PATRÍCIA FERREIRA DE CASTRO

Sarcoma de tecidos moles em cães: tratamento cirúrgico associado à terapia com fosfoetanolamina sintética (FO-S)

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

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientadora:
Profa. Dra. 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. 3801
FMVZ

Castro, Patrícia Ferreira de
Sarcoma de tecidos moles em cães: tratamento cirúrgico associado à terapia com fosfoetanolamina sintética (FO-S) / Patrícia Ferreira de Castro. – 2019.
100 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.

Orientadora: Profa. Dra. Julia Maria Matera.

1. Tumor. 2. Neoplasia mesenquimal. 3. Canino. 4. Termografia. 5. Fosfolípido antineoplásico.. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Sarcoma de tecidos moles em cães. 1. Tratamento cirúrgico associado à terapia adjuvante com fosfolípido antineoplásico fosfoetanolamina sintética (FO-S). 2. Análise termográfica, histopatológica e imunoistoquímica dos tumores para o prognóstico clínico do paciente. ", protocolado sob o CEUA nº 3495130715, sob a responsabilidade de **Julia Maria Matera e equipe; Patrícia Ferreira de Castro** - 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) - encontra-se 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, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) em reunião de 28/10/2015.

We certify that the proposal "Soft tissue sarcoma in dogs. 1. Surgical treatment associated with adjuvant therapy with antineoplastic phospholipid synthetic phosphoethanolamine (PHO-S). 2. Thermographic, histopathological and immunohistochemical analysis of tumors to the patient's clinical prognosis. ", utilizing 20 Dogs (20 males), protocol number CEUA 3495130715, under the responsibility of **Julia Maria Matera and team; Patrícia Ferreira de Castro** - 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) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, 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 of São Paulo University (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/28/2015.

Vigência da Proposta: de 08/2015 a 07/2017

Área: Departamento De Cirurgia

Procedência: Cães da rotina de atendimento do HOVET-FMVZ/USP

Espécie: Cão

Gênero: Machos

idade: não se aplica N: 20

Linhagem: não se aplica

Peso: não se aplica

São Paulo, 15 de dezembro de 2015

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CASTRO, Patrícia Ferreira de

Título: Sarcoma de tecidos moles em cães: tratamento cirúrgico associado à terapia com fosfoetanolamina sintética (FO-S)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a 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: _____

Ao meu filho **Luca**,
por existir, rir e me abraçar todos os dias.

“Luca lux vitae meae”

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela vida, por iluminar meu caminho e por mais esta conquista.

Aos meus **pais**, por tudo. Vocês são meu exemplo de verdadeiro amor e dedicação.

Ao meu esposo **Patrizio**, à minha “irmãzinha” **Juliana** e ao meu cunhado **Rodrigo** por terem me ajudado a cuidar da melhor parte de mim, meu filho **Luca**.

À Prof. Dra., “chefa”, orientadora e amiga **Julia Maria Matera**, pela contribuição em minha formação acadêmica, profissional e pessoal; exemplo de competência, ética, amor e dedicação aos animais e àqueles que os amam. A sua confiança e torcida fazem toda a diferença.

Aos docentes **Prof. Dra. Ana Carolina B. C. Fonseca Pinto**, **Prof. Dr. Bruno Cogliati** e **Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria**, que colaboraram e enriqueceram esta pesquisa.

Às amigas e médicas veterinárias **Andressa Gianotti Campos Nitrini**, **Ayne Murata Hayashi**, **Geni Cristina Patrício** e **Patrícia Bonifácio Flor**, pelo aprendizado, carinho e parceria diária.

Aos enfermeiros do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET-FMVZ/USP **Cledson Lelis dos Santos**, **Jesus dos Anjos Vieira** e **Otávio Rodrigues dos Santos**, pela disposição, eficiência e companheirismo.

A todos os residentes, aprimorandos e estagiários que passaram pelo **Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais** do HOVET-FMVZ/USP, que ajudaram com os casos clínico-cirúrgicos e pós-operatórios.

À querida colega da 55, médica veterinária **Maria Luísa Franchini** pelo primor nas análises citológicas.

A todos os colegas da pós-graduação pelo convívio, carinho e muitas risadas, mas principalmente ao **Andrés Sebastian Aristizabal Escobar**, **Igor de Almeida Santos** e **Mario Antonio Ferraro Rego**, que ajudaram diretamente na conclusão deste projeto.

Aos secretários do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP **Belarmine Ney Pereira** e **Livia dos Santos Gimenes** pelo auxílio e dedicação constantes.

Aos funcionários da **Biblioteca Virgine Buff D'Ápice** da FMVZ/USP pela gentileza e disposição durante a fase de elaboração deste trabalho.

A todos os funcionários do **HOVET-FMVZ/USP** pelo auxílio diário e à **Faculdade de Medicina Veterinária da USP** por ser a minha segunda casa desde a graduação.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

À amiga **Marluce Saez**, pela prontidão em ajudar sempre.

À amiga canina **Margot** por alegrar a minha vida e despertar sentimentos bons.

Aos meus **pacientes** e aos seus **tutores**.

“Seja grato, sonhe alto, ria muito”

(Autoria desconhecida)

RESUMO

CASTRO, P. F. **Sarcoma de tecidos moles em cães: tratamento cirúrgico associado à terapia com fosfoetanolamina sintética (FO-S).** [Soft tissue sarcoma in dogs: surgical treatment associated with synthetic phosphoethanolamine (PHO-S) therapy] 2019. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A fosfoetanolamina sintética (FO-S) é um antineoplásico que causa morte celular por modificação da membrana citoplasmática. Diversos estudos têm demonstrado seu potencial em induzir citotoxicidade em células de diferentes linhagens de tumores, sem afetar a capacidade proliferativa das células normais. Este estudo avaliou a resposta ao tratamento com a FO-S como terapia adjuvante (G1) e neoadjuvante/adjuvante (G2) associada à exérese tumoral ampla em cães portadores de sarcoma de tecidos moles (STM), investigando sua ação antitumoral; intervalo livre de recidiva local (ILRL) e sobrevida; e ocorrência de efeitos adversos. Foram considerados 21 cães com diagnóstico histopatológico de STM que não apresentavam comorbidades graves e/ou metástases, atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET-FMVZ/USP, no período de agosto de 2015 a julho de 2017. O tratamento incluiu a administração intravenosa semanal da FO-S (70 mg/kg) por quatro sessões, com início após a realização da exérese tumoral para o grupo G1 (n=10) ou quatro sessões antes e quatro após a realização da exérese tumoral para o grupo G2 (n=11). Nenhum caso de remissão completa ou parcial foi observado pelas mensurações tumorais realizadas em imagens de tomografia computadorizada obtidas pré e pós terapia neoadjuvante com a FO-S (G2: n=9/11), segundo os três critérios adotados (RECIST, WHO e volumétrico). Pela análise das imagens termográficas (G2: n=10/11) para cálculo da diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral (AT-ANT) constatou-se que o “tumor esfriou em relação ao tecido corpóreo” durante a terapia neoadjuvante ($p=0,01416$). A comparação dos valores obtidos pela técnica de imuno-histoquímica (n=19/21) entre os tumores ressecados não tratados (G1) e os tratados com FO-S (G2) não mostrou diferença significativa entre os grupos em relação a grau de apoptose (caspase-3) segundo o grau tumoral I ($p=0,3663$) e II ($p=0,4543$), e nem em relação ao índice de proliferação celular (Ki67) segundo o grau tumoral I ($p=0,6588$) e II ($p=0,179$). Não foi possível

realizar a comparação para o STM grau III. Não houve recidiva tumoral local (RTL) para o grupo G1; apenas um animal (G2) apresentou recidiva aos 365 dias de acompanhamento e não foi possível calcular a mediana para ILRL. Não houve diferença significativa entre os grupos G1 e G2 em relação à sobrevida ($p= 0,21$). Considerado todos os pacientes que receberam a FO-S, a taxa de sobrevida aos 12, 24 e 36 meses foi respectivamente 100%, 87,5% e 72,9%, e o período de acompanhamento variou de 365 a 1169 dias (mediana= 687 dias). A FO-S na dose e posologia empregadas neste estudo não demonstrou efeito citorredutor e não houve diferença significativa para marcação de caspase-3 e Ki67 entre tumores tratados e não tratados, porém a redução significativa da temperatura cutânea da área tumoral em relação a área não tumoral sugere a possibilidade de uma “mudança fisiológica” associada ao seu uso. As taxas de RTL e sobrevida equipararam-se às de cães tratados apenas com ressecção cirúrgica ampla citadas em literatura. A FO-S não causou efeitos adversos e mostrou-se segura para administração intravenosa em cães com STM.

Palavras-chave: Tumor. Neoplasia mesenquimal. Canino. Termografia. Fosfolípideo antineoplásico.

ABSTRACT

CASTRO, P. F. **Soft tissue sarcoma in dogs: surgical treatment associated with synthetic phosphoethanolamine (PHO-S) therapy.** [Sarcoma de tecidos moles em cães: tratamento cirúrgico associado à terapia com fosfoetanolamina sintética (FO-S)] 2019. 100 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Synthetic phosphoethanolamine (PHO-S) is an antineoplastic drug that leads to cell death by modifying the cytoplasmic membrane. Several studies have demonstrated its potential to induce cytotoxicity in different tumor lines without affecting the proliferative capacity of normal cells. The present study evaluated the response of dogs with soft tissue sarcoma (STS) treated with PHO-S as either adjuvant (group 1 - G1) or neoadjuvant/adjuvant (group 2 - G2) therapy to extensive tumor excision in order to investigate its antitumor activity; recurrence-free interval (RFI) and survival; and adverse effects. Twenty-one dogs with histopathological diagnosis of STS that did not present severe comorbidities and/or metastases, admitted in the Small Animal Surgery Service of the Veterinary Teaching Hospital of the University of São Paulo (HOVET-FMVZ/USP) from August 2015 to July 2017 were included in this study. The treatment consisted of four weekly sessions of PHO-S intravenous administration (70 mg/kg) after tumor surgical excision in G1 (n = 10) or four sessions before and four after performing tumor excision in G2 (n = 11). No cases of complete or partial remission were observed according to the tumor measurements (RECIST, WHO and volumetric criteria) performed with computed tomography images obtained before and after neoadjuvant therapy with PHO-S (G2: n = 9/11). In the analysis of thermographic images (G2: n = 10/11) used to calculate the difference between cutaneous temperatures in tumor and non-tumor areas (TA-NTA), it was found that the tumor became "cooler" compared to the rest of the body along neoadjuvant therapy ($p = 0.01416$). The immunohistochemistry (n = 19/21) comparison between untreated (G1) and PHO-S (G2) treated tumors showed no significant difference between groups regarding degree of apoptosis according to tumor grade I ($p = 0.363$) and II ($p = 0.4543$), and neither regarding cell proliferation index (Ki67) according to tumor grade I ($p = 0.6588$) and II ($p = 0.179$). It was not possible to perform such comparison between groups for grade III STS. There were no local tumor recurrences (LTR) in G1;

a single dog (G2) showed recurrence at 365 days of follow-up, thus it was not possible to obtain the RFI median value. There were no significant differences between G1 and G2 regarding survival ($p = 0.21$). The survival rates at months 12, 24 and 36 were 100%, 87.5% and 72.9%, respectively, and the follow-up period ranged from 365 to 1169 days (median = 687 days). The use of PHO-S at this dose did not show a cytoreductive effect and there were no significant differences in caspase-3 and Ki67 markers analyses between treated (G2) and untreated (G1) tumors in this study, however the significant difference in cutaneous temperature between tumor and non-tumor areas suggests the possibility of a "physiological change" associated with its use. LTR and survival rates were like those of dogs treated with only extensive surgical resection cited in the literature. PHO-S did not cause any adverse effects and was safe for use in dogs with STS.

Keywords: Tumor. Mesenchymal neoplasia. Canine. Thermography. Antineoplastic phospholipid.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados epidemiológicos e características tumorais dos sarcomas de tecidos moles dos 21 cães considerados no estudo, São Paulo, 2019	53
Tabela 2 -	Identificação do paciente, grau de classificação histopatológica do sarcoma de tecidos moles, valores obtidos pelas mensurações realizadas nas imagens de tomografia computadorizada, percentual de aumento tumoral e sua classificação segundo as diretrizes RECIST, WHO e VOL, para o grupo que recebeu a FO-S como terapia neoadjuvante (G2), São Paulo, 2019	55
Tabela 3 -	Valores médios e desvios padrão da diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) durante terapia neoadjuvante com a FO-S para o grupo G2, São Paulo, 2019	57
Tabela 4 -	Valores de mediana e intervalo interquartil da caspase-3 para os grupos dos tumores ressecados não tratados com FO-S (G1) e tratados com FO-S (G2), segundo o grau tumoral, São Paulo, 2019	61
Tabela 5 -	Valores de média e desvio padrão do Ki67 para os grupos dos tumores ressecados não tratados com FO-S (G1) e tratados com FO-S (G2), segundo o grau tumoral, São Paulo, 2019	62
Tabela 6 –	Pacientes excluídos das análises de intervalo livre de recidiva local e sobrevida, São Paulo, 2019	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Comportamento individual da diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) durante terapia neoadjuvante com a FO-S para os pacientes do grupo G2	56
Gráfico 2 –	Valores médios e desvios-padrão da diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) durante terapia neoadjuvante com a FO-S para o grupo G2	57
Gráfico 3 –	Boxplot dos valores da diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) durante terapia neoadjuvante com a FO-S para o grupo G2	57
Gráfico 4 –	Valores médios da diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) e o volume tumoral para os tempos T_0 e T_3 , para o grupo G2, que recebeu terapia neoadjuvante com FO-S	59
Gráfico 5 –	Curva de correlação entre volume e a temperatura dos tumores do grupo G2, que recebeu terapia neoadjuvante com FO-S	59
Gráfico 6 -	Boxplot da caspase-3 para os grupos dos tumores ressecados não tratados com FO-S (G1) e tratados com FO-S (G2) segundo o grau tumoral	61
Gráfico 7 -	Boxplot do Ki67 para os grupos dos tumores ressecados não tratados com FO-S (G1) e tratados com FO-S (G2) segundo o grau tumoral	62
Gráfico 8 -	Curva de Kaplan-Meier para proporção de pacientes sem RTL para cada um dos grupos (G1 e G2)	65
Gráfico 9 –	Curva de Kaplan-Meier para proporção de pacientes sem RTL para ambos os grupos (G1 + G2)	66
Gráfico 10 -	Curva de Kaplan-Meier para taxa de sobrevida para cada um dos grupos (G1 e G2)	67
Gráfico 11 -	Curva de Kaplan-Meier para taxa de sobrevida para ambos os grupos (G1 + G2)	68

