorajadores no referente aos efeitos sobre o tumor: nos animais do G2, os sarcomas de aplicação não apresentaram redução significativa de tamanho, tendo alguns até aumentado ao término do primeiro ciclo. Resultados mais promissores

foram obtidos por Ferreira e colaboradores (2011), ao utilizarem FO-S no tratamento de melanoma cutâneo implantado no dorso de 30 ratos. No estudo, os animais foram tratados com FO-S nas doses de 7 ou 14mg/kg, intraperitoneal, em dias alternados, por 50 dias. Ao final do tratamento, observaram citotoxicidade e inibição do crescimento das células tumorais, redução significativa do volume tumoral e da incidência de metástase, com ambas as doses de FO-S, quando comparada ao grupo submetido ao tratamento convencional com paclitaxel ou solução salina.

Outro estudo com melanomas em ratos utilizou doses maiores de FO-S, entre 50 a 100mg/kg, intraperitoneal, diariamente, por 15 dias observando ao final do tratamento retardo no crescimento do tumor implantado, redução de 47 a 60% do volume tumoral e aumento da sobrevivência dos animais tratados. A análise *in vitro* revelou redução significativa da proliferação celular, através da parada do ciclo celular na fase G2/M quando utilizadas doses menores de FO-S, e indução de apoptose, quando utilizadas doses maiores (FERREIRA et al, 2012a).

Nos felinos com SAF, a dose utilizada foi semelhante (70mg/kg), porém o uso da via endovenosa pode ter favorecido a absorção, mas também acelerado a metabolização e excreção do fosfolípide, diminuindo seus efeitos sob o tumor. A frequência de administração (a cada 7 dias) também pode ter levado a uma concentração da FO-S insuficiente para o combate das células tumorais. Apesar da forma de cápsulas não ter sido disponibilizada para esta pesquisa, a administração diária por via oral, da mesma forma como foi testada nos pacientes humanos em 2016, permitiria um período de tratamento prolongado e talvez, resultados mais favoráveis no SAF.

Na pesquisa com melanoma em ratos, embora os autores tenham obtido resposta satisfatória com uso da FO-S, é importante ressaltar que estudos *in vivo*, utilizando implantes de células tumorais, propicia o desenvolvimento de um microambiente neoplásico peculiar, cujas respostas terapêuticas podem diferir do tumor espontâneo. É provável que parte das células neoplásicas obtidas por cultura tenham expectativa de vida limitada devido a alterações genéticas e de diferenciação ou a senescência natural. Além disso, durante o processo de obtenção das células tumorais, pode haver diluição da cultura e da interação celular, comprometendo a sobrevivência do tumor, diferente do que ocorreria espontaneamente (CRUZ et al, 2009).

A taxa de recidiva nesta pesquisa foi de 24%, enquanto que outros autores apontam recorrência do SAF em 35 a 59% dos animais submetidos apenas ao tratamento cirúrgico (HERSHEY et al, 2000, MARTANO et al, 2005, PHELPS et al, 2011). Um dos fatores que pode ter contribuído para a menor taxa de recidiva foi a realização das intervenções em hospital de referência, por cirurgiões habituados à abordagem cirúrgica radical, garantindo margens limpas em todas as amostras tumorais do estudo. Entretanto ao comparar a taxa de recidiva com o grupo controle, submetido aos cuidados da mesma equipe de cirurgiões, observa-se que não houve diferença estatística entre os grupos que receberam a FO-S como tratamento adjuvante e neoadjuvante. Da mesma forma, a taxa de recidiva pode ser maior, visto que os animais foram acompanhados por somente 18 meses, período considerado curto frente as características recidivantes do SAF.

Metástases

A taxa de metástase pulmonar foi semelhante ao encontrado na literatura, correspondente a 28% dos felinos, podendo ser ainda maior, já que alguns vieram a óbito por doenças não relacionadas ao tumor, porém sem a realização de necropsia, o que torna difícil inferir se eventuais focos metastáticos não diagnosticados contribuíram para a piora da condição clínica, levando ao óbito ou eutanásia. Além disso, outros focos metastáticos podem não ter sido diagnosticados, visto que não foi realizado ultrassom abdominal de acompanhamento nos animais. De acordo com Phelps e colaboradores (2011), apesar dos pulmões serem os mais afetados, focos metastáticos de SAF podem acometer linfonodos regionais, pele, intestino, baço, epidural e olhos.

Em 2013, Ferreira e colaboradores avaliaram os efeitos da FO-S no combate a metástase de carcinoma de células renais em ratos, na dose de 40 a 80mg/kg/dia, por via intraperitoneal, por 15 dias, obtendo resultados bastante satisfatórios, com redução da incidência e do número de focos metastáticos pulmonares, quando comparados ao tratamento convencional com Sumatinib. Dentre os mecanismos da FO-S apontados, destacaram a ruptura dos filamentos de actina das células do carcinoma renal, além da diminuição da expressão dos receptores VEGFR1, reduzindo os efeitos do VEGF e por consequente, a neoangiogênese necessária a

disseminação tumoral (FERREIRA et al, 2013a).

Embora a dose utilizada no presente estudo seja semelhante à usada nos ratos, a via de administração da FO-S foi diferente, dificultando a comparação dos resultados obtidos. Enquanto a via intraperitoneal é rotineiramente aplicada nos animais de laboratório, nos felinos é pouco utilizada, como na analgesia transoperatória nas ovariectomias por exemplo (BENITO et al, 2018). A necessidade de contenção química do animal, associada ao risco de complicações como aderências e peritonite fazem com que não seja uma via de escolha para uso de medicamentos nesta espécie.

Análise histológica e imuno-histoquímica

Expressão de Ki-67

O presente estudo utilizou o anticorpo primário de rato contra Ki-67 humano (mouse monoclonal anti-human Ki-67, MIB-1 Dako ®), e embora haja apenas 50% de similaridade entre as sequências proteicas do Ki-67 felino e humano, o anticorpo revelou boa aplicabilidade nas reações imuno-histoquímicas, sendo largamente utilizado na caracterização do tipo e da graduação tumoral, acompanhamento de tratamento e determinação de prognóstico na espécie felina (SYSEL, et al, 2014).

Enquanto diversas neoplasias felinas já foram avaliadas quanto a marcação de Ki-67, principalmente as de glândulas mamárias, poucos estudos abordam sua expressão no SAF. Na presente pesquisa, a expressão de Ki-67 ocorreu em 35% das células tumorais, semelhante aos achados de Sysel e colaboradores (34%), embora estes autores tenham concluído o estudo com apenas três amostras de SAF (SYSEL et al, 2014). Já Couto e colaboradores observaram menor porcentagem de marcação (22%) e ausência de correlação com o grau histológico do tumor. Diferente destes autores, observou-se neste estudo que os tumores de grau I expressaram menos Ki-67 que os de grau II e III, o que pode ser justificado pelo menor índice de proliferação celular observado nos tumores de menor graduação histológica.