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Imagens de tomografia computadorizada em corte transversal do STM grau II localizado em região glútea direita do cão ID6, pré tratamento (T ₀) e após o término da terapia neoadjuvante com FO-S (T ₄)	54
Figura 2 -	Imagens termográficas que mostram área tumoral (AT) e área não tumoral adjacente (ANT) em membro pélvico do cão ID4, pré tratamento (T ₀) e durante a terapia neoadjuvante com FO-S (T ₁₋₄)	58
Figura 3 -	Fotomicrografias representativas das reações de imuno-histoquímica para o STM grau II em cães	63
Quadro 1 -	Escala padronizada para determinação do grau do tumor	43
Quadro 2 -	Classificação e graduação de eventos adversos	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	alanina transaminase
ANT	área não tumoral
AT	área tumoral
B16F10	melanoma murino
EA	efeitos adversos
EAT	tumor ascítico de Ehrlich
DE	doença estável
DP	doença progressiva
FA	fosfatase alcalina
FO	fosfoetanolamina
FO-S	fosfoetanolamina sintética
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
G1	grupo 1
G2	grupo 2
HOVET	Hospital Veterinário
HP	histopatológico
IC	intervenção cirúrgica
IHQ	imuno-histoquímica
ILD	intervalo livre de doença
ILRL	intervalo livre de recidiva local
IV	via intravenosa
MCF-7	adenocarcinoma de mama humana
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PNT	ponto externo próximo à formação e não tumoral
PT	ponto central da formação tumoral
RC	resposta completa
RECIST	Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos
Renca	carcinoma renal murino
RP	resposta parcial
RTL	recidiva tumoral local
SOC	<i>Standard of Care</i>

STM	sarcomas de tecidos moles
TC	tomografia computadorizada
TE	termografia
VCOG-CTCAE	Critérios Terminológicos Comuns para Eventos Adversos após quimioterapia ou terapia antineoplásica biológica em cães e gatos do <i>Veterinary Cooperative Oncology Group</i>
VO	via oral
VOL	Critério Volumétrico
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	SARCOMAS DE TECIDOS MOLES EM CÃES	23
2.1.1	Tratamento	25
2.2	FOSFOLÍPÍDEOS ANTINEOPLÁSICOS	26
2.2.1	Fosfoetanolamina sintética (FO-S).....	27
2.3	MARCADORES TUMORAIS	30
2.4	TERMOGRAFIA	31
3	OBJETIVOS	36
4	MATERIAL E MÉTODO	38
4.1	ANIMAIS	38
4.1.1	Critérios de inclusão	38
4.1.2	Critérios de exclusão.....	38
4.2	DESENHO DO ESTUDO E INTERVENÇÕES	39
4.2.1	Tratamento	39
4.2.2	Exame tomográfico.....	40
4.2.3	Exame termográfico	41
4.2.4	Acompanhamento.....	41
4.2.5	Exame histopatológico.....	42
4.2.6	Imuno-histoquímica.....	43
4.3	CRITÉRIOS PARA RESPOSTA TUMORAL.....	45
4.4	CRITÉRIOS PARA INTERVALO LIVRE DE RECIDIVA LOCAL E SOBREVIVÊNCIA	46
4.5	CRITÉRIOS PARA EFEITOS ADVERSOS	47
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49

5	RESULTADOS	51
5.1	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES E DOS TUMORES	51
5.2	RESPOSTA TUMORAL AO TRATAMENTO COM A FO-S	54
5.2.1	Exames tomográficos.....	54
5.2.3	Exames termográficos	56
5.2.4	Relação entre as variáveis volume e temperatura	58
5.2.5	Imuno-histoquímica.....	60
5.3	INTERVALO LIVRE DE RECIDIVA LOCAL E SOBREVIDA	64
5.3.1	Intervalo livre de recidiva local.....	65
5.3.2	Sobrevida	67
5.4	EFEITOS ADVERSOS DA FO-S	69
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICES	96

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A procura pelo atendimento na área da oncologia veterinária apresentou um aumento expressivo nos últimos anos, o que tem despertado um maior interesse por parte dos pesquisadores na busca por novos métodos terapêuticos. Diferentes drogas e modalidades de tratamento vem sendo desenvolvidas continuamente para uso em medicina humana, sendo aplicadas também em animais de companhia.

A fosfoetanolamina sintética (FO-S) sintetizada pelo grupo de Química Analítica da USP - São Carlos é um fosfolípido antitumoral que atua de maneira diferente dos quimioterápicos convencionais, causando morte celular por modificação da membrana citoplasmática e não do DNA celular. Estudos conduzidos pelo grupo do Instituto Butantan, têm demonstrado que a FO-S apresenta grande potencial para induzir citotoxicidade em células de diferentes linhagens de tumores, sem afetar a capacidade proliferativa das células normais (MENEGUELO, 2007; FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012a; FERREIRA et al., 2012b; FERREIRA et al., 2013a; FERREIRA et al., 2013b; LUNA et al., 2014). Os estudos *in vivo* deste grupo de pesquisadores, realizados em modelos tumorais experimentais em animais de laboratório, reafirmam estes achados (FERREIRA et al., 2011; VERONEZ, 2012).

É fato que a pesquisa científica sobre determinada intervenção terapêutica para um tipo de câncer de ocorrência espontânea nas espécies animal e humana, conduzida em qualquer uma delas, favorece a extrapolação dos resultados obtidos para a outra espécie, se consideradas as particularidades individuais de cada uma, além de reproduzir naturalmente o microambiente tumoral por não se tratar de tumor experimentalmente induzido. Dentro deste contexto, diante do interesse da comunidade científica relacionado ao uso da FO-S como agente antineoplásico e associado ao fato dos sarcomas de tecidos moles (STM) ocorrerem tanto em seres humanos quanto em animais (EHRHART, 2005), propôs-se neste estudo clínico avaliar a resposta ao tratamento com este fosfolípido, associado à ressecção cirúrgica tumoral ampla em cães com STM espontâneo, e assim contribuir na investigação da aplicabilidade da FO-S como agente anticancerígeno adjuvante e neoadjuvante na medicina veterinária e humana.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SARCOMAS DE TECIDOS MOLES EM CÃES

Os STM são um grupo de diferentes tipos de tumores de origem mesenquimal com características histológicas e comportamento biológico semelhantes (DERNELL et al., 1998; EHRHART, 2005; DENNIS et al., 2011). São classicamente descritos como massas pseudoencapsuladas com margens mal definidas (DERNELL et al., 1998) e caracterizados por apresentarem índices altos de recidiva local em comparação ao potencial metastático baixo (LIPTAK; FORREST, 2007) a moderado (THRALL; GILLETTE, 1995; MAULDIN, 1997; MACEWEN; POWERS; MACY, 2001). Podem surgir de muitos tecidos conjuntivos não ósseos, diferem na aparência histológica em diferentes graus e recebem o nome do tecido mesenquimal a partir do qual se presume que tenham surgido (EHRHART, 2005).

Nem todos os tumores não ósseos com o sufixo "sarcoma" estão incluídos no grupo dos STM (EHRHART, 2005), que comumente incluem: hemangiopericitoma (recentemente reclassificado como tumores de parede perivascular), fibrossarcoma e tumores de bainha de nervo periférico. Hemangiossarcoma e sarcoma histiocítico, por exemplo, são excluídos do grupo dos STM devido ao seu comportamento biológico ser mais agressivo que os demais tumores do grupo e por sua célula de origem ser hematopoiética. A seguir a classificação dos STM frequentemente encontrada na literatura (HOHENHAUS et al., 2016):

- Tipicamente incluído no grupo de STM: fibrossarcoma, mixossarcoma, tumor da bainha de nervo periférico, tumor de parede perivascular (hemangiopericitoma);
- Normalmente excluídos do grupo de STM: sarcoma histiocítico, hemangiossarcoma, melanoma maligno, sarcoma oral;
- Variável em toda a literatura: rabdomiossarcoma, lipossarcoma, leiomiossarcoma, sarcoma de células sinoviais, sarcoma pleomórfico (histiocitoma fibroso maligno) e sarcoma indiferenciado.

Os STM ocorrem tanto em seres humanos quanto em animais (EHRHART, 2005) e compreendem de 9 a 15% de todos os tumores de pele e de subcutâneo em cães (MACEWEN; POWERS; MACY, 2001; EHRHART, 2005; DENNIS et al., 2011), nos quais tendem a se apresentar como massas solitárias em animais de idade média a avançada, sem predileção por sexo ou raça (LIPTAK; FORREST, 2007; HOHENHAUS et al., 2016).

Quanto ao comportamento biológico, podem surgir em qualquer localização anatômica do corpo, sendo a pele e o subcutâneo os sítios mais acometidos; tendem a se apresentar com uma pseudocápsula macia a firme com margens histologicamente mal definidas ou infiltrados ao longo do plano facial, ou seja, são localmente invasivos; podem metastatizar pela via hematógena, sendo incomum a metástase para linfonodos regionais (LIPTAK; FORREST, 2007), e a taxa metastática depende do grau tumoral - varia de 15% (KUNTZ et al., 1997) a 20% (SELTING, 2010) para o grau I e II e, de 41% (KUNTZ et al., 1997) a 50% (SELTING, 2010) para o grau III.

O desenvolvimento de STM associado à vacinação, materiais estranhos ou injeções é frequentemente relatada em gatos e humanos. Em cães há relatos de casos isolados da ocorrência de STM relacionados a lesões prévias, infecções parasitárias (*Spirocera lupi*), implantes e trauma, porém na maioria dos casos sua etiologia é desconhecida (BRAY, 2016).

Estudos com STM em cães ao longo dos últimos 25 anos têm sugerido que o grau do tumor e as margens de ressecção estreitas têm significância prognóstica. Autores que examinaram o grau de ressecção concluíram que uma exérese ampla diminui a probabilidade de recidiva local (KUNTZ et al., 1997; BANKS et al., 2004; MCSPORRAN, 2009; DENNIS et al., 2011; MONTEIRO; BOSTON; MONTEITH, 2011; STEFANELLO et al., 2011) e que o grau do tumor tem bom valor prognóstico, ou seja, o aumento da classificação histológica prevê a recidiva do tumor após excisão com margens cirúrgicas estreitas (MCSPORRAN, 2009; STEFANELLO et al., 2011).

Embora alguns subtipos possam ser comumente associados a tumores de baixo grau (por exemplo, tumores de bainha de nervo periférico maligno) e outros associados a tumores de alto grau (por exemplo, rabdomiossarcomas), o subtipo não é considerado como fator prognóstico em cães e/ou seres humanos (KUNTZ et al., 1997; COINDRE et al., 2001; SELTING et al., 2005).

McKee et al. (2004) ao estudarem STM primários de tronco ou de extremidade em humanos, concluíram que sarcomas de extremidades ressecados com margens microscopicamente positivos, bem como aqueles ressecados com margens negativas menores que 10 mm, correm o risco de recidiva local, independentemente de outros fatores, e que, nestes casos, o tratamento adicional deve ser considerado, bem como estes pacientes tornam-se os principais candidatos a novas terapias destinados a melhorar o controle local.

2.1.1 Tratamento

Por serem localmente invasivos e apresentarem baixo potencial metastático, o controle local do tumor é o ponto mais importante do tratamento dos STM em cães (LIPTAK; FORREST, 2007) e a cirurgia oncológica é o principal recurso utilizado para o seu tratamento (THRALL; GILLETTE, 1995; MACEWEN; POWERS; MACY, 2001).

Um dos princípios fundamentais da oncologia cirúrgica é a completa excisão em bloco. Para os STM em cães, a ressecção com margens de três cm laterais e um plano fascial profundo tem sido tradicionalmente recomendados (DERNELL et al., 1998; EHRHART, 2005), apesar da margem ideal para um resultado cirúrgico seguro ainda ser desconhecida e constante foco de debate em medicina humana e veterinária (STOJADINOVIC et al., 2002; MCKEE et al., 2004; DICKINSON et al., 2006; ENGELLAU et al., 2007; STEFANELLO et al., 2008; MCSPORRAN, 2009).

Para casos em que houve ressecção com margens estreitas ou incompletas, recomenda-se ampliação da cicatriz cirúrgica ou a associação de radioterapia para reduzir a probabilidade de recidiva e melhorar a sobrevida (HOHENHAUS et al., 2016). A radioterapia associada à cirurgia parece resultar em adequado controle de recidiva local, e pode ser considerada como uma alternativa à cirurgia quando a exérese ampla com margens não é possível (KUNTZ et al., 1997). Para se conseguir a completa ressecção do STM em extremidades a amputação pode ser necessária (HOHENHAUS et al., 2016).

O papel da quimioterapia no tratamento de cães com STM ainda não está bem definido (MACEWEN; POWERS; MACY, 2001; SELTING, 2010); parece apresentar maior benefício para melhorar o controle local que o sistêmico (SELTING, 2010).

Situações nas quais têm se recomendado a quimioterapia incluem: cães com tumores não ressecáveis, tipos histológicos de grau III (SELTING, 2010) e doença metastática (MACEWEN; POWERS; MACY, 2001), apesar das evidências para apoiar a sua eficácia ainda serem limitadas na literatura (HOHENHAUS et al., 2016).

Terapias sistêmicas para STM com doxorubicina e/ou ifosfamida, em humanos, levaram à citorredução do tumor em até 30% dos casos, sem refletir em uma melhora da sobrevida (KOMDEUR et al., 2002). Estudos de meta-análise mostraram que a quimioterapia adjuvante com doxorubicina aumentou de forma significativa o ILD (intervalo livre de doença), e que a sobrevida global não foi afetada pelo fato da doxorubicina ter sido administrada de forma isolada ou em combinação com outras drogas (COLLABORATION, 1997). Em outra meta-análise na qual 18 estudos foram revisados, a eficácia da quimioterapia em STM ressecáveis localizados foi confirmada quanto à recidiva local, à distância e geral, e sobrevida global, porém a adição da ifosfamida aos protocolos exclusivos com doxorubicina apesar de mostrarem a melhora destes índices, também evidenciou toxicidade (PERVAIZ et al., 2008). Em cães, a combinação destes dois agentes não parece ser mais eficaz que o uso da doxorubicina isolada (LIPTAK; FORREST, 2007).

Um estudo retrospectivo de 39 cães com STM axial, apendicular e visceral de alto grau mostrou que cães que receberam tratamento com doxorubicina pós-cirúrgica não apresentaram benefício em ILD ou sobrevida global, em comparação com cães que não receberam quimioterapia (SELTING et al., 2005).

2.2 FOSFOLIPÍDEOS ANTINEOPLÁSICOS

Os fosfolipídeos antineoplásicos são modificadores da resposta biológica. Seu mecanismo de ação difere dos quimioterápicos clássicos, tendo como alvo a membrana celular em vez do DNA. A estrutura química composta com uma longa cadeia de hidrocarboneto apolar permite que se insiram facilmente na bicamada lipídica da membrana celular (VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2008), onde desencadeiam uma série de efeitos antitumorais na célula, levando a ativação de receptores pró-apoptóticos (MURRAY et al., 2015).

O bloqueio da enzima fosfocolina-citidiltransferase pelos fosfolipídeos antineoplásicos leva à inibição da síntese da fosfatidilcolina, substância essencial para a manutenção da membrana plasmática e consequentemente para a sobrevivência celular (SPRONG; VAN DER SLUIS; VAN MEER, 2001; GIBELLINI; SMITH, 2010; HUANG et al., 2011). A produção deficitária de fosfatidilcolina leva ainda ao estresse do retículo endoplasmático ativando fatores pró-apoptóticos. Em alguns tipos celulares os fosfolipídeos antineoplásicos desencadeiam a produção de radicais livres que, dentre outros efeitos, causam a ruptura da membrana das mitocôndrias, levando a liberação de citocromo C, promovendo morte celular (MURRAY et al., 2015).

Embora o mecanismo antitumoral não esteja completamente esclarecido, os efeitos biológicos dos fosfolipídeos antineoplásicos sobre os tumores malignos são encorajadores, devido ao alto grau de citotoxicidade contra uma ampla variedade de células neoplásicas (FERREIRA et al., 2012a).