Porcellato e colaboradores também avaliaram amostras de SAF, obtendo 21,4% de expressão de Ki-67, sem correlação com sobrevida ou recidiva tumoral

(PORCELLATO et al, 2017). Corroborando com estes autores, não se observou correlação da expressão de Ki-67 com a sobrevida ($p=0,336$) nem recidiva tumoral ($p=0,820$).

Embora estudos não tenham detectado diferença significativa entre o índice de proliferação celular na periferia quando comparado a área central do SAF (COUTO et al, 2002), a heterogeneidade típica deste tumor pode influenciar a distribuição da expressão de Ki-67. As áreas cavitárias de necrose, associadas a progressiva transformação das células malignas podem fazer com que algumas regiões apresentem maior expressão de Ki-67, enquanto que em outras ela esteja ausente, comprometendo a correta avaliação proliferativa do tumor, dependendo da região analisada.

A mensuração da expressão de Ki-67 durante o tratamento contra o câncer também pode servir como acompanhamento da terapia. Estudo com neoplasias mamárias em mulheres verificou que uma diminuição de 3 pontos percentuais na expressão de Ki-67 (por exemplo, de 18 a 15%), após terapia neoadjuvante com tamoxifeno está associada a diminuição de 15% da taxa de recidiva e 18% da taxa de óbito (DeCENSI et al, 2011). Na veterinária, pouco se relata sobre a expressão de Ki-67 antes e depois do tratamento, sendo que alguns autores associam a elevada marcação prévia com boa resposta a radioterapia, ressaltando o fato de que tumores com altas taxas de proliferação seriam mais radio sensíveis (FU et al, 2016).

No presente estudo, um dos objetivos propostos foi avaliar os efeitos da FO-S na proliferação celular, ao comparar a marcação de Ki-67 nos SAF do G1 (tumores não submetidos a ação da FO-S) com os SAF do G2 (tumores submetidos a 4 sessões de FO-S). Diferente dos efeitos antiproliferativos observados por alguns autores com o uso da FO-S (FERREIRA et al, 2013a), a expressão permaneceu alta, demonstrando elevada atividade proliferativa mesmo após o tratamento com o fosfolípide antitumoral. Uma das limitações do estudo foi a comparação de Ki-67 entre amostras de SAF de diferentes indivíduos, com tamanhos e tempos de evolução diferentes. Na metodologia ideal, a comparação seria com o próprio tumor, através da realização de biópsia antes do início do tratamento com FO-S, eliminando as variáveis que pudessem influenciar os resultados.

Expressão de caspase-3

A expressão de caspase-3 nos SAF foi considerada discreta, com marcação em menos de 25% das células tumorais, não havendo correlação com grau histológico ($p=0,759$) ou sobrevida ($p=0,653$), achados semelhantes aos obtidos em estudos anteriores em carcinomas mamários felinos (SILVA et al, 2017).

Assim como no Ki-67, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos apoptóticos da FO-S comparando a expressão imuno-histoquímica de caspase-3 nos tumores antes do início do tratamento (G1) e depois (G2) do primeiro ciclo da medicação. Segundo O'Donovan e colaboradores, o aumento da expressão de caspase-3 após a terapia poderia indicar indução apoptótica, enquanto sua diminuição indicaria um importante mecanismo de sobrevivência celular em pacientes com neoplasia de mama (O'DONOVAN et al, 2003). Diferente dos resultados obtidos em publicações prévias com uso do fosfolípide antitumoral, a expressão foi ausente na maioria dos tumores submetidos ao fosfolípide antitumoral. Ferreira e colaboradores (2012b) avaliaram os efeitos da FO-S em camundongos com tumor ascítico de Ehrlich, observando aumento da atividade da caspase-3 e do número de células em apoptose, quando comparado ao grupo controle. Outros pesquisadores também relataram aumento expressivo da atividade da caspase-3 em células de melanoma da linhagem B16-F10 e de carcinoma de célula renal, quando submetidas a altas doses de FO-S (FERREIRA et al 2012a, FERREIRA et al, 2013a).

Nos estudos com melanoma *in vivo*, Ferrari e colaboradores (2011) observaram indução da atividade da caspase-3 em 45% e 62% das células submetidas a FO-S nas doses de 14mg/kg e 7mg/kg, respectivamente. Detectaram ainda maior marcação celular por anexina V (marcador de células apoptóticas) do que por iodeto de propídeo (marcador de células em necrose), sugerindo que a FO-S foi efetiva no controle tumoral através do mecanismo de apoptose. Os pesquisadores avaliaram ainda a expressão das proteínas anti-apoptótica Bcl-2 e pró-apoptótica Bad e Bax. O tratamento com ambas concentrações de FO-S não alterou as expressões de Bcl-2 e ainda induziu a regulação negativa das proteínas Bad e Bax, sugerindo que a FO-S induziu apoptose também por via independente do bloqueio de Bcl-2, nas células de melanoma.

Ferreira e colaboradores avaliaram os efeitos *in vitro* e *in vivo* da FO-S em

camundongos após implantação de células leucêmicas, nas doses que variaram entre 40 a 80mg/kg, diariamente, por via intraperitoneal, observando apoptose por alteração no potencial de membrana celular, liberação de fatores pró-apoptóticos pela mitocôndria e indução da caspase-3 (FERREIRA et al, 2013c). No presente trabalho, semelhante ao Ki-67, não houve alteração significativa na expressão imuno-histoquímica de caspase-3 nos tumores submetidos a FO-S, o que sugere que o índice de apoptose, assim como o de proliferação, não sofreu influência da medicação. Embora estudos comprovem que os fosfolípides antitumorais sejam capazes de induzir a morte celular em diversas linhagens de células tumorais, os efeitos terapêuticos em modelos animais ou ensaios clínicos como os realizados nesta pesquisa podem ser bem mais modestos por diversas razões, sendo uma delas o mecanismo de sobrevivência *in vivo*, provavelmente mais forte e eficaz que os efeitos pró-apoptóticos induzidos pelos fosfolípides *in vitro*. Da mesma forma, a dose, frequência e via de administração da medicação utilizados no SAF podem justificar os resultados diferentes aos observados pelos demais autores.

9. CONCLUSÕES

Nitrini, A.G.C., 2019

9. CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitem concluir que:

- A análise por meio da tomografia computadorizada mostrou-se importante para o planejamento cirúrgico
- O fosfolípido antitumoral FO-S mostrou-se seguro para utilização endovenosa em felinos com SAF
- A administração da FO-S na dose, frequência e via utilizadas mostrou-se ineficaz no aumento da sobrevida e intervalo livre de doença nos SAF estudados

REFERÊNCIAS

Nitrini, A.G.C., 2019

REFERÊNCIAS

A FOSFO FALHA NO TESTE. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n.254, p.14, abril 2017.

ABDELMAGEED, M.A., FOLTOPOULOU, P., MCNIEL, E.A. Feline vaccine-associated sarcomagenesis: Is there an inflammation-independent role for aluminium? **Veterinary and Comparative Oncology**. V.16, n.1, E130-E143, 2018.

AL-ASFOUR, S.V. Estudo de equilíbrios químicos com 2-aminoetanol-dihidrogenofosfato para fins biológicos. 2008, 97f. Tese – Programa de Pós-graduação em Química analítica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos.