2.2.1 Fosfoetanolamina sintética (FO-S)

Os fosfolipídeos de etanolamina são componentes estruturais essenciais das membranas celulares e desempenham papéis regulatórios na divisão celular, sinalização, ativação, autofagia e fagocitose (BAKOVIC; FULLERTON; MICHEL, 2007). Os fosfolipídeos distribuem-se de maneira assimétrica na membrana plasmática. Existem evidências, de que nos estágios precoces da apoptose, sua assimetria é perturbada (BALASUBRAMANIAN; MIRNIKJOO; SCHROIT, 2007), o que parece se constituir mecanismo fundamental através do qual as células apoptóticas são reconhecidas e eliminadas pelos macrófagos (BROUCKAERT et al., 2004).

Em estudo no qual células Jurkat (células derivadas a partir da leucemia de células T humana) foram tratadas com vitamina K2 (menaquinona) - citotóxica para estas células - ocorreu a formação de vários metabólitos, dentre os quais a fosfoetanolamina (FO) foi o mais relevante, cujos níveis aumentaram mais de duas vezes após 24 horas de tratamento e cinco vezes no período de 72 horas. Os resultados mostram que o efeito apoptótico da FO apresenta uma importante função na indução de morte celular após o tratamento com vitamina K2 (DHAKSHINAMOORTHY et al., 2015).

A FO está presente em todos os tecidos e órgãos animais. É uma molécula envolvida no *turnover* dos fosfolipídios, atuando como precursora na síntese de fosfatidiletanolamina, um dos principais componentes das membranas e segundo lipídeo mais abundante em mamíferos (VANCE, 2008; GIBELLINI; SMITH, 2010). Foi isolada pela primeira vez em 1936 por Edgar Laurence Outhouse, do Departamento de Pesquisas Médicas do Instituto Banting da Universidade de Toronto, a partir de tumores em bovinos. Após seus trabalhos, outros pesquisadores encontraram a FO em intestinos de ratos saudáveis e em tecidos cerebrais de bovinos. Por estarem presente nos tecidos saudáveis e tumorais, surgiu um crescente interesse científico nos compostos fosforilados, com objetivo de se elucidar os diferentes comportamentos químicos das fosfoproteínas e outras classes de organofosforados (FÖLSCH; ÖSTERBERG, 1959).

Com base nos estudos realizados por Outhouse, o grupo de Química Analítica da USP - São Carlos sintetizou a fosfoetanolamina sintética (FO-S), que corresponde a uma estrutura química formada por um grupo fosfato polar, seguido de uma cadeia etílica e uma amina terminal; por ser um fosfomonoéster, os átomos de hidrogênios são ionizáveis em solução aquosa (LUNA, 2017).

Estudos publicados pelo grupo do Instituto Butantan têm demonstrado que a FO-S apresenta grande potencial para induzir citotoxicidade em células de diferentes linhagens de tumores como B16F10 (melanoma murino), EAT (tumor ascítico de Ehrlich), Renca (carcinoma renal murino) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana) sem afetar a capacidade proliferativa das células normais, além de estar associada a menor incidência de metástase (MENEGUELO, 2007; FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012a; FERREIRA et al., 2012b; FERREIRA et al., 2013a; FERREIRA et al., 2013b; LUNA et al., 2014). Concluíram que a FO-S desencadeia a morte celular por apoptose através da via mitocondrial-dependente, e que seus efeitos apoptóticos provavelmente envolvam o rompimento do potencial da membrana mitocondrial combinado com um aumento da transição de sua permeabilidade e a liberação de fatores pró-apoptóticos, o que induz um aumento na atividade da caspase-3 que leva à externalização da fosfatidilserina (FERREIRA et al., 2013c).

No estudo de Ferreira et al. (2011), a redução do volume tumoral e a sobrevida promovido pelo tratamento com FO-S em camundongos portadores de melanoma

foram maior que aqueles observados com o agente quimioterápico Taxol®¹, considerado pela National Comprehensive Cancer Network como tratamento de primeira linha para o melanoma, e altamente eficaz quando utilizado em combinação com dacarbazina e IL-2. A análise histológica e histoquímica dos tumores mostrou que o tratamento com FO-S reduziu o tamanho, o número de vasos e a neovascularização, o que sugere que a FO-S apresenta atividade antiangiogênica. Em outro estudo, observaram ainda que o tratamento de células de melanoma B16F10 com FO-S resultou em uma inibição dose-dependente da viabilidade celular; parada das células na fase G2/M do ciclo celular; aumento da caspase-3 e indução do processo de apoptose (FERREIRA et al., 2012b).

Este mesmo grupo publicou estudo com o uso da FO-S, no qual ensaios *in vitro* com a linhagem de células de EAT mostraram que o tratamento foi capaz de promover morte celular por apoptose, diminuir o potencial elétrico mitocondrial e aumentar a expressão da proteína caspase-3 ativa; e os ensaios *in vivo* em camundongos, que o tratamento foi capaz de inibir o crescimento tumoral e aumentar a sobrevida dos animais sem causar toxicidade no fígado (FERREIRA et al., 2012a).

Em 2013, a atividade antiangiogênica da FO-S *in vitro* foi comprovada por sua capacidade em inibir proliferação celular, migração e formação de tubos semelhantes a capilares, e seu potencial terapêutico antimetastático para inibir metástase pulmonar de carcinoma renal em camundongos *in vivo* mostrou-se superior ao sunitinibe, ao impedir a migração de células tumorais para colonização à distância através da ruptura de filamentos de actina (FERREIRA et al., 2013a). O efeito antitumoral da FO-S em células MCF-7 foi demonstrado por sua capacidade em diminuir a viabilidade celular, acompanhada por alterações morfológicas e descolamento das células da cultura em monocamada (FERREIRA et al., 2013b) e em células de leucemia, pela indução de apoptose pela via mitocondrial. A avaliação do seu efeito no modelo de leucemia promielocítica aguda *in vivo*, demonstrou que o composto apresenta efeito antiproliferativo, diminuindo o número de células mieloides imaturas no baço, medula óssea e fígado e redução da expansão dos clones malignos na medula óssea (FERREIRA et al., 2013c).

¹ Taxol® (paclitaxel) - Bristol-Myers Squibb Farmacêutica LTDA.

2.3 MARCADORES TUMORAIS

No estudo sobre os efeitos da FO-S sobre o desenvolvimento de tumores de melanoma murino experimental, a proliferação e morte de células tumorais foi investigada em reação de imuno-histoquímica pela marcação de células tumorais com anticorpos específicos para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e caspase-3 (VERONEZ, 2012).

A caspase-3 ativada é considerada como executora da via apoptótica e sua ativação é necessária para a indução de apoptose (DOLKA; KRÓL; SAPIERZYŃSKI, 2016). O aparecimento dessa molécula no citoplasma das células apoptóticas é um evento precoce que precede o desenvolvimento de características morfológicas apoptóticas clássicas. Assim, a avaliação imuno-histoquímica da caspase-3 ativa permite a detecção de um estágio precoce de apoptose (RODRIGUES et al., 2016).

A apoptose ou morte celular programada é considerada um mecanismo celular intrínseco e regulado, através do qual há um controle entre a produção de novas células e a capacidade individual das células em se autodestruírem, desempenhando papel importante na determinação do crescimento e agressividades tumorais. A caspase-3 vem sendo foco de estudos relacionados ao mecanismo da apoptose, tornando-se peça-chave no entendimento dos mecanismos de morte celular, uma vez que é ativada em resposta a vários estímulos, como drogas quimioterápicas (TERZIAN et al., 2007). Parte da regressão tumoral causada pela maioria dos agentes anticancerígenos citotóxicos se deve a indução de apoptose; defeitos nesta via podem causar resistência a drogas e resultar em falha no tratamento, o que justifica, segundo O'Donovan et al. (2003), usar a marcação da caspase-3 para o controle da resposta aos tratamentos quimioterápicos quanto a possível resistência à droga.

Anticorpos contra a proteína Ki67 são cada vez mais utilizados como ferramenta diagnóstica em diferentes tipos de neoplasias. O fato da proteína Ki67 estar presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) em todas as células em proliferação (células normais e tumorais), e ausente das células em repouso (G0), torna-a um excelente marcador para determinar a fração de crescimento de determinada população de células. Assim, embora o papel funcional da proteína Ki67 durante a proliferação celular seja desconhecido, é inquestionável

que a sua expressão esteja intimamente relacionada à proliferação celular e reflete diretamente o estado fisiológico da célula (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

O índice alto de Ki67 tem sido positivamente correlacionado com metástase, morte por neoplasia, baixas taxas de sobrevida livre de doença e baixas taxas de sobrevida global em cães e em humanos (RODRIGUES et al., 2016).

Em um estudo que analisou 40 amostras tumorais de fibrossarcoma em cães, houve correlação estatística significativa do Ki67 e da intensidade de apoptose com o grau de malignidade tumoral. A expressão do Ki67 foi marcadamente diferente entre os tumores dos graus II e III ($p= 0,0005$) e a análise da intensidade da apoptose mostrou diferenças significativas no número de células apoptóticas entre os três graus de malignidade (MADEJ et al., 2014).

Na literatura pesquisada foram encontrados apenas dois estudos do mesmo grupo de autores que publicaram o percentual de marcação de Ki67 em STM de cães: em um deles este percentual variou de 0,8% a 36,2% (mediana, 7,20%) para tumores de parede perivascular (AVALLONE et al., 2015) e no outro, variou de 1,1% a 76,8% (média de 20,6%, mediana de 14,9) para lipossarcomas (AVALLONE et al., 2016).

2.4 TERMOGRAFIA

A termografia (TE) é um método de imagem fisiológica, cujo princípio reside no fato de que alterações no metabolismo celular e no fluxo sanguíneo ocasionam alterações superficiais de temperatura, visualizadas na imagem termográfica (VAN HOOOGMOED; SNYDER, 2002). Estas mudanças fisiológicas podem ser notadas antes que ocorram mudanças anatômicas potenciais, comumente diagnosticadas por métodos de imagem radiológico, tomográfico ou de ressonância magnética. A temperatura superficial da pele pode mudar devido a muitas razões, como um processo inflamatório, infeccioso ou ação de medicamentos (VAINIONPÄÄ, 2014). Em estudo que monitorou os efeitos do tratamento após terapia de onda de choque extracorpórea concentrada em membros de equinos, foram alcançados resultados correspondentes com o uso de imagens cintilográficas nucleares - outro método de imagem fisiológica - e termográficas (RINGER; LISCHER; UELTSCHI, 2005).

Em 1956 o cirurgião Lawson fez as primeiras imagens termográficas diagnósticas ao descobrir que pacientes com neoplasias mamárias apresentavam temperatura corpórea mais elevada nas áreas invadidas pelo nódulo tumoral (LAWSON, 1956). Por mais de 50 anos, imagens termográficas têm sido usadas na medicina humana para visualizar alterações fisiopatológicas induzidas por várias doenças e condições como neuropatia diabética, distúrbio vascular, detecção do câncer de mama, estudo de termorregulação, rastreamento da febre, imagem cerebral, estudo da síndrome do impacto muscular, diagnóstico de doenças reumatológicas, diagnóstico de síndrome do olho seco, detecção de doença hepática metastática, isquemia intestinal, transplante renal, tratamento cardíaco, avaliação dos danos de radiação no corpo humano e nas áreas de odontologia, dermatologia, ginecologia, acupuntura, crioterapia e medicina forense (LAHIRI et al., 2012). Em 1982 foi aprovada pela FDA como método diagnóstico adjunto para pacientes com câncer de mama (LAHIRI et al., 2012; MELO, 2013).

Em veterinária o uso da TE vem se ampliando. Dentre os estudos publicados em cães por exemplo, na área da ortopedia há sua utilização para caracterização termográfica do joelho normal (LOUGHIN; MARINO, 2007) e avaliação de animais com ruptura de ligamento cruzado cranial (INFERNUSO et al., 2010). Na área da oncologia, Melo et al. (2015) estudaram mastocitomas cutâneos caninos e observaram diferença significativa na temperatura dos tumores, que se mostraram mais quentes ou mais frios que os tecidos cutâneos saudáveis ao seu redor, porém tais variações não se correlacionaram com o grau histológico do tumor ou dados clínicos (estadiamento tumoral, ILD e sobrevida).

Reconhecida como importante ferramenta para determinação de fontes locais de calor ou frio, pode-se citar como principais vantagens do seu uso na área médica: ausência de necessidade de contato para realização do exame, tornando-a um método seguro e asséptico; não necessita interação direta com o tecido; é rápido e fácil de alcançar a obtenção das imagens; o armazenamento dos dados é simples e representativo por toda a vida do paciente (NOWAKOWSKI, 2006) e não envolve riscos à saúde, devido à ausência de radiação ionizante (MAGALHAES; VARDASCA; MENDES, 2018).

O diagnóstico por TE comumente se baseia na assimetria de temperatura pela comparação entre regiões saudáveis e doentes do corpo. É considerada como um

sinal de função anormal e representa o desenvolvimento de algum(uns) distúrbio(s) (POLJAK-BLAZI et al., 2009).

Gautherie e Gros (1980) foram os pioneiros em estudar e documentar o uso da TE na detecção precoce de câncer de mama, e concluíram que as lesões de crescimento mais rápido, com tempos de duplicação mais curtos, geralmente apresentam anomalias termográficas progressivas consistentes com o aumento da produção de calor metabólico, portanto a TE seria útil como preditor de fator de risco para o câncer de mama e também para avaliar neoplasias de crescimento mais rápido.

Acredita-se que o processo de carcinogênese associada à neoangiogênese resulte em aumento da temperatura ao redor da área da formação neoplásica (POLJAK-BLAZI et al., 2009). Embora seja evidenciada a elevação da temperatura da superfície da pele na periferia do tumor, a massa tumoral em si, por vezes, mostra redução da temperatura. A causa dessas mudanças de temperatura não é clara, mas tem sido sugerido que a elevação da temperatura na periferia do tumor é devido à hipervascularidade ao seu redor, como resultado da angiogênese induzida por ele. No entanto, Xie e colaboradores (2004) contestam esta explicação, e justificam que este fato se deva a uma resposta inflamatória crônica ao redor dos tumores em desenvolvimento. No estudo que realizaram com adenocarcinoma mamário de rato 13762 MAT, ao contrário dos doentes com câncer de mama, não observaram qualquer aumento na temperatura da superfície da pele associado ao tumor, mas sim sua redução constante, altamente significativa e independente do tamanho do tumor, produzida inclusive por tumores relativamente pequenos, a qual foi atribuída a hipótese de efeito resultante da natureza mal vascularizada de tumores de crescimento rápido.

Apesar da maioria dos tumores superar quantitativamente a vascularização de tecidos normais, para aqueles tumores que crescem muito rápido o suprimento sanguíneo pode ser prejudicado por anormalidades estruturais e funcionais (vasos tumorais pequenos, mal organizados e hiperpermeáveis), neste caso o tumor irá mostrar-se mais frio que os tecidos circundantes como observado por Song et al. (2007) em seu estudo com xenoenxertos com células de câncer de mama em ratos imunossuprimidos.

Os resultados obtidos pela TE devem ser apropriadamente correlacionados com uma história clínica completa, um exame físico bem realizado e outros estudos

diagnósticos, com isto seu uso poderá auxiliar no estabelecimento do diagnóstico e prognóstico do paciente (BRIOSCHI; MACEDO; MACEDO, 2003).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Avaliar a ação antitumoral, o intervalo livre de recidiva local (ILRL), a sobrevida e a ocorrência de efeitos adversos (EA) em cães com STM espontâneo tratados com FO-S, como terapia adjuvante e neoadjuvante/adjuvante associado a exérese tumoral ampla.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

4.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo cães com neoplasia de tecidos moles em pele e/ou subcutâneo, com diagnóstico citológico sugestivo de neoplasia mesenquimal ou histopatológico de STM, que não apresentavam comorbidades graves que pudessem interferir no protocolo de tratamento proposto, atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET-FMVZ/USP), no período de agosto de 2015 a julho de 2017.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos cães com imagens suspeitas para neoplasia ou doença metastática à distância aos exames radiográfico de tórax e/ou ultrassonográfico de abdômen, cães cujo diagnóstico histopatológico após exérese do tumor não identificou margens cirúrgicas livres de células neoplásicas² ou não confirmou tratar-se de STM.

² Margens cirúrgicas livres: considerada pelo menos 3 mm a distância entre a borda do tecido criada cirurgicamente e as células neoplásicas (DENNIS et al., 2011).

4.2 DESENHO DO ESTUDO E INTERVENÇÕES

Ensaio clínico prospectivo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ/USP protocolo nº 3495130715, no qual os pacientes foram alocados de forma aleatória em dois grupos com diferentes protocolos de tratamento:

- Grupo 1 (G1): cães portadores de STM submetidos à intervenção cirúrgica (IC) para exérese tumoral ampla, e que receberam um ciclo do FO-S conforme intervalo e concentração descritos no tópico 4.2.1, a qual teve início no pós-operatório imediato (terapia adjuvante);
- Grupo 2 (G2): cães portadores de STM receberam um ciclo de FO-S conforme intervalo e concentração descritos no tópico 4.2.1. Após o término deste primeiro ciclo foram submetidos a procedimento cirúrgico para exérese tumoral ampla, e um novo ciclo iniciou-se no pós-operatório imediato (terapia neoadjuvante/adjuvante).

4.2.1 Tratamento

A exérese tumoral ampla foi realizada com margens de três centímetros laterais e um plano fascial profundo como preconiza a literatura (DERNELL et al., 1998; EHRHART, 2005). A medicação pós-operatória incluiu a administração por via oral (VO) de antiácido e inibidor de secreção gástrica (Cloridrato de ranitidina 2mg/kg/12hs/7-10 dias/VO), antibiótico (Cefalexina 30mg/kg/12hs/7-10 dias/VO), anti-inflamatório (Carprofeno 2,2mg/kg/12hs/3 dias/VO) e analgésicos (Cloridrato de tramadol 2,2mg/kg/8hs/3 dias/PO; Dipirona 25 mg/kg/8hs/3 d/VO).

Um ciclo de tratamento com FO-S consistiu-se em sua administração semanal durante quatro semanas consecutivas, na dose de 70 mg/kg diluída em 100 mL de solução fisiológica estéril a 0,9% pela via intravenosa (IV). Antes de cada aplicação foi realizado exame físico e laboratorial (hemograma completo, perfil renal, perfil hepático, dosagem de triglicérides e colesterol séricos).

4.2.2 Exame tomográfico

Para a realização do exame tomográfico utilizou-se aparelho helicoidal multislice de 16 canais (Philips MX 8000 IDT), os pacientes foram submetidos à anestesia geral de acordo com protocolo anestésico estabelecido pelo Serviço de Anestesiologia do HOVET-FMVZ/USP e posicionados de acordo com a localização do tumor, evitando sua compressão e deformação.

Os cães foram primeiramente escaneados sem utilização de meio de contraste, seguido de outra aquisição de imagem após a administração intravenosa de meio de contraste iodado hidrossolúvel Omnipaque® 300³ no volume de 1,5mL/kg/IV em bolus em veia periférica. A técnica aplicada foi de 120kVp, 150-240 mAs e 2-3 mm de espessura de corte.

As imagens obtidas pelo exame de tomografia computadorizada (TC) foram posteriormente inseridas no Software Osirix⁴ para obtenção das mensurações tumorais: diâmetro máximo ao corte transversal (unidimensional), cálculo do produto do diâmetro máximo pelo maior diâmetro perpendicular a este, ambos em corte transversal (bidimensional) e volume (tridimensional) obtido pelo software (função “ROI volume”), a partir das áreas tumorais circundadas em cada um dos cortes transversais adquiridos.

Imagens de TC da região acometida pelas formações neoplásicas foram realizadas antes do início do tratamento (G1 T₄; G2 T₀) para mensuração tumoral e avaliação do comprometimento de tecidos adjacentes (Apêndice A) para planejamento cirúrgico (Apêndice B) para os dois grupos, e antes da IC para o G2 (T₄) para nova mensuração tumoral pós tratamento.

³ Omnipaque® ioexol 300 mg I/mL - cada mL da solução contém 647 mg de ioexol. Fabricado por GE Healthcare (Shanghai) Co., Ltda Xangai – China. Importado por GE Healthcare do Brasil Comércio e Serviços para Equipamentos Médico-Hospitalares LTDA.

⁴ Osirix - software de processamento de imagens DICOM produzidas por equipamentos de imagem médica (MRI, CT, PET, PET-CT, SPECT-CT, ultrassons) para Mac. Desenvolvido e suportado pela Pixmeo desde 2004.

4.2.3 Exame termográfico

Para a captura das imagens termográficas as formações neoplásicas dos pacientes foram fotografadas com a câmera FLIR T650sc⁵ (FLIR Systems, Inc.), sob a mesma distância de 0,5m em ambiente fechado, sem presença de correntes de ar. Os animais foram tricotomizados na área de interesse e as imagens obtidas 15 minutos após este procedimento.

Após obtenção, as imagens foram inseridas e analisadas no Software Flir R Research (FLIR Systems, Inc.) para mensuração das temperaturas:

- no ponto central da formação (PT);
- em um ponto externo próximo à formação e não tumoral (PNT);
- de área elíptica que abrange e circula o PT da formação= área tumoral (AT);
- de área elíptica de tamanho igual a AT que circula o PNT= área não tumoral (ANT)⁶.

Imagens termográficas da formação foram realizadas sempre antes do início do tratamento (G1 T₄; G2 T₀) para os dois grupos, e antes de cada aplicação de FO-S até à realização da IC para o G2 (T₁₋₄).

4.2.4 Acompanhamento

Envolveu exame físico, laboratorial (hemograma completo, perfil renal, perfil hepático, dosagem de triglicérides e colesterol séricos), ultrassonográfico e radiográfico realizados aos seis e doze meses após o término do tratamento. Em cada consulta de acompanhamento, os cães foram avaliados quanto à evidência de recidiva tumoral local (RTL), suspeita de metástase e surgimento de demais comorbidades.

⁵ FLIR T650sc - Câmera Termográfica *wi-fi*, com resolução de 307.000 pixels, sensibilidade de 30mK.

⁶ Em alguns casos não foi possível que ANT fosse exatamente igual a AT, devido à localização anatômica e tamanho tumoral.

Os tutores foram orientados a retornar ao hospital em qualquer momento do estudo, caso observassem o surgimento de tumorações no local operado ou o paciente adoecesse.

As tumorações que se desenvolveram no local tratado foram submetidas à citologia aspirativa para diagnóstico diferencial entre tecido reacional ou RTL. Para realização do exame citológico, a colheita do material da formação foi realizada com agulha calibre 20 x 5,5 através de capilaridade, depositado em lâminas e realizado esfregaço pela técnica de *squash* e seco ao ar livre. As lâminas foram fixadas com metanol, coradas pelo método panótico e/ou Rosenfeld e analisadas em microscopia óptica de imersão, com aumento de 100x.

Pacientes que desenvolveram comorbidades foram assistidos e acompanhados no HOVET-FMVZ/USP e os demais tiveram seus respectivos tutores contactados por telefone ao término do prazo para coleta de dados (31 de janeiro de 2019).

4.2.5 Exame histopatológico

Todos os tumores obtidos por exérese tumoral foram fixados em formol tamponado a 10% para análise histopatológica, onde foram processadas pelas técnicas de rotina com inclusão em parafina, cortadas a 6 µm e coradas pela hematoxilina-eosina. As margens cirúrgicas foram consideradas “livres” se a distância entre a borda do tecido criada cirurgicamente e as células neoplásicas foi < 3 mm (DENNIS et al., 2011).

A determinação do grau do tumor seguiu orientações descritas por Coindre et al. (1988) em escala padronizada por Kuntz et al. (1997) que considera as variáveis: grau de diferenciação, número de figuras mitóticas/10 HPF (400X) e porcentagem de necrose tumoral, como indicado no quadro 1.

Quadro 1 - Escala padronizada para determinação do grau do tumor

Pontuação	Grau de diferenciação	Mitoses (nº de figuras/10 HPF)	Necrose
1	assemelham-se a tecido mesenquimal adulto normal	0 - 9	nenhum
2	tipo histológico específico	10 -19	< 50% do tecido examinado é necrótico
3	indiferenciado	> 20	> 50% do tecido examinado é necrótico
Grau 1= pontuação cumulativa ≤ 4 para as 3 categorias			
Grau 2= pontuação cumulativa de 5 a 6 para as 3 categorias			
Grau 3 = pontuação cumulativa ≥ 7 para as 3 categorias			

Fonte: Adaptado de Kuntz et al. (1997).

4.2.6 Imuno-histoquímica

As amostras tumorais foram submetidas ao procedimento de imuno-histoquímica (IHQ) para determinação do subtipo histológico do STM, determinação do índice de proliferação celular (Ki67) e grau de apoptose (caspase-3), no Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular do Departamento de Patologia da FMVZ-USP.

Cortes histológicos de 5µm obtidos em lâminas silanizadas 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. A seguir as lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de H₂O₂ (10V), por 30 minutos a 37°C, protegidas da luz. Após lavar as lâminas em água corrente, água destilada e em tampão de lavagem (TTBS), foi realizado o bloqueio de proteínas em solução de leite desnatado 5% (Nestlé Molico®) durante 30 minutos a 37°C, novamente lavadas por 3 vezes em TTBS e submetidas ao bloqueador de proteínas (Novocastra™ Protein Block, Leica Biosystems), durante 10 minutos em estufa a 25°C. Foram novamente realizadas 3 lavagens em TTBS e as lâminas incubadas em câmara úmida escura pelo período de 16 horas a 4°C, com os seguintes anticorpos primários: Ki67 (Dako,

1:800), alfa-actina de músculo liso (Sigma-Aldrich, 1:10000), GFAP (Leica Biosystems, 1:500), enolase (Dako, 1:2000), S-100 (Dako, 1:3000), desmina (Dako, 1:200), vimentina (Dako, 1:5000), CD204 (CosmoBio, 1:1000), PNL-2 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), CD31 (Dako, 1:100), caspase-3 ativada (Cell Signaling Technology, 1:500), CD3 (Leica Biosystems, 1:1000) e CD20 (Thermo Fisher Scientific, 1:100). Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em TTBS e incubadas com reagente pós-primário (Novocastra, Leica Biosystems) por 30 minutos em temperatura de 20 a 25°C. Seguiram-se três lavagens em TTBS e foi aplicado polímero (Novolink™ Max Polymer Detection System, Leica Biosystems) por 30 minutos em temperatura de 20 a 25°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em TTBS e reveladas pelo cromógeno tetracloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB, Novocastra, Leica Biosystems) por cinco minutos em temperatura ambiente. Após lavagens em água corrente e destilada, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris (Merck), lavadas em água corrente e destilada, e realizados dois 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 resina (Permount™, Thermo Fisher Scientific). 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 de acordo com (RAMOS-VARA; BORST, 2016). Para determinação do índice de proliferação celular foram analisados os cortes histológicos submetidos à reação de IHQ para Ki67, e os resultados expressos como a porcentagem de células marcadas com núcleos positivos em um total de 1000 células tumorais. A contagem foi realizada nas regiões com maior visualização de células positivas (*“hotspots”*), com o auxílio de sistema computadorizado de imagens Image-Pro Plus versão 4.5 (Media Cybernetics, Inc). 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, e adotada a classificação semiquantitativa: grau 0 (negativo - ausência de marcação), grau 1 (discreto -

marcação em até 25% das células tumorais), grau 2 (moderado - marcação em 25 a 75% das células tumorais) e grau 3 (intenso - marcação em mais de 75% das células tumorais) (DOLKA; KRÓL; SAPIERZYŃSKI, 2016).

4.3 CRITÉRIOS PARA RESPOSTA TUMORAL

Realizou-se TC pré e pós terapia neoadjuvante com FO-S para o Grupo G2 para mensuração:

- do diâmetro transversal mais longo do tumor (unidimensional) e sua avaliação segundo os Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos (RECIST) (THERASSE et al., 2000);
- cálculo do produto do diâmetro máximo pelo maior diâmetro perpendicular (bidimensional) e sua avaliação segundo os critérios da *World Health Organization* (WHO) (MILLER et al., 1981);
- determinação do volume do tumor (tridimensional) e avaliação da sua alteração pelo Critério Volumétrico (VOL) (CHAPPELL; MIRANPURI; MEHTA, 1998).

A porcentagem de mudança do tamanho tumoral foi calculada segundo a equação abaixo:

$$\text{Alteração tamanho tumoral \%} = \frac{(\text{tamanho do tumor } T_4 - \text{tamanho do } T_0) \times 100}{\text{tamanho do tumor em } T_0}$$

As três metodologias (RECIST, WHO e VOL) dividem os resultados em quatro categorias (GRABELLUS et al., 2012):

- RECIST: desaparecimento da lesão (resposta completa=RC), diminuição $\geq 30\%$ no tamanho do tumor (resposta parcial=RP), aumento $\geq 20\%$ no tamanho do tumor (doença progressiva=DP) e tamanho entre RP e DP (doença estável=DE). A diminuição $\geq 30\%$ (RC ou RP) no tamanho do tumor observada em T_4 em relação à T_0 foi classificada como “respondeu à FO-S com citorredução”;
- WHO: desaparecimento da lesão (resposta completa=RC), diminuição $\geq 50\%$ no tamanho do tumor (resposta parcial=RP), aumento $\geq 25\%$ no tamanho do tumor (doença progressiva=DP) e nem RP ou DP é considerado como

nenhuma mudança (doença estável= DE). A diminuição $\geq 50\%$ (RC ou RP) no tamanho do tumor observada em T₄ em relação à T₀ foi classificada como “respondeu à FO-S com citorredução”;

- VOL: desaparecimento da lesão (resposta completa=RC), diminuição $\geq 65\%$ no tamanho do tumor (resposta parcial=RP), aumento $\geq 40\%$ no tamanho do tumor (doença progressiva=DP) e nem RP ou DP é considerado como nenhuma mudança (doença estável= DE). A diminuição $\geq 65\%$ (RC ou RP) no tamanho do tumor observada em T₄ em relação à T₀ foi classificada como “respondeu à FO-S com citorredução”.