ARORA, N.; MARTINS, D.; RUGGERIO, D.; TOUSIMIS, E.; SWISTEL, A. J.; OSBORNE, M. P.; SIMMONS, R. M. Effectiveness of a noninvasive digital infrared thermal imaging system in the detection of breast cancer. **The American Journal of Surgery**. V.196, n.4, p.523-526, 2008.

AWAPARA, J. Alanine and taurine formation from injected cysteine in the rat. **Nature**. V.14, n.4185, p.165-176, 1950.

BENDELL, J.C.; NEMUNAITIS, J., VUKELJA, S.J., HAGENSTAD, C., CAMPOS, L.T., HERMANN, R.C., SPORTELLI, P., GARDNER, L., RICHARDS, D.A. Randomized placebo- controlled phase II trial of perifosine plus capecitabine as second- or third-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**. V.29, n.33, p.4394–4400, 2011.

BENITO, J., MONTEIRO, B., BEAUDRY, F., & STEAGALL, P. Efficacy and pharmacokinetics of bupivacaine with epinephrine or dexmedetomidine after intraperitoneal administration in cats undergoing ovariohysterectomy. **Canadian Journal of Veterinary Research**. V.82, n.2, p.124-130, 2018.

BERGKVIST, G.T., ARGYLE, D.J., MORRISON, L., MACINTYRE, N., HAYES, A., YOOL, D.A. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and Ki67 in feline oral squamous cell carcinomas (FOSCC). **Veterinary and Comparative Oncology**, v.9, p.106-17, 2011.

BERZ, R.; SAUER, H. The Medical Use of Infrared-Thermography History and Recent Applications. **Thermografie-Kolloquium** 2007 - Vortrag 04.

BOWLT, K. Feline injection site-associated sarcomas. **In Practice**, V.37, p.2-11, 2015.

BRAY, J.; POLTON, G. Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy combined with anatomical resection of feline injection-site sarcoma: results in 21 cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, Epub. 7, 2014.

BREGAZZI, V. S.; LARUE, S. M.; MCNIEL, E.; MACY, D. W.; DERNELL, W. S.; POWERS, B. E.; WITHROW, S. J. Treatment a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine- associated sarcomas: 25 cases (1995-2000). **Journal of American Veterinary Medical Association**. V.218, n.4, p. 547-550, 2001.

BRIOSCHI, M. L.; MACEDO, J.F.; MACEDO, R. A. C. Termometria cutânea: novos conceitos. **Jornal Vascular Brasileiro**. V.2, n.2, p.151-160, 2003.

BURZ, C.; BERINDAN-NEAGOE, I.; BALACESCU, O.; IRIMIE, A. Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. **Acta Oncologica**, V.48, n.6, p.811-21, 2009.

CANTATORE, M., FERRARI, R., BORACCHI, P., GOBBETTI, M., TRAVETTI, O., RAVASIO, G., GIUDICE, C., DI GIANCAMILLO, M., GRIECO, V., STEFANELLO, D. Factors influencing wound healing complications after wide excision of injection site sarcomas of the trunk of cats. **Veterinary Surgery**. V. 43, n.7, p.783-90, 2014.

CARNEIRO, C.S. Caracterização dos pacientes portadores de sarcoma de aplicação felino quanto ao escore de condição corporal, à origem de sua formação e ao microambiente de seu desenvolvimento. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CARNEIRO, C.S., DE QUEIROZ, G.F., PINTO, A.C., DAGLI, M.L., MATERA, J.M. Feline injection site sarcoma: immunohistochemical characteristics. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. V.21, n.4, p:314-321, 2019.

CHEANG, M.C., CHIA, S.K., VODUC, D., GAO, D., LEUNG, S., SNIDER, J., WATSON, M., DAVIES, S., BERNARD, P.S., PARKER, J.S., PEROU, C.M., ELLIS, M.J., NIELSEN, T.O. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of National Cancer Institute**. V.101, n.10, p:736-50, 2009.

COUTO, C. G.; MACY, D. W. Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V.213, n.10, p.1426-7, 1998.

COUTO, S. S.; GRIFFEY, S. M.; DUARTE, P. C.; MADEWELL, R. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. **Veterinary Pathology**. V.39, n.1, p.33-41, 2002.

CRONIN K, PAGE RL, SPODNICK G, DODGE R, HARDIE EN, PRICE GS, RUSLANDER D, THRALL DE. Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats. **Veterinary Radiology and Ultrasound**. V.39, n.1, p.51-6, 1998.

CRUZ, M., ENES, M., PEREIRA, P., DOURADO, M., RIBEIRO, A.B. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. V.15, n.4, p.669-682, 2009.

DAVIS, K. M., HARDIE, E. M., LASCELLES, B. D., & HANSEN, B. Feline fibrosarcoma: perioperative management. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.29, n.12, p.712-4, (716-20, 722-9 passim), 2007.

DE CAMPOS, C.B., DAMASCENO, K.A., GAMBA, C.O., RIBEIRO, A.M., MACHADO, C.J., LAVALLE, G.E., CASSALI, G.D. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. V18, n.12, p.1003-1012, 2016.

DECENSI, A., GUERRIERI-GONZAGA, A., GANDINI, S., SERRANO, D., CAZZANIGA, M., MORA, S., JOHANSSON, H., LIEN, E.A., PRUNERI, G., VIALE, G., BONANNI, B. Prognostic significance of Ki-67 labeling index after short-term presurgical tamoxifen in women with ER-positive breast cancer. **Annals of Oncology**. V.22, N.3, p.582–587, 2011.

DIVELLA, R., DE LUCA, R., ABBATE, I., NAGLIERI, E., DANIELE, A. Obesity and cancer: the role of adipose tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation. **Journal of Cancer**. V.7, n.15, p:2346-2359, 2016.

DOLKA, I., KRÓL, M., SAPIERZYŃSKI, R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study. **Research in Veterinary Science**. V.105, p.124-33, 2016.

DUBIELZIG, R. R. Ocular sarcoma following trauma in three cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**. V.184, n.5, p.578-81, 1984.

DUMMER, R.; KRASOVEC, M.; RÖGER, J.; SINDERMAN, H.; BURG, G. Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study. **Journal of American Academy of Dermatology**. V.29, n.6, p.963-70, 1993.

ECKSTEIN, C.; GUSCETTI, F.; ROOS, M.; MARTÍN, D. E.; LAS MULAS, J.; KASER-HOTZ, B.; ROHRER BLEY, C. A. Retrospective analysis of radiation therapy for the treatment of feline vaccine-associated sarcoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, V.7, n.1, p.54-68, 2009.

FERRARI, R., DI GIANCAMILLO, M., STEFANELLO, D., GIUDICE, C., GRIECO, V., LONGO, M., RAVASIO, G., BORACCHI, P. Clinical and computed tomography tumour dimension assessments for planning wide excision of injection site sarcomas in cats: how strong is the agreement? **Veterinary and Comparative Oncology**, online version, doi: 10.1111/vco.12173, 2015.