Realizou-se TE para análise da variação de temperatura local do tumor antes e durante a terapia neoadjuvante para o Grupo G2. A partir da obtenção dos dados, foi realizada a diferença entre a temperatura da áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) e o valor encontrado antes do início do tratamento (T₀) comparado com cada um daqueles encontrados nos diferentes tempos de tratamento (T₁, T₂, T₃ e T₄).

Realizou-se reação de IHQ nos cortes histológicos tumorais para o cálculo do índice de proliferação celular (Ki67) e para a determinação do grau de apoptose (caspase-3), e os resultados obtidos foram comparados entre os tumores que não receberam a FO-S como terapia prévia à sua ressecção cirúrgica (Grupo G1) e tumores que receberam a FO-S como terapia neoadjuvante (Grupo G2), segundo o grau tumoral dos STM (I, II e III).

4.4 CRITÉRIOS PARA INTERVALO LIVRE DE RECIDIVA LOCAL E SOBREVIDA

O ILRL foi definido como o tempo decorrido entre a IC e a ocorrência de RTL; foram excluídos desta análise os pacientes que não completaram os doze meses de acompanhamento. Para o cálculo da taxa de sobrevida foram considerados eventos completos os pacientes que morreram em decorrência dos STM ou “altamente suspeitos, sem *causa mortis* definida”; foram excluídos desta análise os cães que morreram de causas não relacionadas ao STM ou que mudaram de tratamento. Para a obtenção destes dados os tutores dos pacientes foram contactados por telefone ao término do estudo (31 de janeiro de 2019); foi considerada positiva a ocorrência de

RTL se detectada a presença de nódulos na região da cicatriz cirúrgica, e em caso de óbito do paciente foram questionados quanto à causa da morte (se conhecida).

Os resultados obtidos foram confrontados àqueles relatados em estudos existentes na literatura (Apêndice C) com STM de ocorrência espontânea em cães, tratados apenas com *Standard of Care* (SOC)⁷, ou seja, ressecção cirúrgica ampla ou ressecção marginal/incompleta seguida de radioterapia.

4.5 CRITÉRIOS PARA EFEITOS ADVERSOS

Os pacientes foram avaliados segundo alguns dos Critérios Terminológicos Comuns para Eventos Adversos após quimioterapia ou terapia antineoplásica biológica em cães e gatos, do *Veterinary Cooperative Oncology Group* (VCOG-CTCAE), que utiliza escala de cinco graus para cada evento adverso, de acordo com a severidade dos sinais apresentados, sendo grau 1 o mais brando e 5 o mais severo, representado pelo óbito (VCOG, 2016).

Foram considerados os eventos adversos ocorridos no período compreendido entre as datas de início e término da administração da FO-S para ambos os grupos (G1 T₄₋₇ e; G2 T₀₋₇). No quadro 2 encontram-se os eventos adversos e respectivas graduações que foram investigados.

⁷ *Standard of Care* (SOC) - Tratamento padrão que deve ser seguido para um determinado tipo de paciente, doença ou circunstância clínica.

Quadro 2 - Classificação e graduação de eventos adversos

Evento adverso	Grau 1 Leve	Grau 2 Moderado	Grau 3 Severo	Grau 4 Risco de vida	Grau 5 Óbito
Anemia (Ht %)	30% a 37%	20 a 30%	15% a 20%	< 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)	88 a 132 U/L	132 a 352 U/L	352 a 880 U/L	> 880 U/L	—
Toxicidade hepática (FA)	150 a 375 U/L	375 a 750 U/L	750 a 3000 U/L	> 3000 U/L	—
Toxicidade renal (Creatinina)	1,4 a 2,1 mg/dL	2,1 a 2,8 mg/dL	2,8 a 4,2 mg/dL	> 4,2 mg/dL	—
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 ($\geq$ 10%). Necessidade de fluidoterapia IV ou nutrição forçada ou tubo para alimentação	Duração superior a 5 dias, consequências potencialmente fatais, indicado o uso de nutrição parenteral	óbito
Êmese	< 3 episódios/24 horas. Tratamento médico não necessário	3-10 episódios/24 horas ou < 5 episódios/24 horas por até 2 dias. Indicado fluido IV ou SC e medicação	> 5 episódios/24 horas por mais de 2 dias. Indicada fluido IV ou nutrição parenteral	Consequências potencialmente fatais (ex. colapso hemodinâmico)	óbito
Diarréia	< 2 episódios/24 horas ou apenas consistência menos firme que o habitual	3 a 6 episódios/24 horas. Indicado fluidoterapia IV ou SC e medicação	> 6 episódios/24 horas ou incontinência por mais de 2 dias. Indicada hospitalização	Consequências potencialmente fatais (ex. colapso hemodinâmico)	óbito

Fonte: Adaptado de VCOG (2016).

Nota: Ht %= hematócrito; ALT= alanina transaminase; FA= fosfatase alcalina; — significa que não se aplica

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste de Exato de Fisher para verificar associação em relação ao sexo e grupo avaliado, e o teste t de Student para verificar se houve diferença em relação à idade entre os grupos G1 e G2.

Para a análise da diferença de temperatura, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e ao teste de Bartlett para averiguar se apresentavam distribuição normal e variâncias iguais. Como os dados não seguiram essas premissas, foi utilizado o teste de Friedman, seguido do *post hoc* de Nemenyi.

Foi realizada análise de regressão simples para identificar possível correlação entre a diferença de temperatura e o volume tumoral.

Foi utilizado o teste de Wilcoxon para as comparações referentes à caspase-3; e o teste t de Student para as comparações referentes ao Ki67.

Para avaliar a correlação entre o volume tumoral e a diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) do grupo G2, foi utilizado o coeficiente de correlação (ρ) pelo método de Spearman. Ficou estabelecido que existiu uma correlação de alta intensidade entre as variáveis quando $r \geq 0,60$; média intensidade quando $0,30 < r < 0,60$; e de baixa intensidade quando $r \leq 0,30$.

A análise da RTL e sobrevida foi realizada com aplicação do teste de Kaplan-Meier para avaliar a probabilidade entre os grupos G1 e G2 e para o total de pacientes tratados.

Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de p) foram inferiores a 0,05. Foram utilizados para a realização desta análise estatística os softwares Microsoft® Excel® para Office 365 MSO para gerenciamento de banco de dados, RStudio (Version 0.99.903 – © 2009-2016 RStudio, Inc.) para execução dos cálculos estatísticos, elaboração e edição de gráficos.

A descrição dos dados obtidos relacionados às características quantitativas é dada por média ($\pm$ SD), a menos que especificado de outra forma. Para características qualitativas foram utilizados frequência relativa e número absoluto.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Vinte e sete pacientes preencheram os critérios de inclusão do estudo, porém seis foram excluídos (Apêndice D): um por apresentar imagens ao exame ultrassonográfico suspeitas para neoplasia ou doença metastática à distância em fígado, associado à fosfatase alcalina (FA) aumentada (cão ID12); um por apresentar histologicamente margem cirúrgica estreita (cão ID13) e outro margem cirúrgica comprometida por células neoplásicas (cão ID14) e três nos quais o diagnóstico histopatológico após exérese do tumor não confirmou tratar-se de STM (cães ID25, 26 e 27)

Assim, 21 pacientes foram considerados, dos quais dez pertenciam ao grupo 1 (G1- terapia adjuvante) e onze ao grupo 2 (G2 - terapia neoadjuvante/adjuvante). Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao sexo [G1 - F= 3, M= 7; G2 - F= 6, M= 5; P= 0,387 (95%IC - 0,0395915 2,8869759)] e a idade (G1= 11,1 $\pm$ 3 anos; G2= 9,4 $\pm$ 1,8 anos; P= 0,1647).

5.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES E DOS TUMORES

Na tabela 1 estão apresentados os dados epidemiológicos e respectivas características tumorais para os 21 cães com STM considerados neste estudo.

Do total de 21 cães, os machos representaram 57,14% (12/21) e as fêmeas 42,86% (9/21), a idade mediana foi 10 anos (média= 10,21; variação de 7 a 16; desvio-padrão= 2,55), 52,38% (11/21) eram sem raça definida e as raças Pinscher, Rottweiler, Lhasa Apso, Boxer, Bichon Frise, Poodle, Labrador, Pastor Alemão, Pastor Belga e Maltês corresponderam cada uma a 4,762% (1/21).

Dos tumores tratados, 76,20% (16/21) eram primários, 14,28% (3/21) eram recorrentes após excisão cirúrgica prévia e para 9,52% (2/21) esta informação era desconhecida. Todos os tumores apresentavam base séssil; 80,95% (17/21) eram aderidos e 76,19% (16/21) ulcerados. Quanto à região corpórea, 38,1% (8/21) localizavam-se em membro torácico, 33,3% (7/21) em membro pélvico, 23,8% (5/21) em tronco e 4,8% (1/21) em glúteo. Segundo exame histopatológico, quanto à

determinação do grau tumoral os STM distribuíram-se em **52,38%** (11/21) **grau I**, **38,10%** (8/21) **grau II** e **9,52%** (2/21) **grau III**. Quanto aos subtipos histológicos identificados pela imuno-histoquímica, **76,2%** (16/21) eram **tumor de bainha neural**, **3%** (2/21) **fibrossarcoma**, e em **9,52%** (2/21) dos casos esta análise **não pode ser executada**.

Tabela 1 - Dados epidemiológicos e características tumorais dos sarcomas de tecidos moles dos 21 cães considerados no estudo, São Paulo, 2019

ID	Sexo	Idade (a)	Raça	Local	Aderido	Ulcerado	Recorrente	Grau HP	Mitoses	Necrose	Ki67 (%)	Caspase-3 score	Diagnóstico imuno-histoquímico
1	F	12	Pinscher	MT	Sim	Não	Não	II	0 a 3	< 50%	14,5	3	Tumor de bainha neural
2	M	9	Rottweiler	MP	Sim	Não	Não	I	2	Não	3	2	Tumor de bainha neural
3	M	12	Lhasa Apso	MT	Sim	Sim	Sim	III	10 a 19	< 50%	12,9	0	Tumor de bainha neural
7	M	11	SRD	Tronco	Não	Não	Não	II	0 a 9	< 50%	10,4	3	Tumor de bainha neural
10	M	15	Bichon Frise	MP	Sim	Não	Não	II	10 a 19	< 50%	18,5	2	Tumor de bainha neural
11	F	7	SRD	Tronco	Sim	Não	Sim	III	19	> 50%	29,4	1	Fibrossarcoma
15	F	16	Poodle	MT	Sim	Não	Não	I	0 a 1	Não	8,4	0	Fibrossarcoma
16	M	10	SRD	Tronco	Não	Não	Não	I	0 a 1	< 50%	15,5	0	Tumor de bainha neural
17	M	8	SRD	MT	Sim	Sim	Não	I	4	Não	10,9	1	Tumor de bainha neural
18	M	...	Labrador	MT	Sim	Sim	...	II	0 a 2	< 50%	28,3	1	Tumor de bainha neural
4	M	8	Boxer	MP	Sim	Não	Não	I	0 a 1	Não	17	2	Tumor de bainha neural
5	F	10	SRD	Tronco	Sim	Não	Não	II	0 a 9	< 50%	18,4	2	Tumor de bainha neural
6	F	9	SRD	Glúteo	Sim	Sim	Não	II	3	< 50%	30,9	2	Tumor de bainha neural
8	F	10	SRD	MP	Sim	Não	Não	I	0 a 9	Não	5,9	0	Tumor de bainha neural
9	F	11	SRD	MT	Sim	Não	Não	II	0 a 9	< 50%	33,7	1	Tumor de bainha neural
19	F	9	SRD	MP	Sim	Não	Sim	II	2	< 50%	---	---	---
20	F	6	SRD	MT	Sim	Não	Não	I	2	< 50%	11,1	1	Tumor de bainha neural
21	M	9	Pastor Alemão	MP	Sim	Não	Não	I	0 a 1	Não	---	---	---
22	M	9	Pastor Belga	MP	Sim	Não	Não	I	0 a 1	Não	7,6	2	Tumor de bainha neural
23	M	...	SRD	MT	Não	Sim	...	I	0 a 3	< 50%	10,5	2	Tumor de bainha neural
24	M	13	Maltês	Tronco	Não	Não	Não	I	0 a 9	Não	13,2	1	Fibrossarcoma

Fonte: Castro (2019).

Notas: ID= Número de identificação do paciente; HP= Histopatológico; SRD= Sem raça definida; MT= Membro torácico; MP= Membro pélvico; ... significa dado desconhecido; --- significa não realizado pela inviabilidade da amostra.

5.2 RESPOSTA TUMORAL AO TRATAMENTO COM A FO-S

5.2.1 Exames tomográficos

Para esta avaliação foram considerados apenas os cães do grupo G2 que receberam a FO-S como terapia neoadjuvante. Nove cães realizaram exames de TC em T₀ e T₄ (n=9/11), e para nenhum destes pacientes a análise das imagens obtidas constatou redução nas mensurações tumorais após a terapia neoadjuvante com a FO-S, ou seja, nenhum caso de RC ou RP classificadas como “respondeu à FO-S com citorredução” foi observado. A figura 1 ilustra as imagens de TC do tumor do paciente ID6, que apresentou doença estável (DE) para os três critérios RECIST, WHO e VOL. Na tabela 2 são apresentados todos os pacientes do grupo G2 e respectivos resultados das mensurações tumorais, valores que correspondem ao percentual de aumento tumoral e sua classificação (RC, RP, DP ou DE) segundo as três diretrizes (RECIST, WHO e VOL) utilizadas neste estudo.

Figura 1 – Imagens de tomografia computadorizada em corte transversal do STM grau II localizado em região glútea direita do cão ID6, pré tratamento (T₀) e após o término da terapia neoadjuvante com FO-S (T₄). As linhas sólidas (verde) representam diâmetro máximo e diâmetro máximo perpendicular do tumor, utilizadas para cálculo do seu tamanho de acordo com os critérios RECIST e WHO. As linhas tracejadas (azul) representam o delineamento do tumor para cálculo do seu volume de acordo com o critério VOL. A resposta à terapia deste paciente foi avaliada pelos três critérios como doença estável

Fonte: Arquivo do Serviço de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP (2019).

Tabela 2 – Identificação do paciente, grau de classificação histopatológica do sarcoma de tecidos moles, valores obtidos pelas mensurações realizadas nas imagens de tomografia computadorizada, percentual de aumento tumoral e sua classificação segundo as diretrizes RECIST, WHO e VOL, para o grupo que recebeu a FO-S como terapia neoadjuvante (G2), São Paulo, 2019

ID	Grau HP	Unidimensional (cm) T ₀	Unidimensional (cm) T ₄	Aumento (%)	RECIST	Bidimensional (cm²) T ₀	Bidimensional (cm²) T ₄	Aumento (%)	WHO	Volume (cm³) T ₀	Volume (cm³) T ₄	Aumento (%)	VOL	
4	I	3,75	---	---	---	9,15	---	---	---	19,02	---	---	---	
5	II	8,97	9,46	5,46	DE	63,5973	77,2882	21,53	DE	328,36	403,03	22,74	DE	
6	II	7,76	8,26	6,44	DE	42,7576	47,7428	11,66	DE	193,51	200,85	3,79	DE	
8	I	5,14	6,24	21,40	DP	21,9992	28,3296	28,78	DP	54,05	71,86	32,93	DE	
9	II	4,38	4,84	10,50	DE	15,33	23,958	56,28	DP	47,14	71,43	51,53	DP	
19	II	6,31	7,2	14,10	DE	17,7942	25,344	42,43	DP	48,12	89,52	86,02	DP	
20	I	2,95	3,64	23,38	DP	5,6345	9,3184	65,38	DP	12,20	19,75	61,85	DP	
21	I	6,1	6,65	9,01	DE	32,94	40,0995	21,73	DE	131,64	178,22	35,38	DE	
22	I	3,42	4,06	18,71	DE	7,6266	11,0432	44,80	DP	12,66	23,83	88,19	DP	
23	I	8,75	---	---	---	49,0875	---	---	---	187,81	---	---	---	
24	I	4,69	6,53	39,23	DP	13,0382	27,8178	113,36	DP	46,48	110,01	136,67	DP	
Total (n)					DE (n=6) DP (n=3)					DE (n=3) DP (n=6)				DE (n=4) DP (n=5)

Fonte: Castro (2019).

Notas: ID= Número de identificação do paciente; HP= Histopatológico; RECIST= Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos; WHO= *World Health Organization*; VOL= Critério Volumétrico; --- significa não realizado.

5.2.3 Exames termográficos

Para esta avaliação foram considerados apenas os cães do grupo G2 que receberam a FO-S como terapia neoadjuvante. Imagens termográficas foram realizadas em todos os momentos T_{0-4} para dez animais ($n=10/11$), o paciente ID9 foi excluído da análise por possuir TE apenas nos momentos T_0 e T_1 (Gráfico 1). A análise da diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) mostrou que o “tumor esfriou em relação ao tecido corpóreo” durante a terapia neoadjuvante ($AT-ANT T_{1-4} < AT-ANT T_0$) (Tabela 3), tendo sido constatada diferença estatística significativa ($p= 0,01416$) entre os momentos AT-ANT T_0 e AT-ANT T_1 ($p= 0,01802620$), AT-ANT T_0 e AT-ANT T_2 ($p= 0,01409357$) e AT-ANT T_0 e AT-ANT T_3 ($p= 0,03556224$) representada nos gráficos 2 e 3 que ilustram o comportamento desta variável. A figura 2 mostra a redução de temperatura do tumor em relação ao tecido corpóreo registrada nas imagens termográficas obtidas do paciente ID4, ao longo da terapia neoadjuvante com a FO-S.

Gráfico 1 - Comportamento individual da diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) durante terapia neoadjuvante com a FO-S para os pacientes do grupo G2

Fonte: Castro (2019).

Tabela 3 – Valores médios e desvios padrão da diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) durante terapia neoadjuvante com a FO-S para o grupo G2, São Paulo, 2019

	AT-ANT T ₀	AT-ANT T ₁	AT-ANT T ₂	AT-ANT T ₃	AT-ANT T ₄	Valor de p
Temperatura (°C)	0,93 ± 1,43	-0,28 ± 2,82	-0,36 ± 2,15	-0,18 ± 1,98	0,58 ± 0,88	0,01416

Fonte: Castro (2019).

Gráfico 2 - Valores médios e desvios-padrão da diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) durante terapia neoadjuvante com a FO-S para o grupo G2

Fonte: Castro (2019).

Gráfico 3 - Boxplot dos valores da diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) durante terapia neoadjuvante com a FO-S para o grupo G2

Fonte: Castro (2019).

Figura 2 - Imagens termográficas que mostram área tumoral (AT) e área não tumoral adjacente (ANT) em membro pélvico do cão ID4, pré tratamento (T_0) e durante a terapia neoadjuvante com FO-S (T_{1-4})

Fonte: Castro (2019)⁸.

5.2.4 Relação entre as variáveis volume e temperatura

Os gráficos 4 e 5 ilustram, respectivamente, comportamento e intensidade de correlação entre o volume (cm^3) e a diferença de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) entre área tumoral e não tumoral adjacente para os tumores do grupo G2, no intervalo dos momentos T_0 - T_3 . A análise não incluiu T_4 , visto que este momento não apresentou diferença estatística significativa quanto ao esfriamento tumoral em relação ao tecido corpóreo. Apesar de não apresentarem correlação estatística com nível de significância ($p=0,2132$), eles mantêm entre si uma correlação de média intensidade tendendo a baixa ($r=0,39$).

⁸ Fotos realizadas no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET-FMVZ/USP.

Gráfico 4 - Valores médios da diferença de temperatura entre áreas tumoral e não tumoral adjacente (AT-ANT) e o volume tumoral para os tempos T_0 e T_3 , para o grupo G2, que recebeu terapia neoadjuvante com FO-S

Fonte: Castro (2019).

Gráfico 5 - Curva de correlação entre volume e a temperatura dos tumores do grupo G2, que recebeu terapia neoadjuvante com FO-S

Fonte: Castro (2019).

5.2.5 Imuno-histoquímica

Para esta avaliação foram considerados todos os tumores de ambos os grupos G1 e G2, encaminhados para exame histopatológico. A técnica de IHQ pode ser empregada em 19 amostras tumorais (n=19/21) para determinação do subtipo histológico do STM, assim como para a determinação do grau de apoptose (caspase-3) e índice de proliferação celular (Ki67).

A comparação dos valores obtidos para grau de apoptose (caspase-3) (Tabela 4; Gráfico 6) e índice de proliferação celular (Ki67) (Tabela 5; Gráfico 7) entre os tumores ressecados não tratados com FO-S (Grupo G1) e os tratados com FO-S (Grupo G2) não mostrou diferença significativa entre os grupos em relação a caspase-3 segundo o grau tumoral STM I ($p=0,3663$) e STM II ($p=0,4543$), e nem em relação ao Ki67 segundo o grau tumoral STM I ($p=0,6588$) e STM II ($p=0,179$). Não foi possível realizar a comparação para o grau tumoral STM III já que nenhum animal do Grupo G2 apresentou essa classificação. Se desconsiderarmos o grau tumoral dos STM (I, II e III), não houve diferença entre os grupos em relação à caspase-3 ($p=0,7002$) e ao Ki67 ($p=0,7619$). A figura 3 mostra fotomicrografias das reações de imuno-histoquímica com os marcadores de apoptose (caspase-3) e de proliferação celular (Ki67) para o STM grau II, sendo um paciente de cada um dos grupos.

Tabela 4 - Valores de mediana e intervalo interquartil da caspase-3 para os grupos dos tumores ressecados não tratados com FO-S (G1) e tratados com FO-S (G2), segundo o grau tumoral, São Paulo, 2019

Caspase-3	G1	G2	Valor de p
STM I	0,5 (0-1,25)	1,5 (1-2)	0,3663
STM II	2,5 (1,75-3)	2 (1,5-2)	0,4543
STM III	0,5 (0,25-0,75)	-	N.A.

Fonte: Castro (2019).

Nota: - significa valor nulo.

Gráfico 6 - Boxplot da caspase-3 para os grupos dos tumores ressecados não tratados com FO-S (G1) e tratados com FO-S (G2) segundo o grau tumoral

Fonte: Castro (2019).

Tabela 5 - Valores de média e desvio padrão do Ki67 para os grupos dos tumores ressecados não tratados com FO-S (G1) e tratados com FO-S (G2), segundo o grau tumoral, São Paulo, 2019

Ki67	G1	G2	Valor de p
STM I	9,45 ± 5,21	10,88 ± 3,96	0,6588
STM II	17,92 ± 7,67	27,67 ± 8,15	0,179
STM III	21,15 ± 11,67	-	N.A.

Fonte: Castro (2019).

Nota: - significa valor nulo.

Gráfico 7 - Boxplot do Ki67 para os grupos dos tumores ressecados não tratados com FO-S (G1) e tratados com FO-S (G2) segundo o grau tumoral

Fonte: Castro (2019).

Figura 3 – Fotomicrografias representativas das reações de imuno-histoquímica para o STM grau II em cães. Marcador de apoptose (caspase-3) com marcação citoplasmática marrom-acastanhada: (A) caspase-3 score grau 2 - caso G2:ID6 e (B) caspase-3 score grau 3 - caso G1:ID1. Marcador de proliferação celular (Ki67) com marcação nuclear marrom-acastanhada (setas): (C) índice de proliferação celular de 30% - caso G2:ID6 e (D) índice de proliferação celular de 14,5% - caso G1:ID1

Fonte: Arquivo do Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular do Departamento de Patologia da FMVZ-USP.

5.3 INTERVALO LIVRE DE RECIDIVA LOCAL E SOBREVIDA

A tabela 6 relaciona os pacientes que não completaram 12 meses de acompanhamento e foram excluídos da análise para ILRL (n=15/21: G1=6 e G2=9) e aqueles que morreram de causas não relacionadas ao STM ou mudaram de tratamento e foram excluídos da análise para sobrevida (n=14/21: G1=6 e G2=8).

Tabela 6 – Pacientes excluídos das análises de intervalo livre de recidiva local e sobrevida, São Paulo, 2019

ID	Grupo	Motivo da exclusão	Exclusão para ILRL	Exclusão para sobrevida
2	G1	Eutanásia por neoplasia óssea aos 291 dias	Sim	Sim
3	G1	Óbito por IVCM descompensada aos 294 dias	Sim	Sim
15	G1	Óbito por afogamento aos 22 dias	Sim	Sim
16	G1	Tratamento interrompido pelo tutor	Sim	Sim
8	G2	Óbito por agravamento de enterite complicada por uso contínuo de corticosteroide (Síndrome vestibular 2ªria neoformação extra-axial intracraniana) aos 337 dias	Sim	Sim
9	G2	RTL aos 365 dias e início de outra terapia antineoplásica	Não	Sim
19	G2	Óbito por sepses associada a colangiocarcinoma hepático e pancreático aos 110 dias	Sim	Sim
Total (n)			n= 6	n= 7

Fonte: Castro (2019).

Nota: ID= Número de identificação do paciente; ILRL= Intervalo livre de recidiva local; IVCM= Insuficiência de válvula cardíaca mitral; RTL= Recidiva tumoral local

5.3.1 Intervalo livre de recidiva local

Não houve RTL para o grupo G1. Para o grupo G2, 88,9% mantiveram-se sem RTL aos 12 e 24 meses, visto que apenas um animal (ID9) apresentou recidiva aos 365 dias de acompanhamento. Como demonstrado no gráfico 8 abaixo, a diferença em relação à proporção de pacientes sem RTL não foi significativa entre os grupos G1 e G2 ($p = 0,41$).

Gráfico 8 - Curva de Kaplan-Meier para proporção de pacientes sem RTL para cada um dos grupos (G1 e G2)

Fonte: Castro (2019)

Se considerarmos ambos os grupos, e, portanto, **todos os pacientes que receberam a FO-S**, a proporção de cães sem RTL foi de 93,3% aos 12, 24 e 36 meses (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Curva de Kaplan-Meier para proporção de pacientes sem RTL para ambos os grupos (G1 + G2)

Fonte: Castro (2019).

Como apenas um paciente apresentou RTL, não foi possível calcular a mediana para ILRL. No entanto, ao considerarmos que a inclusão de pacientes ocorreu ao longo de um período de dois anos (agosto de 2015 a julho de 2017) e a data final estabelecida para a coleta de dados foi 31 de janeiro de 2019, alguns pacientes puderam ser acompanhados por um período superior a 12 meses. Este período de acompanhamento no qual nenhum paciente apresentou RTL, exceto o ID9 (G2) aos 365 dias, variou de 651 a 1169 dias (mediana= 778 dias) para o G1, de 365 a 1084 dias (mediana= 563 dias) para o G2, e se considerarmos ambos os grupos G1 e G2, e, portanto, **todos os pacientes que receberam a FO-S, variou de 365 a 1169 dias (mediana= 687 dias).**

5.3.2 Sobrevida

A sobrevida foi de 100%, 80% e 53,3% respectivamente aos 12, 24 e 36 meses para o grupo G1, com o primeiro óbito ocorrido aos 687 dias e o segundo aos 819 dias; para o G2 esta taxa manteve-se sempre em 100%, pois nenhum paciente morreu. Como demonstrado no gráfico 10, não houve diferença significativa entre os grupos G1 e G2 em relação à sobrevida ($p= 0,21$).

Gráfico 10 - Curva de Kaplan-Meier para taxa de sobrevida para cada um dos grupos (G1 e G2)

Fonte: Castro (2019).

Se considerarmos ambos os grupos, e, portanto, **todos os pacientes que receberam a FO-S**, a taxa de sobrevida aos 12 meses é de 100%, aos 24 meses é de 87,5% e aos 36 meses é de 72,9% (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Curva de Kaplan-Meier para taxa de sobrevida para ambos os grupos (G1 + G2)

Fonte: Castro (2019).

As duas mortes ocorridas no grupo G1 podem estar relacionadas ao STM, porém não foi possível sua confirmação pela impossibilidade de realização de necropsia. O paciente ID10 que morreu aos 687 dias em decorrência de coagulopatia por falência hepática, já apresentava nódulos hepáticos ao exame ultrassonográfico desde o controle realizado aos seis meses, que poderiam ou não ser metastáticos. Já o óbito do paciente ID7 aos 819 dias foi em decorrência do agravamento de quadro de dispneia que se iniciou 18 meses após a IC, ocasião em que foi diagnosticado nódulo pulmonar suspeito de ser metastático ao exame radiográfico simples realizado no HOVET-FMVZ/USP.

5.4 EFEITOS ADVERSOS DA FO-S

A terapia antineoplásica com FO-S foi bem tolerada, não tendo sido observado qualquer EA ocorrido durante o tratamento pelos cães de ambos os grupos (n=20: G1=9; G2=11). Para esta análise excluiu-se um animal que não recebeu tratamento completo por decisão do seu tutor (G1: ID16). Três pacientes que apresentavam valores laboratoriais alterados antes do início do tratamento foram desconsiderados para os seguintes EA: anemia (n=19) - cão ID3 do G1 cujo hematócrito encontrava-se abaixo do limite inferior; e toxicidade hepática (n=18) – cães ID5 e 9 ambos do G2, pois apresentavam FA acima do limite superior de referência.

As alterações laboratoriais observadas durante o período de tratamento dos cães, **apesar de não se relacionarem ao uso da FO-S** conforme discutidas posteriormente, foram: anemia leve grau 1 observada em 31,57% (6/19) dos pacientes em T₅; um paciente (G2: ID9) apresentou episódio isolado de neutropenia grau 1 (T₃) associado a níveis elevados de FA, triglicérides e colesterol séricos e um paciente (G2: ID5) apresentou aumento da alanina transaminase (ALT) grau 1 em T₁.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Para os 21 cães com STM considerados neste estudo clínico prospectivo, não foi observado predileção racial e não houve diferença significativa entre os grupos G1 e G2 em relação ao sexo e idade. O acometimento por STM em cães de idade média a avançada (mediana 10 anos) (MCSPORRAN, 2009), e ausência de predileção por sexo e raça reafirmam a literatura (LIPTAK; FORREST, 2007; HOHENHAUS et al., 2016).

O método mais utilizado *in vivo* para avaliar resposta tumoral à quimioterapia neoadjuvante é avaliar as modificações no tamanho tumoral, realizada por meio de medidas imaginológicas pré e pós terapia (STAHL et al., 2009). Os modelos anatômicos são baseados na suposição de que o encolhimento do tumor ocorre durante seu processo de desvitalização, induzido pela terapia. Acredita-se que esse decréscimo de tamanho seja um pré-requisito importante para um "*downstaging*" clinicamente bem sucedido, o que geralmente significa a obtenção de uma situação tumoral local que torna sua remoção cirúrgica completa mais fácil ou até possível (HOHENBERGER; WYSOCKI, 2008), ideal para casos de STM de grandes proporções, ou localizados em regiões anatômicas de difícil acesso.