FERREIRA, A. K.; FREITAS, V. M.; LEVY, D.; RUIZ, J. L.; BYDLOWSKI, S. P.; RICI, R. E.; FILHO, O. M.; CHIERICE, G. O.; MARIA, D. A. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine. **PLoS One**. V.8, n.3, p.e57937, 2013a.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; NETO, S. C.; CHIERICE, G. O.; MARIA, D. A. Synthetic Phosphoethanolamine Induces Apoptosis Through Caspase-3 Pathway by Decreasing Expression of Bax/Bad Protein and Changes Cell Cycle in Melanoma. **Journal of Cancer Science and Therapy**. V.3, n.1, p.53-59, 2011.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; PEREIRA, A.; FILHO, O. M. R. CHIERICE, G.O.; MARIA, D.A. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. V.67, n.6, p.481-7, 2013b.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; PEREIRA, A.; MENDONÇA, A.; FILHO, O. R.; CHIERICE, G. O.; MARIA, D. A. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. **Anticancer Research**. V.32, n.1, p.95–104, 2012b.

FERREIRA, A. K.; MENEGUELO, R.; MARQUES, F. L.; RADIN, A.; FILHO, O. M.; NETO, S. C.; CHIERICE, G. O.; MARIA, D. A. Synthetic phosphoethanolamine a precursor of membrane phospholipids reduce tumor growth in mice bearing melanoma B16-F10 and in vitro induce apoptosis and arrest in G2/M phase. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. V.66, n.1, p.541-548, 2012a.

FERREIRA, A. K., SANTANA-LEMOES, B. A., REGO, E. M., FILHO, O. M., CHIERICE, G. O., MARIA, D. A. Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. **British Journal of Cancer**. V.109, n.11, p.2819–2828, 2013c.

FOLSCH, G.; OSTERBERG, R. The apparent acid ionization constants of some O-phosphorylated peptides and related compounds. **The Journal of Biological Chemistry**. V.234, p.2298- 2303, 1959.

FU, D. R., KATO, D., ENDO, Y., & KADOSAWA, T. Apoptosis and Ki-67 as predictive factors for response to radiation therapy in feline nasal lymphomas. **The Journal of Veterinary Medical Science**. V.78, n.7, p.1161–1166, 2016.

GERMAN, A.J., RYAN, V.H., GERMAN, A.C., WOOD, I.S., TRAYHURN, P. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. **Veterinary Journal**. V.185, n.1, p.4-9, 2010.

GIBELLINI, F.; SMITH, T.K. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. **IUBMB Life**. V.62, n.6, p.414-28, 2010.

GOBAR, G. M.; KASS, P. H. World wide web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine- associated sarcomas in cats. **Journal of American Veterinary Association**. V.220, n.10, p.1477-82, 2002.

GRAF, R., GRÜNTZIG, K., BOO, G., HÄSSIG, M., AXHAUSEN, K.W., FABRIKANT, S., WELLE, M., MEIER, D., GUSCETTI, F., FOLKERS, G., OTTO, V., POSPISCHIL, A. Swiss Feline Cancer Registry 1965–2008: The Influence of Sex, Breed and Age on Tumour Types and Tumour Locations. **Journal of Comparative Pathology**. V.154, n.2–3, p.195-210, 2016.

GRAF, R., GUSCETTI, F., WELLE, M., MEIER, D., POSPISCHIL, A. Feline Injection Site Sarcomas: Data from Switzerland 2009-2014. **Journal of Comparative Pathology**. V.163, p.1-5, 2018.

GUILLARD, O., FAUCONNEAU, B., PINEAU, A., MARRAULD, A., BELLOCQ, J.P., CHENARD, M.P. Aluminium overload after 5 years in skin biopsy following post-vaccination with subcutaneous pseudolymphoma. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. V.26, n.4, p:291-3, 2012.

HARTMANN, K., DAY, M.J., THIRY, E., LLORET, A., FRYMUS, T., ADDIE, D., BOUCRAUT-BARALON, C., EGBERINK, H., GRUFFYDD-JONES, T., HORZINEK, M.C., HOSIE, M.J., LUTZ, H., MARSILIO, F., PENNISI, M.G., RADFORD, A.D., TRUYEN, U., MÖSTL, K. Feline injection-site sarcoma: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. V.17, n.7, p.606-13, 2015.

HENDRICK, M. J.; GOLDSCHMIDT, M. H. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? **Journal of American Veterinary Association**. V.199, n.8, p.968, 1991.

HENDRICK, M. J.; MAHATFEY, E.; MOORE, F.; VOS, J.; WALDER, E. Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. Washington: AFIP, 1998, v.2.

HENDRICK, M. J.; SHOFR, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HAVILAND, J. M. Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites in cats: 293 cases (1991-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V.205, n.10, p.1425-9, 1994.

HERSHEY, A. E.; DUBIELZIG, R. R.; PADILLA, M. L.; HELFAND, S. C. Aberrant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis. **Veterinary Pathology**. V.42, n.6, p.805-11, 2005.

HERSHEY, A. E.; SORENMO, K. U.; HENDRICK, M. J.; SHOFR, F. S.; VAIL, D. M. Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V.216, n.1, p.58-61, 2000.

HOLTERMANN, N., KIUPEL, M., HIRSCHBERGER, J. The tyrosine kinase inhibitor toceranib in feline injection site sarcoma: efficacy and side effects. **Veterinary and Comparative Oncology**, V.15, n.2, p:632-640, 2017.

HUANG, W.C.; CHEN, C.L.; LIN, Y.S.; LIN, C.F. Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy. **Journal of Lipids**, V.2011; ID565316, 2011.

JAS, D., SOYER, C., DE FORNEL-THIBAUD, P., OBERLI, F., VERNES, D., M. GUIGAL, P., POULET, H., DEVAUCHELLE, P. Adjuvant immunotherapy of feline injection-site sarcomas with the recombinant canarypox virus expressing feline interleukine-2 evaluated in a controlled monocentric clinical trial when used in association with surgery and brachytherapy. **Trials in Vaccinology**, V.4, p.1-8, 2015.

KAKU, Y; TSUCHIYA, A.; KANNO, T.; NAKANO, T.; NISHIZAKI, T. Dipalmitoleoyl-phosphatidylethanolamine induces apoptosis of NCI-H28 malignant mesothelioma cells. **Anticancer Research**. V.34, n.4, p.1759-66, 2014.

KASS HK., SPANGLER MI., HENDRICK MJ., MCGILL LD., ESPLIN DG., LESTER S, SLATER, M.; MEYER, E.K.; BOUCHER, F.; PETERS, E.M.; GOBAR, G.G.; HTOO, T.; DECILE, K. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**. V.223, n.9, p.1283-92, 2003.

KASS, P.H; BARNES, W. G.; SPANGLER, W.L.; CHOMEL, B.; CULBERTSON, M. R. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cat. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**. V.203, n.3, p.396-405, 1993.

KATAYAMA, R., HUELSMEYER, M.K., MARR, A.K., KURZMAN, I.D., THAMM, D.H., VAIL, D.M. Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. V.54, n.1, p.25-33, 2004.