Segundo as três diretrizes RECIST (unidimensional), WHO (bidimensional) e VOL (tridimensional), utilizadas na medicina para avaliar resposta clínica de pacientes tratados para STM (STAHL et al., 2009; GRABELLUS et al., 2012), e que também foram adotadas para avaliar a resposta tumoral à terapia instituída em nosso estudo, a análise dos valores obtidos pelas imagens tomográficas mostrou que **nenhum paciente apresentou resposta completa ou parcial classificadas como "respondeu à FO-S com citorredução"**. Tais resultados não corroboram aqueles encontrados em estudos laboratoriais nos quais a FO-S demonstrou potencial para induzir redução do volume tumoral em camundongos (FERREIRA et al., 2011) e ratos (VERONEZ, 2012) portadores de melanoma.

A desvantagem de usar apenas os critérios de resposta anatômica dos tumores é a ausência de qualquer informação sobre alterações funcionais (biológicas) induzidas pela terapia. Esta deficiência foi notada quando uma série de tumores estromais gastrointestinais (GIST) tratados foi investigada, e os critérios de resposta baseados em tamanho subestimaram drasticamente o sucesso do tratamento (CHOI

et al., 2007), pois a identificação de diferentes padrões de regressão microscópica ou macroscópica, como necrose, fibroesclerose, degeneração cística ou hemorragia não foram considerados.

Em relação a tais alterações patológicas, Grabellus et al. (2012) observou em estudo com sarcomas não ressecáveis em membros perfundidos com TNF- α e melfalan (TM-ILP) uma associação positiva entre degeneração cística e/ou hemorragia e aumento do tamanho do tumor; todos os tumores com um aumento de tamanho detectável após a terapia apresentaram o fenótipo necrótico predominante e, o fenótipo fibrosclerótico de regressão foi determinado como sendo mais significativamente associado com a diminuição do tamanho do tumor. Assim, de acordo com este autor, todos os três critérios de resposta anatômica com base no tamanho são bastante precisos para determinar se um tumor pertence predominantemente ao fenótipo de regressão fibroesclerótico ou necrótico. Ainda, este estudo forneceu evidências de que o fenótipo fibrosclerótico de regressão está mais fortemente associado à retração do tumor do que a necrose, um fenômeno que pode ser parcialmente explicado pela disposição de tumores necróticos para se tornar císticos ou levar à hemorragia. Observaram também saturação com fluido seroso, que às vezes foi aprisionado em fendas não císticas em sarcomas extensivamente necróticos. Estas razões explicam o porquê alguns tumores altamente desvitalizados aumentam após a terapia, e suportam a noção de que avaliações anatômicas de resposta clínica, puramente baseadas em tamanho, não devem ser as únicas formas de avaliarmos resposta tumoral à determinado agente antineoplásico.

É fato que mudanças fisiológicas podem ser notadas antes que ocorram mudanças anatômicas comumente diagnosticadas por métodos de imagem radiológico, tomográfico ou de ressonância magnética (VAINIONPÄÄ, 2014). Em estudo que monitorou os efeitos do tratamento após terapia de onda de choque extracorpórea concentrada em membros de equinos, foram alcançados resultados correspondentes com o uso de imagens termográficas e cintilográficas nucleares, ambos considerados métodos de imagem fisiológica (RINGER; LISCHER; UELTSCHI, 2005).

Em nosso estudo a termografia demonstrou **redução da temperatura média tumoral em relação ao tecido não tumoral adjacente durante a terapia neoadjuvante**, que pode ser considerada uma mudança fisiológica relacionado à queda no metabolismo e/ou diminuição no aporte sanguíneo tumoral (VAN

HOOGMOED; SNYDER, 2002), com consequente esfriamento devido a fenômeno isquêmico ou necrótico (REDAELLI et al., 2014) e/ou ao decaimento das células tumorais por citotoxicidade das células inflamatórias (POLJAK-BLAZI et al., 2009), ou ainda, simplesmente devido à má vascularização de tumores de crescimento rápido (XIE et al., 2004; SONG et al., 2007). O uso de medicações sedativas e/ou anestésicas afeta a temperatura superficial, que deve ser levado em consideração se a imagem termográfica for utilizada em pacientes sob tais condições (VAINIONPÄÄ, 2014), e pode justificar o fato do esfriamento tumoral com significância estatística ocorrido em T₁₋₃, não ter se mantido com a mesma magnitude em T₄, momento no qual as imagens foram adquiridas com os pacientes já sedados em preparo para realização do procedimento cirúrgico.

O uso da termografia no cenário clínico e científico apresenta limitações pela falta de especificidade, pois indica um padrão quente ou frio, mas não diferencia a etiologia do processo (VAN HOOGMOED; SNYDER, 2002), o que nos impossibilita garantir que houve uma redução na temperatura tumoral observada na maioria dos pacientes atribuída exclusivamente à ação local da FO-S, que pode estar relacionada à sua capacidade em promover diminuição da vascularização intratumoral e necrose (FERREIRA et al., 2011; VERONEZ, 2012). No estudo de Ferreira et al. (2011), a análise histológica de tumores de melanoma B16F10 em camundongos mostrou diminuição dos vasos sanguíneos fenestrados recém-formados no grupo tratado com FO-S e seu aumento no grupo controle. Veronez (2012) observou maior porcentagem de áreas de necrose nas massas tumorais de ratos (aumento de aproximadamente 72%) do grupo tratado com a maior dose de fosfoetanolamina durante 20 dias (40mg/kg), enquanto nenhuma diferença foi verificada após tratamento por menor período (10 dias). Em 2013, Ferreira et al. (2013a) comprovou a atividade antiangiogênica da FO-S *in vitro* por sua capacidade em inibir proliferação celular, migração e formação de tubos semelhantes a capilares.

No estudo de Poljak-Blazi et al. (2009) foi observada a redução da temperatura superficial da pele no local inoculado com células tumorais no período inicial, e seu aumentou gradativo com o crescimento progressivo do tumor e neoangiogênese até tornar-se mais elevada no 10º e 11º dia após a inoculação. A redução da temperatura no período precoce logo após a implantação tumoral assemelha-se à necrose, e provavelmente não foi causado apenas pelo suprimento insuficiente de sangue no início do desenvolvimento do tumor, mas também pela citotoxicidade das células

inflamatórias (resposta imune) e consequente decaimento nas células tumorais. Processo similar também pode ter ocorrido com o STM em cães durante a administração da FO-S, visto que tumores de melanoma em ratos tratados com FO-S apresentaram histologicamente comprovada infiltração predominante por neutrófilos, além da diminuição nos vasos sanguíneos recém-formados (FERREIRA et al., 2011).

Outra possibilidade seria a redução da temperatura tumoral em decorrência de má vascularização como consequência de crescimento rápido dos tumores, citado por Xie et al. (2004) e observado por Song et al., (2007) em estudo com xenoinxertos de células de câncer de mama em ratos. No entanto, os STM usualmente não se apresentam com crescimento rápido, pelo contrário, costumam ter evolução lenta (STEFANELLO et al., 2008), e apesar dos dados dos exames tomográficos terem demonstrado que os tumores aumentaram de volume enquanto a termografia mostrou que eles esfriaram em relação ao tecido corpóreo, durante o mesmo período de tratamento com a FO-S (Grupo G2 – terapia neoadjuvante), não houve correlação estatística com nível de significância entre estas variáveis ($p= 0,2132$), tendo sido observado uma correlação de média intensidade tendendo a baixa ($r=0,39$).

Diferente dos resultados de imuno-histoquímica encontrados por Veronez (2012) em estudo com melanoma murino, no qual os efeitos da fosfoetanolamina sobre as células tumorais ficou evidenciado pelo aumento da apoptose (marcação para caspase-3) e diminuição da sua proliferação (marcação para PCNA), em nosso estudo este método **não detectou o aumento da apoptose pela marcação da caspase-3 e/ou diminuição da proliferação celular pela marcação de Ki67 nos tecidos tumorais estratificados por grau tumoral, de cães que receberam a FO-S (Grupo G2) quando comparados aos tecidos tumorais oriundos do grupo não tratado (Grupo G1)**. Um dos motivos pode estar relacionado à dose e posologia empregadas (70 mg/kg/IV/semanal/4 semanas), se considerarmos que mesmo no estudo de Veronez (2012) o tratamento com diferentes doses e posologia de fosfoetanolamina (10, 20 e 40mg/Kg/VO/diária, durante 10 ou 20 dias consecutivos) induziu o aumento no número de células apoptóticas nos tecidos tumorais, com exceção da menor dose/posologia (10 mg/Kg/VO/10 dias). No estudo de Ferreira et al. (2011) a detecção da caspase-3 nas células obtidas dos tumores foi realizada por citometria de fluxo, e demonstrou o aumento da atividade da caspase-3 com significância estatística em camundongos com melanoma tratados com FO-S nas doses de 7 e 14 mg/Kg/IP/EDA/50 dias. Em outro estudo deste mesmo grupo, o

tratamento de células de melanoma B16F10 com FO-S resultou em uma inibição dose-dependente da viabilidade celular com aumento da caspase-3 e indução do processo de apoptose (FERREIRA et al., 2012b).

Outra possibilidade que devemos considerar é a constatação de um viés em nosso estudo, visto que as amostras de tecido tumoral comparadas entre si não foram oriundas do mesmo paciente, ou seja, a amostra que não foi tratada com FO-S (grupo G1) não é a mesma analisada após seu tratamento (grupo G2); os grupos G1 e G2 são compostos por diferentes cães, portanto, variações individuais podem ter ocorrido apesar dos tumores terem sido estratificados e comparados segundo o mesmo grau tumoral. Esta estratificação objetivou nivelar os tumores do mesmo grau e diminuir as diferenças individuais nas marcações de Ki67 e caspase-3. Como demonstrado em estudo com 40 amostras tumorais de fibrossarcoma em cães, houve correlação estatística significativa do Ki67 e da análise da intensidade de apoptose com o grau de malignidade tumoral; a expressão do Ki67 foi marcadamente diferente entre os tumores dos graus II e III e a análise da intensidade da apoptose mostrou diferenças significativas no número de células apoptóticas entre os três graus de malignidade (MADEJ et al., 2014). Ainda, dentro deste contexto, ressalta-se que o percentual de marcação de Ki67 em STM de cães, por exemplo, variou de 0,8% a 36,2% para tumores de parede perivascular (AVALLONE et al., 2015) e de 1,1% a 76,8% para lipossarcomas (AVALLONE et al., 2016), o que representa uma margem ampla de valores, além de não incluir tumores de bainha neural, o tipo prevalente em nosso estudo (n=16).

Se considerarmos que os tumores com um aumento de tamanho detectável após terapia apresentam predominantemente fenótipo necrótico (GRABELLUS et al., 2012), que mudanças fisiológicas podem ser notadas antes que ocorram mudanças anatômicas potenciais (VAINIONPÄÄ, 2014), que o esfriamento tecidual detectado pela termografia pode ser devido a fenômeno isquêmico ou necrótico (REDAELLI et al., 2014), que o tratamento de ratos com melanoma com a menor dose de fosfoetanolamina não induziu o aumento detectável no número de células apoptóticas e na porcentagem de áreas de necrose como constatado com o uso de doses maiores (VERONEZ, 2012), que melanomas de camundongos tratados com FO-S nas doses de 7 e 14 mg/Kg/IP/EDA/50 dias induziram histologicamente infiltração predominante com neutrófilos e diminuição nos vasos sanguíneos recém-formados (FERREIRA et al., 2011) e que a FO-S resultou em uma inibição dose-dependente da viabilidade

celular com aumento da caspase-3 e indução do processo de apoptose (FERREIRA et al., 2012b), podemos inferir que em nosso estudo com cães acometidos por STM de ocorrência espontânea, a dose de 70 mg/kg/IV utilizada em intervalos semanais, durante apenas quatro semanas, não foi suficiente para induzir citotoxicidade com a mesma magnitude comprovada por estudos anteriores (MENEGUELO, 2007; FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012a; FERREIRA et al., 2012b; VERONEZ, 2012; FERREIRA et al., 2013b; FERREIRA et al., 2013a; LUNA et al., 2014), mas pode ter sido a causa da mudança fisiológica que gerou alterações superficiais de temperatura visualizadas nas imagens termográficas (VAN HOOOGMOED; SNYDER, 2002) dos pacientes em tratamento com a FO-S, representadas pela redução da temperatura média tumoral em relação ao tecido não tumoral adjacente com diferença estatística significativa ($p= 0,01416$).

Em nosso estudo que **incluiu apenas casos nos quais a exérese cirúrgica foi realizada com margens livres confirmadas pelo HP**, não houve RTL para o grupo G1 e apenas um animal do grupo G2 (ID9) apresentou recidiva aos 365 dias de acompanhamento, o que representou 6,7% (1/15) do total de pacientes tratados com FO-S acompanhados para ILRL ($n=15/21$: G1=6 e G2=9), exatamente o mesmo valor (6,7%, 1/15) encontrado por Banks et al., (2004) em pesquisa com tumores operados por cirurgiões oncologistas, os quais 80% apresentaram-se com margens cirúrgicas livres e 20% estreitas. Se considerarmos apenas os tumores ressecados com margens livres, no estudo de Kuntz et al. (1997) a recidiva foi de 5,13% (2/39) e no estudo de McSporran (2009) não houve recidiva (0/30). Em outro estudo nos quais os cães com STM foram tratados com radioterapia após ressecção cirúrgica marginal intencional, a taxa de RTL foi de 24,5% (13/53) (DEMETRIOU et al., 2012). Em relação a **todos os pacientes que receberam a FO-S**, observamos 93,3% dos pacientes sem RTL aos 12, 24 e 36 meses, visto que nenhum outro paciente apresentou RTL até a data final para a coleta de dados. Com isto, nossos resultados superam os 81% e 70% sem RTL (margem HP marginal + radioterapia) respectivamente aos 12 e 36 meses encontrados por Demetriou et al. (2012) e os 90% e 82% sem RTL (com e sem margens HP livres) respectivamente aos 12 e 24 meses obtidos por Kuntz et al. (1997), igualam-se aos 93% sem RTL (com e sem margens HP livres) aos 12 meses de Banks et al., (2004) e são superados pelos 100% sem RTL (com margens livres) aos 24 meses de McSporran (2009).

É provável que o emprego da técnica cirúrgica adequada (DERNELL et al., 1998; EHRHART, 2005), que propiciou ressecção tumoral com margens cirúrgicas livres de células neoplásicas para todos os cães, tenha sido o fator preponderante para a ocorrência de apenas um caso de RTL em nosso estudo. Margens histológicas livres foi o único fator prognóstico para controle de recidiva local que apresentou correlação significativa em análise multivariada realizada por Kuntz et al. (1997) e o fator prognóstico mais importante para RTL pela análise de McSporran (2009). Outros estudos que avaliaram a margem cirúrgica e sua relação com a RTL descobriram que uma excisão ampla diminui a probabilidade de RTL (BANKS et al., 2004; DENNIS et al., 2011; MONTEIRO; BOSTON; MONTEITH, 2011; STEFANELLO et al., 2011). Apesar do baixo nível de evidência de estudos individuais, o fato de vários estudos relatarem o mesmo resultado leva à conclusão de que a excisão completa é um determinante crítico para RTL (HOHENHAUS et al., 2016).