KOBAYASHI, T.; HAUCK, M. L.; DODGE, R.; PAGE, R, L.; PRICE, G.S.; WILLIAMS, L. E.; HARDIE, E. M.; MATHEWS, K.G.; THRALL, D. E. Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. **Veterinary Radiology & Ultrasound**. V.43, n.5, p.473-9, 2002.

KUNTZ, C.A.; DERNELL, W.S.; POWERS, B.E.; DEVIT, T C.; STRAW, R.C.; WITHROW, S.J. Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue sarcomas in dogs: 75 cases (1986-1996). **Journal of American Veterinarian Medical Association**. V.211, n.9, p.1147-51, 1997.

LADLOW, J. Injection site-associated sarcoma in the cat - Treatment recommendations and results to date. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. V.15, n.5, p.409–18, 2013.

LAWRENCE, J., SABA, C., GOGAL, R., LAMBERTH, O., VANDENPLAS, M. L., HURLEY, D. J., DUBREUIL, P., HERMINE, O., DOBBIN, K. AND TUREK, M. Masitinib demonstrates anti-proliferative and pro-apoptotic activity in primary and metastatic feline injection-site sarcoma cells*. **Veterinary and Comparative Oncology**. V.10, n.2, p.143-54, 2011.

LIPTAK, J. M.; FORREST, L. J. Soft Tissue Sarcomas. In: WHITROW & MACEWEN'S. **Small Animal Clinical Oncology**. 4ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 425-54, 2007.

LIU, B., QU, L., & YAN, S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. **Cancer Cell International**. V.15, n.106, 2015.

LONGO, M., ZANI, D.D., FERRARI, R., BASSI, J., ANDREIS, M.E., STEFANELLO, D., GIUDICE, C., GRIECO, V., LIUTI, T., HANDEL, I., DI GIANCAMILLO, M. Dynamic tomographic studies of interscapular feline injection-site sarcoma: essential or useless practice? **Journal of Feline Medicine and Surgery**. V.20, n.6, p:502-508, 2017.

LOUGHIN, C.A., MARINO, D.J. Evaluation of thermographic imaging of the limbs of healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**. V. 68, n.10, p. 1064-9, 2007.

LUNA, A. C. de L., SARAIVA, G. K. V., FILHO, O. M. R., CHIERICE, G. O., NETO, S. C., CUCCOVIA, I. M., MARIA, D. A. Potential antitumor activity of novel DODAC/PHO-S liposomes. **International Journal of Nanomedicine**. V.11, p.1577-91, 2016.

MACHADO, L. F. S., DITTRICH, R. L., PAVELSKI, M., AFONSO, A. M. C. F., DECONTO, I., DORNBUSCH, P. T. Padronização do exame termográfico nas articulações do carpo e metacarpofalangeanas de cavalos em treinamento. **Archives of Veterinary**. V.18, n.4, p.40-45, 2013.

MADEWELL, B. R.; GRIFFEY, S. M.; McENTEE, M. C.; LEPPERT, V. J.; MUNN, J. R. Feline vaccine- associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999). **Veterinary Pathology**. V.38, n.2, p.196-202, 2001.

MAGI, G.E.; MARI, S.; RENZONI, G. ROSSI, G. Immunohistochemical expression of COX-2 in feline injection site sarcoma. **Journal of Comparative Pathology**, v.143, n.4, p.340, 2010.

MARTANO M, MORELLO E, IUSSICH S, BURACCO P. A case of feline injection-site sarcoma at the site of cisplatin injections. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. V.14, n.10, p-751-4, 2012.

MARTANO, M., MORELLO, E., UGHETTO, M., IUSSICH, S., PETTERINO, C., CASCIO, P., BURACCO, P. Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. **Veterinary Journal**. V.170, n.1, p.84-90, 2005.

MARTANO. M.; MORELLO. E., BURACCO. P. Feline injection-site sarcoma: Past, present and future perspectives. **The Veterinary Journal**. V.118, n.2, p.136-41, 2011.

McENTEE, M. C.; PAGE, R. L. Feline vaccine-associated sarcomas. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. V.15, n.3, p.176-82, 2001.

MELO, S.R.; MACEDO, T.R.; COGLIATI, B.; FERRIGNO, C.R.A.; MATERA, J.M. Thermographic assessment of canine mast cell tumours. **Indian Journal of Applied Research**. V.5, n.3, p. 47-51, 2015.

MENEGUELO, R. Efeitos antiproliferativos e apoptóticos da fosfoetanolamina sintética no melanoma B16F10, 2007. 133f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.

MIKULSKA, D. Contemporary applications of infrared imaging in medical diagnostics. **Annales Academiae Medicae Stetinensis**. V.52, n. 1, p. 35-9, 2006.

MILOSEVIC, M., JANKOVIC, D., PEULIC, A. Comparative analysis of breast cancer detection in mammograms and thermograms. **Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik**. V.60, n.1, p.49–56, 2014.

MIKULSKA, D. Contemporary applications of infrared imaging in medical diagnostics. **Annales Academiae Medicae Stetinensis**. V.52, n.1, p.35-9, 2006.

MOCANU, J.; MILITARU, M.; CIOBOTARU, E, IONASCU, I. Thermography aspects of feline fibrosarcoma complex. **Veterinary Dermatology**, v.15, supp.1, p. 41-69, 2004.

MOLLINEDO F., DE LA IGLESIA-VICENTE, J.; GAJATE, C.; ESTELLA-HERMOSO DE MENDOZA, A.; VILLA-PULGARIN, J.A.; CAMPANERO, M.A.; M.J. Blanco-Prieto, Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. **Oncogene**, v. 29, n.26, p.3748–3757, 2010.

MORRISON, W. B., STARR, R. M., VACCINE-ASSOCIATED FELINE SARCOMA TASK FORCE. Vaccine-associated feline sarcomas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V.218, n.5, p.697-702, 2001.

MÜLLER, N., KESSLER, M. Curative-intent radical en bloc resection using a minimum of a 3 cm margin in feline injection-site sarcomas: a retrospective analysis of 131 cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, V.20, n.6, p.509–519, 2018.

MURRAY, M.; HRAIKI, A.; BEBAWY, M.; PAZDERKA, C.; RAWLING, T. Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs. **Pharmacology and Therapeutics**. V.150, p.109-128, 2015.

NEMANIC, S., MILOVANCEV, M., TERRY, J.L., STIEGER-VANEGAS, S.M., LÖHR, C.V. Microscopic Evaluation of Peritumoral Lesions of Feline Injection Site Sarcomas Identified by Magnetic Resonance Imaging and Computed Tomography. **Veterinary Surgery**, V.45, n.3, p.392:401, 2016.

NETTO, C.G. Fosfoetanolamina, de `pílula do câncer` a caso de polícia. Jornal da Unicamp, São Paulo, 3 abril 2018. Disponível em: <https://www.unicamp.br/unicamp/ju/noticias/2018/04/03/fosfoetanolamina-de-pilula-do-cancer-caso-de-policia>. Acesso em: 13 abril 2019.

NIETO, A., SÁNCHEZ, M.A., MARTÍNEZ, E., ROLLÁN, E. Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor-alpha in feline vaccine-associated sarcomas. **Veterinary Pathology**. V.40, n.6, p.651-8, 2003.

O'DONOVAN, N., CROWN, J., STUNELL, H., HILL, A.D., MCDERMOTT, E., O'HIGGINS, N., DUFFY, M.J. Caspase 3 in breast cancer. **Clinical Cancer Research**. V.9, n.2, p.738-42, 2003.

OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Feline oncology: a comprehensive guide to compassionate care. New Jersey: Veterinary Learning Systems, 2001.

OUTHOUSE, E.L. Amino-ethyl phosphoric ester from tumours. **Biochemical Journal**. V.30, n.2, p:197-201, 1936

PAVELSKI, M.; SILVA, D.M.; LEITE, N.C.; JUNIOR, D.A.; DE SOUSA, R.S.; GUÉRIOS, S.D.; DORNBUSCH, P.T. Infrared Thermography in Dogs with Mammary Tumors and Healthy Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. V.29, n.6, p.1578-83, 2015.

PARISKY, Y.R., SARDI, A., HAMM, R., HUGHES, K., ESSERMAN, L., RUST, S., CALLAHAN, K. Efficacy of computerized infrared imaging analysis to evaluate mammographically suspicious lesions. **American Journal of Roentgenology**. V.180, n.1, p.263-269, 2003.

PHELPS, H.A., KUNTZ, C.A., MILNER, R.J., POWERS, B.E., BACON, N.J. Radical excision with five-centimeter margins for treatment of feline injection-site sarcomas: 91 cases (1998-2002). **Journal of American Veterinary Medical Association**. V. 239, n.1, p.97-106, 2011.

PIEGOLS, H. J., TAKADA, M., PARYS, M., DEXHEIMER, T., YUZBASIYAN-GURKAN, V. Investigation of novel chemotherapeutics for feline oral squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v.9, n.69, p.33098–33109, 2018.

PIVETTA, M. A prova final da fosfoetanolamina. **Pesquisa FAPESP**, n.243, p.16-23, 2016.

POIRIER, V. J.; THAMM, D. H.; KURZMAN, I. D.; JEGLUM, K. A.; CHUN, R.; OBRADOVICH, J. E.; O'BRIEN, M.; FRED III, R. M.; PHILLIPS, B. S.; VAIL, D. M. Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil®) e doxorubicin in treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. V.16, n.6, p.726-31, 2002.

POLJAK-BLAZI, M., KOLARIC, D., JAGANJAC, M., ZARKOVIC, K., SKALA, K., ZARKOVIC, N. Specific thermographic changes during Walker 256 carcinoma development: differential infrared imaging of tumour, inflammation and haematoma. **Cancer Detection and Prevention**. V.32, n.5-6, p.431-436, 2009.

PORCELLATO, I., MENCHETTI, L., BRACHELENTE, C., SFORNA, M., REGINATO, A., LEPRI, E., MECHELLI, L. Feline Injection-Site Sarcoma: Matrix Remodeling and Prognosis. **Veterinary Pathology**. Vol.54, n.2, p.204-211, 2017.

QUEIROGA, F.L.; MEDEIROS, H.; COSTA, J.; PRADA, J. LUIS, J.M.; PIRES, I. COX-2 immunoexpression is associated with the histological grade of malignancy in feline injection-site sarcomas. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.17, n.9, p.816-827, 2015.

RAMOS-VARA, J.A., BORST, L.B. Immunohistochemistry: Fundamentals and Applications in Oncology. In: Tumors in Domestic Animals, 5th Edition, Wiley-Blackwell. Meuten DJ (Editor). 2016.

REDAELLI, V., TANZI, B., LUZI, F., STEFANELLO, D., PROVERBIO, D., CROSTA, L., DI GIANCAMILLO, M. Use of thermographic imaging in clinical diagnosis of small animal: preliminary notes. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**. V.50, n.2, p.140-6, 2014.

ROMANELLI, G.; MARCONATO, L.; OLIVERO, D.; MASSARI, F.; ZINI, E. Analysis of prognostic factors associated with injection-site sarcomas in cats: 57 cases (2001–2007) **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Vol. 232, n.8, p.1193-1199, 2008.

RÍOS-MARCO, P.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J.M.; MARCO, C.; SEGOVIA, J.L.; CARRASCO, M.P. Antitumoral alkylphospholipids induce cholesterol efflux from the plasma membrane in HepG2 cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V.336, n.3, p.866-73, 2011.

ROBERTSON, S. A.; LASCELLES, D. Long-Term Pain in Cats: How Much Do We Know about This Important Welfare Issue? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.12, n. 3, pp:188-199, 2010.

ROSSI, F., MARCONATO, L., SABATTINI, S., CANCEDDA, S., LAGANGA, P., LEONE, VF., ROHRER BLEY, C. Comparison of definitive-intent finely fractionated and palliative-intent coarsely fractionated radiotherapy as adjuvant treatment of feline microscopic injection-site sarcoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. V.21, n.2, p.65-72, 2019.

SABATTINI, S., RENZI, A., ALBANESE, F., FANTINATI, M., RIGILLO, A., ABRAMO, F., TORNAGO, R., TORTORELLA, G., MASSARO, M., PAGANO, T.B., BUCHHOLZ, J., BETTINI, G. Evaluation of Ki-67 expression in feline non-ocular melanocytic tumours. **BMC Veterinary Research**. V.14, n.1, p.309, 2018.

SANTELICES IGLESIAS, O.A., WRIGHT, C., DUCHENE, A.G., RISSO, M.A., RISSO, P., ZANUZZI, C.N., NISHIDA, F., LAVID, A., CONFENTE, F., DÍAZ, M., PORTIANSKY, E.L., GIMENO, E.J., BARBEITO, C.G. Association between Degree of Anaplasia and Degree of Inflammation with the Expression of COX-2 in Feline Injection Site Sarcomas. **Journal of Comparative Pathology**, v.165, p.45-51, 2018.

SANZ-TOLÓN, A., VICENTE RUBIANO, M., BARNETO CARMONA, A., SÁNCHEZ- VIZCAÍNO RODRÍGUEZ, J. M. Diagnóstico de fibrosarcoma felino por imagen termográfica. **Revista Complutense de Ciencias Veterinárias**. V.2, n.2, p.134-140, 2008.

SÉGUIN, B. Feline injection site sarcomas. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. V. 32, n.4, p.983-985, 2002.

SHALINI, S., DORSTYN, L., DAWAR, S., KUMAR, S. Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death and Differentiation**. V.22, n.4, p.526-39, 2015.

SHAW, S.C., KENT, M.S., GORDON, I.K., COLLINS, C.J., GREASBY, T.A., BECKETT, L.A., HAMMOND, G.M., SKORUPSKI, K.A. Temporal changes in characteristics of injection-site sarcomas in cats: 392 cases (1990-2006). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.234, n.3, p.376:380, 2009.

SILVA, M.N., LEITE, J.S., MELLO, M.F., SILVA, K.V., CORGOZINHO, K.B., DE SOUZA, H.J., CUNHA, S.C., FERREIRA, A.M. Histologic evaluation of Ki-67 and cleaved caspase-3 expression in feline mammary carcinoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. V.19, n.4, p. 440-445, 2017.

SLOTH, C. Practical management of obesity in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**. V. 33, n.4, p:178–182, 1992.

SMITH, A.J., NJAA, B.L., LAMM, C.G. Immunohistochemical expression of c-KIT protein in feline soft tissue fibrosarcomas. **Veterinary Pathology**. V.46, n.5, p.934-9, 2009.

SOARES, M., RIBEIRO, R., CARVALHO, S., PELETEIRO, M., CORREIA, J., FERREIRA, F. Ki-67 as a Prognostic Factor in Feline Mammary Carcinoma: What Is the Optimal Cutoff Value? **Veterinary Pathology**. V.53, n.1, p.37-43, 2016.

SPRONG, H.; VAN DER SLUIS, P.; VAN MEER, G. How proteins move lipids and lipids move proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. V.2, n.7, p. 504–513, 2001.

SPUGNINI, E.P., BALDI, A., VINCENZI, B., BONGIORNI, F., BELLELLI, C., CITRO, G., PORRELLO, A. Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: a preliminary study in a spontaneous feline model. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. V.59, n.3, p. 375-81, 2007.

STACCHIOTTI, S., COLLINI, P., MESSINA, A., MOROSI, C., BARISELLA, M., BERTULLI, R., PIOVESAN, C., DILEO, P., TORRI, V., GRONCHI, A., CASALI, P. G. High-grade soft-tissue sarcomas: tumor response assessment--pilot study to assess the correlation between radiologic and pathologic response by using RECIST and Choi criteria. **Radiology**. V.251, n.2, p.447-56, 2009.

SYSEL, A.M., VALLI, V.E., BAUER, J.A. Immunohistochemical quantification of the cobalamin transport protein, cell surface receptor and Ki-67 in naturally occurring canine and feline malignant tumors and in adjacent normal tissues. **Oncotarget**. V.6, n.4, p-2331-48, 2014.

TEPPER, M; GANNOT, I. Monitoring tumor state from thermal images in animal and human models. **Medical Physics**. V.42, n.3, p.1297-306, 2015.

TERWOGT, J.M.; MANDJES, I.A.; SINDERMAN, H., BEIJNEN, J.H., TEN BOKKEL, HUININK. W.W. Phase II trial of topically applied miltefosine solution in patients with skin-metastasized breast cancer. **British Journal of Cancer**. V.79, n.7-8, p.1158-61, 1999.

TERZIAN, A., ZUCCARI, D., PEREIRA, R., PAVAM, M., RUIZ, C., SUEIRO, F., COELHO, J. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. V.44, n.2, p.96-102, 2007.

TRAVETTI, O., DI GIANCAMILLO, M., STEFANELLO, D., FERRARI, R., GIUDICE, C., GRIECO, V., SAUNDERS, J.H. Computed tomography characteristics of fibrosarcoma -- a histological subtype of feline injection-site sarcoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, V.15, n.6, p. 488-93, 2013.

VAN BLITTERSWIJK, W.J.; VERHEIJ, M. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. **Current Pharmaceutical Design**. V.14, n.21, p.2061-74, 2008.

VAN BLITTERSWIJK, W.J.; VERHEIJ, M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1831, n.3, p.663-74, 2013

VAN NIMWEGEN, S; KIRPENSTEIJN, J. Specific Disorders. In: TOBIAS, K. M., JOHNSTON, S. A. *Veterinary Surgery: Small Animal*. St. Louis: Elsevier/Saunders, 2012. p-1303-39.

VAN UMMERSEN, L., BINGER, K., VOLKMAN, J., MARNOCHA, R., TUTSCH, K., KOLESAR, J., ARZOOMANIAN, R., ALBERTI, D., WILDING, G. A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer. **Clinical Cancer Research**. V.10, n.22, p.7450-6, 2004.

VETERINARY COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP - Common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. **Veterinary and Comparative Oncology**. V.14, n.4, p.417-446, 2011.

VOGLER, W.R; SHOJI, M.; HAYZER, D.J.; XIE, X.P.; RENSHAW, M. The effect of edelfosine on CTP:cholinephosphate cytidylyltransferase activity in leukemic cell lines. **Leukemia Research**, V.20, n. 11-12, p.947-951, 1996.

VREUGDENBURG, T.D., WILLIS, C.D., MUNDY, L., HILLER, J.E. A systematic review of elastography, electrical impedance scanning, and digital infrared thermography for breast cancer screening and diagnosis. **Breast Cancer Research and Treatment**. V.137, n.3, p.665-676, 2013.

WEETH, L.P., FASCETTI, A.J., KASS, P.H., SUTER, S.E., SANTOS, A.M., DELANEY, S.J. Prevalence of obese dogs in a population of dogs with cancer. **American Journal of Veterinary Research**, V.68, p:389-398, 2007.

WEIGAND, C.M; BREWER, W. G. Vaccination-site sarcomas in cats. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. V.18, n.8, p.869-75, 1996.

WISHART, G. C., CAMPISI, M., BOSWELL, M., CHAPMAN, D., SHACKLETON, V., IDDLES, S., HALLETT, A., BRITTON, P.D. The accuracy of digital infrared imaging for breast cancer detection in women undergoing breast biopsy. **European Journal of Surgical Oncology**. V.36, n.6, p.535-40, 2010.

XIE, W.; McCahon, P.; Jakobsen, K.; Parish, C. Evaluation of the ability of digital infrared imaging to detect vascular changes in experimental animal tumours. **International Journal of Cancer**. V.108, n.5, p.790-794, 2004.

YAHARA, T., KOGA, T., YOSHIDA, S., NAKAGAWA, S., DEGUCHI, H., SHIROUZU, K. Relationship between microvessel density and thermographic hot areas in breast cancer. **Surgery Today**. V.33, n.4, p.243-8, 2003.

ZABIELSKA-KOCZYWAS, K., WOJTALEWICZ, A., LECHOWSKI, R. Current knowledge on feline injection-site sarcoma treatment. **Acta Veterinaria Scandinavica**. V.59, n.47, 2017

ZADEH, H.G., HADDADNIA, J., AHMADINEJAD, N., BAGHDADI, M.R. Assessing the Potential of Thermal Imaging in Recognition of Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. V.16, n.18, p.8619-23, 2015.

ZARDO, K.M., DAMIANI, L.P., MATERA, J.M., FONSECA-PINTO, A.C. Recurrent and non-recurrent feline injection-site sarcoma: computed tomographic and ultrasonographic findings. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. V.18, n.10, p.773-82, 2015.

ZARDO, K. M., DAMIANI, L. P., MATERA, J. M., FONSECA-PINTO, A. C. B.C. Feline injection site sarcoma: computed-tomographic density and assessment of tumor dimensions by different methods. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V.37, n.10, p.1113-1118, 2017.

ZOICO, E., DARRA, E., RIZZATTI, V., TEBON, M., FRANCESCHETTI, G., MAZZALI, G., ROSSI, A.P., FANTIN, F., ZAMBONI, M. Role of adipose tissue in melanoma cancer microenvironment and progression. **International Journal of Obesity**. V.42, n.3, p:344-352, 2018.

ANEXOS

Tabela 14. Descrição dos pacientes e seus respectivos dados clínicos

Felino	Prontuário	Grupo	Raça	Idade (anos)	Peso (kg)	Sexo	Progressão (meses)	Comp. (cm)	Larg. (cm)	Prof. (cm)	Localização	Malha de polipropileno	Deiscência	Subtipo histológico	Grau	KI-67 (%)	Caspase (Score)	Sobrevida (meses)	Recidiva (meses)	Metástase pulmonar	TA	nTA	TA FOS	nTA FOS
1	257234	1	SRD	10	5,7	M	1	7,5	6	4,2	abdome lateral esquerdo	S	S	Sarcoma pleomórfico	II	36,7	0	12	N	S	36,8	34,3	N.R.	N.R.
2	254839	1	SRD	10	2,5	F	8	7	7	3	abdome lateral direito	S	N	Fibrossarcoma	II	26,5	0	18	N	N	36,9	36	N.R.	N.R.
3	248837	1	SRD	9	3,4	F	1	1,7	1,6	1,4	abdome lateral esquerdo	N	N	Sarcoma pleomórfico	II	31,5	1	18	N	N	36	36,1	N.R.	N.R.
4	260928	1	SRD	8	4,4	F	3	3,5	2,9	1,3	abdome lateral esquerdo	S	N	Sarcoma histiocítico	II	33,2	1	18	N	N	34,9	34,9	N.R.	N.R.
5	243422	1	SRD	12	6,7	F	6	8	6,5	2	tórax lateral direita	N	N	Sarcoma pleomórfico	II	39,8	0	2	S (2)	N	38	37,8	N.R.	N.R.
6	247613	1	Siamês	4	4	F	3	4	4	3	tórax lateral esquerdo	N	N	Fibrossarcoma	III	39,8	2	12	S (7)	S	35,4	36	N.R.	N.R.
7	244513	1	SRD	13	3,3	F	1	1,5	2	1	abdome esquerdo	N	N	Sarcoma pleomórfico	I	13,4	2	7	N	N	35,8	34,2	N.R.	N.R.
8	262062	1	Ragdoll	8	6,3	M	5	7,6	7,4	4	tórax lateral direito	N	N	Rabdomiossarcoma	II	57,8	1	0,1	N	N	36,4	33,3	N.R.	N.R.
9	263827	1	Siamês	16	3,7	F	6	4,5	3,8	2	abdome lateral direito	S	N	Fibrossarcoma	III	49,4	1	6	N	N	36,5	35,8	N.R.	N.R.
10	246840	1	SRD	7	7,3	F	2	3	2	2	abdome dorsal esquerda	S	S	Fibrossarcoma	III	39,5	1	13	S (8)	N	35,6	33,8	N.R.	N.R.
11	262114	1	SRD	4	4,6	F	0,5	1,5	1,4	0,5	abdome lateral direito	N	N	Sarcoma pleomórfico	I	22,8	0	18	N	N	32,1	31,9	N.R.	N.R.
12	257110	2	SRD	9	4,4	F	3	4,7	4,9	3	abdome lateral esquerdo	S	S	Fibrossarcoma	II	36,6	1	18	S (18)	S	35,7	35,8	35,3	35,8
13	263063	2	Siamês	5	5,4	M	2	8,6	8,2	3	abdome lateral	S	N	Fibrossarcoma	II	49,4	0	6	N	S	38,4	36	36,3	34,2
14	246392	2	SRD	4	3,7	F	12	6	6	4	abdome dorsal esquerdo	N	S	Fibrossarcoma	III	38,9	0	18	N	N	35,2	37	31,9	35,8
15	259023	2	SRD	15	4	F	6	4,6	2,2	1,2	abdome dorsal	S	S	Sarcoma pleomórfico	II	34,4	0	0,37	N	N	34,2	33,9	35,5	34,1
16	260791	2	Siamês	5	4,1	F	3	4,5	3,8	1,7	abdome dorsal	N	N	Fibrossarcoma	III	40,7	0	18	N	N	33,2	33,8	34,5	35,3
17	263380	2	SRD	7	5,9	F	6	9,5	7,8	6	abdome lateral	S	N	Fibrossarcoma	III	33,4	1	0,1	N	N	37,3	36	36	32,9
18	253975	2	SRD	14	3,6	F	12	6,5	4	1,7	tórax lateral esquerdo	S	N	Sarcoma pleomórfico	II	41,6	1	18	N	S	33,6	35,2	34,7	35,4
19	260291	2	SRD	16	4,4	F	24	1,5	1,1	1,1	abdome dorsal esquerdo	S	S	Fibrossarcoma	II	55,1	0	4	N	N	32,4	32,5	31,9	33
20	244172	2	SRD	5	7,4	M	5	5	2,5	2	abdome dorsal	N	S	Sarcoma histiocítico	III	34	0	7	S (5)	S	37	37,8	35,8	36
21	258977	2	SRD	10	5,7	M	1	3	3	1	abdome direito	N	S	Fibrossarcoma	II	38,1	2	18	N	N	37,2	35,2	37,6	36,4
controle	179260	0	SRD	11	5,3	M	3	5,5	2,6	1,6	abdome lateral esquerdo	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	20	S (7)	N	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
controle	176991	0	SRD	10	4,8	M	4	3,2	1,5	1,3	abdome lateral esquerdo	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	36	N	N	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
controle	157869	0	SRD	5	5,6	M	6	2	2	2	cervical lateral esquerdo	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	8	S (7)	N	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
controle	218492	0	Siamês	14	4,5	F	1	2,5	3	2	tórax direito	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	18	S (18)	S	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
controle	238398	0	SRD	7	4	F	3	3	2	2	abdome esquerdo	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	8	S (8)	N	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
controle	228210	0	SRD	5	4	F	1	4	3	2	membros - tíbio-társica	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	12	N	S	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
controle	205558	0	SRD	9	4,7	F	2	2	2	2	abdome dorsal	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	72	N	N	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
controle	223550	0	SRD	3	4,5	F	1	8	4	2	cervical dorsal	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	12	S (12)	N	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
controle	205387	0	SRD	15	5,8	M	4	5	2	2	abdome lateral esquerdo	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	8	S (6)	N	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
controle	200785	0	SRD	11	5,5	F	2	2	2	2	membro proximal	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	48	N	N	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
controle	174732	0	SRD	8	5,5	M	1	8	4	3	membro proximal	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	9	N	N	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
controle	201626	0	SRD	8	3,9	F	6	9	4,2	4,8	abdome	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	12	S (12)	N	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
controle	217039	0	SRD	7	5,6	F	5	7,7	3,8	6	tórax esquerdo	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	12	N	N	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.

Legenda: SRD: sem raça definida. M: macho. F: fêmea. Comp.: comprimento. Larg: largura. Prof.: profundidade. S: sim. N: não. TA (tumor-area): temperatura da área tumoral. nTA (non tumor-area): temperatura da área distante do tumor. TA FOS: temperatura da área tumoral após tratamento com FO-S. nTA FO-S: temperatura da área distante do tumor após tratamento com FO-S. D.I.: dados indisponíveis.