Em um dos cães que apresentou recidiva no estudo de Kuntz et al. (1997), o tumor apresentava a maior taxa de mitose e necrose tumoral e foi ressecado com margens livres (amputação do membro comprometido pelo tumor). Em nosso estudo, o tumor que recidivou era de bainha neural classificado como STM grau II, e apesar de apresentar mitoses 0 a 9 e necrose < 50%, apresentou o maior Ki67 (33,7%). Na literatura, o percentual de marcação de Ki67 em STM de cães variou de 0,8% a 36,2% (mediana, 7,20%) para tumores de parede perivascular (AVALLONE et al., 2015) e de 1,1% a 76,8% (média de 20,6%, mediana de 14,9%) para lipossarcomas (AVALLONE et al., 2016). Um estudo com fibrossarcomas em cães identificou correlação estatística significativa do Ki67 com o grau de malignidade tumoral, visto que sua expressão foi marcadamente diferente entre os tumores dos graus II e III ($p=0,0005$) (MADEJ et al., 2014). O índice alto de Ki67 tem sido positivamente correlacionado com metástase, morte por neoplasia, baixas taxas de sobrevida livre de doença e baixas taxas de sobrevida global em cães e em humanos (RODRIGUES et al., 2016), e pode ter sido a principal causa da RTL ocorrida em nosso paciente. Pelo fato deste tumor localizar-se em extremidade de membro, apresentar-se fortemente aderido a planos profundos - evidenciado por palpação e confirmado pelas características observadas ao exame de TC (sem formato, com limites pouco definidos e indissociável de músculos) - a amputação estaria indicada para garantir aquisição de margens cirúrgicas livres de células neoplásicas. No entanto, a amputação não deve ser proposta em cães com doença ortopédica e/ou neurológica (STEFANELLO et al., 2008), e este paciente era

de meia idade (9 anos), encontrava-se acima do peso ideal e com limitação locomotora devido a doença do disco intervertebral, portanto se beneficiaria da manutenção do membro torácico acometido pelo tumor. Devido à baixa taxa de metástase e ao comportamento lento de crescimento local do STM canino, a amputação pode ser considerada um tratamento de último recurso reservado para tumores recorrentes (STEFANELLO et al., 2008).

Como ocorreu com Banks et al. (2004), em nosso estudo apenas um paciente apresentou RTL e, portanto, não foi possível calcular a mediana para ILRL. Já no estudo de Demetriou et al. (2012), a mediana para o ILRL não pode ser estabelecida porque a maioria dos cães morreu sem recidiva tumoral. Como os cães afetados por STM geralmente são de meia idade a idosos, eles costumam morrer de outras causas que não aquelas relacionadas ao STM, visto que o tempo médio de sobrevida após excisão ampla destes tumores em cães costuma ser longo (varia de 1.013 a 1.416 dias) (DENNIS et al., 2011), o que pode dificultar a avaliação do ILD nestes pacientes.

Observamos em nosso estudo **duas mortes que “podem estar relacionadas ao STM”, porém não foi possível sua confirmação pela impossibilidade de realização de necropsia**. Uma delas aos 687 dias em decorrência de coagulopatia por falência hepática, na qual o paciente (G1: ID10 - STM grau II com 10 a 19 mitoses, < 50% necrose, ki67= 18,5% e caspase-3= score 2) já apresentava nódulos hepáticos ao exame ultrassonográfico desde o controle realizado aos seis meses, que poderiam ou não ser metastáticos; e a outra aos 819 dias, em decorrência do agravamento de quadro de dispneia que se iniciou 18 meses após a IC, ocasião em foi diagnosticado nódulo pulmonar suspeito de ser metastático ao exame radiográfico simples (paciente G1: ID7- STM grau II com 0 a 9 mitoses, < 50% necrose, ki67= 10,4 e caspase-3= score 3). Como demonstrado pela curva de Kaplan-Meier para sobrevida (Gráfico 10), não houve diferença significativa entre os grupos G1 e G2 ($p= 0,21$). Assim, se considerarmos ambos os grupos para comparação com os dados da literatura (Apêndice C), e, portanto, **todos os pacientes que receberam a FO-S**, durante um período de acompanhamento que variou de 365 a 1169 dias (mediana= 687 dias), a taxa de sobrevida aos 12 meses foi 100%, aos 24 meses 87,5% e aos 36 meses 72,9%, equiparando-se a ausência de óbito relacionado aos STM aos 12 meses observado por Banks et al. (2004) e superando as taxas de 33% (25/75) em período de acompanhamento de 183 a 1911 dias (mediana 579 dias) observada por Kuntz et al. (1997) e de 25% (13/53) em período de acompanhamento de 426 a 2035 dias

(mediana 1339 dias) observada por Demetriou et al. (2012). No entanto, qualquer tentativa de correlacionar as taxas de sobrevida encontrada entre nosso estudo e os da literatura torna-se impraticável, devido ao grande número de variáveis, incertezas quanto a “*causa mortis*”, dados incompletos e diferentes métodos de análise adotados. Em estudos de laboratório desenvolvido em camundongos com melanoma, as taxas de sobrevivência foram significativamente aumentadas nos grupos tratados com FO-S (7 mg/Kg/IP/EDA/50 dias e 14mg/Kg/IP/EDA/50 dias) em relação aos outros grupos (controle e tratados com Taxol®⁹) (FERREIRA et al., 2011).

A anemia leve grau 1 observada em 31,57% dos pacientes (6/19) em T₅, pode ser relacionada à perda sanguínea secundária à exérese tumoral, e não à terapia antineoplásica com FO-S, visto sua ocorrência ter sido no período pós-operatório com retorno aos valores normais em período subsequente, exceto por um paciente (G1: ID18) que manteve o quadro anêmico também em T₆ e T₇, justificado pela realização de segundo procedimento cirúrgico em T₆ para reversão do flap em bolsa.

Apenas um paciente (G2: ID9) apresentou episódio isolado de neutropenia grau 1 (T₃) associado a níveis elevados de FA, triglicérides e colesterol séricos, atribuído à terapia com corticóide recebida antes e durante o tratamento para STM, devido a quadro de dermatite atópica. Como este paciente iniciou a terapia neoadjuvante com FO-S em fase de redução da dose de corticóide, optou-se por não o excluir do estudo.

Nenhum paciente apresentou trombocitopenia. A administração de FO em ratos sem tumor não interferiu no número de eritrócitos e contagem de plaquetas (VERONEZ, 2012).

Quanto à toxicidade hepática, um paciente (G2: ID5) apresentou aumento da ALT grau 1 em T₁, não considerado EA relacionado à terapia antineoplásica. Este cão já possuía valor de FA acima do superior de referência antes do início da terapia, associado a um único episódio de aumento de ALT em T₁ que podem ser justificados por doença hepática assintomática, visto que o exame ultrassonográfico realizado previamente ao início da terapia mostrava fígado com dimensões aumentadas e ecotextura grosseira em algumas regiões. Este mesmo exame realizado no controle após seis meses mostrou o fígado com dimensões preservadas, porém ecotextura grosseira com pequena área irregular tendendo a nodular de aproximadamente 1,39 cm de diâmetro, a qual apesar de inicialmente ter sido considerada “suspeita para

⁹ Taxol® (paclitaxel) - Bristol-Myers Squibb Farmacêutica LTDA.

metástase à distância” ou associada à doença inflamatória intestinal diagnosticada nesta ocasião, confirmou tratar-se de carcinoma hepatocelular, através de lobectomia hepática realizada 18 meses após o término do tratamento. Ensaio *in vivo* em camundongos com o uso da FO-S já tinham demonstrado a ausência de toxicidade hepática (FERREIRA et al., 2012a).

Nenhum paciente apresentou sinais de toxicidade renal: creatinina.

Para os pacientes que apresentaram hiporexia ou anorexia no período de até 48 horas de pós-operatório imediato, tais sinais clínicos não foram considerados EA por estarem relacionados diretamente ao procedimento anestésico-cirúrgico, e serem vistos com frequência na rotina geral pós-operatória. Assim, foi nula a ocorrência de anorexia. Também não foram relatados episódios de êmese ou diarreia.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

1. o fosfolípídeo antineoplásico FO-S na dose e posologia empregadas não demonstrou efeito citorredutor para STM em cães;
2. a redução significativa da temperatura cutânea da área tumoral em relação a área não tumoral adjacente sugere a ocorrência de mudança fisiológica, que pode estar relacionado ao tratamento com o fosfolípídeo antineoplásico FO-S;
3. não houve diferença significativa para taxa de RTL e sobrevida entre os grupos G1 e G2;
4. o fosfolípídeo antineoplásico FO-S na dose e posologia empregadas não causou efeitos adversos e mostrou-se seguro para utilização em cães com STM.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AVALLONE, G. et al. Growth factors and COX2 expression in canine perivascular wall tumors. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 6, p. 1034–1040, 2015. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/0300985815575050>>. Acesso em: 9 jan. 2017.

AVALLONE, G. et al. Histological classification and immunohistochemical evaluation of MDM2 and CDK4 expression in canine liposarcoma. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 4, p. 773–780, 2016. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985815626573>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

BAKOVIC, M.; FULLERTON, M. D.; MICHEL, V. Metabolic and molecular aspects of ethanolamine phospholipid biosynthesis: the role of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, n. 3, p. 283–300, 2007. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/O07-006>>. Acesso em: 4 fev. 2017.

BALASUBRAMANIAN, K.; MIRNIKJOO, B.; SCHROIT, A. J. Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 25, p. 18357–64, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470427>>. Acesso em: 4 fev. 2017.

BANKS, T.; STRAW, R.; THOMSON, M.; POWERS, B. Soft tissue sarcomas in dogs: a study assessing surgical margin, tumor grade and clinical outcome. **Australian Veterinary Practitioner**, v. 34, n. 4, p. 142–147, 2004.

BRAY, J. P. Soft tissue sarcoma in the dog - part 1: a current review. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 10, p. 510–519, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jsap.12556>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

BRIOSCHI, M. L.; MACEDO, J. F.; MACEDO, R. de A. C. Termometria cutânea: novos conceitos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 2, n. 2, p. 151–160, 2003. Disponível em: <<http://www.jvascbr.com.br/03-02-02/03-02-02-151/03-02-02-151.htm>>. Acesso em: 18 maio. 2015.

BROUCKAERT, G. et al. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 3, p. 1089–100, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14668480>>. Acesso em: 4 fev. 2017.

CHAPPELL, R.; MIRANPURI, S. S.; MEHTA, M. P. Dimension in defining tumor response. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 16, n. 3, p. 1234, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9508213>>. Acesso em: 6 jan. 2019.

CHOI, H. et al. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 13, p. 1753–1759, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470865>>. Acesso em: 24 fev. 2019.

COINDRE, J. M. et al. Histopathologic grading in spindle cell soft tissue sarcomas. **Cancer**, v. 61, n. 11, p. 2305–9, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3365658>>. Acesso em: 19 maio 2015.

COINDRE, J. M. et al. Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. **Cancer**, v. 91, n. 10, p. 1914–26, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11346874>>. Acesso em: 26 maio 2015.

COLLABORATION, S. M.-A. Adjuvant chemotherapy for localised resectable soft-tissue sarcoma of adults: meta-analysis of individual data. **Lancet**, v. 350, n. 9092, p. 1647–54, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9400508>>. Acesso em: 26 maio 2015.

DEMETRIOU, J. L. et al. Intentional marginal excision of canine limb soft tissue sarcomas followed by radiotherapy. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 3, p. 174–181, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-5827.2011.01186.x>>. Acesso em: 11 jul. 2017.

DENNIS, M. M. et al. Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 73–84, 2011. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/48/1/73.abstract>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

DERNELL, W. S. et al. Principles of treatment for soft tissue sarcoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 59–64, 1998. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031990267&partnerID=tZOTx3y1>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

DHAKSHINAMOORTHY, S. et al. Metabolomics identifies the intersection of

phosphoethanolamine with menaquinone-triggered apoptosis in an in vitro model of leukemia. **Mol. BioSyst.**, v. 11, n. 9, 2015.

DICKINSON, I. C. et al. Surgical margin and its influence on survival in soft tissue sarcoma. **ANZ Journal of Surgery**, v. 76, n. 3, p. 104–9, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16626341>>. Acesso em: 24 maio 2015.

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. 124–133, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com.ez67.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0034528816300273?via%3Dihub>>. Acesso em: 3 maio 2018.

EHRHART, N. Soft-tissue sarcomas in dogs: a review. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 41, n. 4, p. 241–246, 2005. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-31844437069&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 24 maio 2015.

ENGELLAU, J. et al. Identification of low-risk tumours in histological high-grade soft tissue sarcomas. **European Journal of Cancer**, v. 43, n. 13, p. 1927–34, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627813>>. Acesso em: 24 maio 2015.

FERREIRA, A. K. et al. 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. 3, p. 53–59, 2011. Disponível em: <<http://omicsonline.org/synthetic-phosphoethanolamine-induces-apoptosis-through-caspase-3-pathway-by-decreasing-expression-1948-5956.1000058.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2015

FERREIRA, A. K. et al. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. **Anticancer Research**, v. 32, n. 1, p. 95–104, 2012a. Disponível em: <<http://ar.iiarjournals.org/content/32/1/95.abstract>>. Acesso em: 23 maio 2015.

FERREIRA, A. K. et al. 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. 7, p. 541–8, 2012b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332212000571>>. Acesso em: 23 maio 2015.

FERREIRA, A. K. et al. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e57937, 2013a. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3597720&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 maio 2015.

FERREIRA, A. K. et al. 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. 481–487, 2013b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332213000152?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 mar. 2019.

FERREIRA, A. K. et al. Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. **British Journal of Cancer**, v. 109, n. 11, p. 2819–2828, 2013c. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/bjc.2013.510>>. Acesso em: 9 jan. 2017.

FERREIRA, D. dos S. et al. pH-sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment. **Therapeutic Delivery**, v. 4, n. 9, p. 1099–123, 2013d. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024511>>. Acesso em: 23 maio 2015.

FÖLSCH, G.; ÖSTERBERG, R. The apparent acid ionization constants of some peptides and related compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 9, p. 2298–2303, 1959. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/234/9/2298.full.pdf+html>>. Acesso em: 9 jan. 2017.

GAUTHERIE, M.; GROS, C. M. Breast thermography and cancer risk prediction. **Cancer**, v. 45, n. 1, p. 51–6, 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7351006>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20503434>>. Acesso em: 23 maio 2015.

GRABELLUS, F. et al. Size-based clinical response evaluation is insufficient to assess clinical response of sarcomas treated with isolated limb perfusion with TNF- α and melphalan. **Annals of Surgical Oncology**, v. 19, n. 11, p. 3375–3385, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22622472>>. Acesso em: 18 abr. 2015.

HOHENBERGER, P.; WYSOCKI, W. M. Neoadjuvant treatment of locally advanced soft tissue sarcoma of the limbs: which treatment to choose? **The Oncologist**, v. 13,

n. 2, p. 175–186, 2008. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305063>>. Acesso em: 24 fev. 2019.

HOHENHAUS, A. E. et al. Canine cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcoma: an evidence-based review of case management. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 52, n. 2, p. 77–89, 2016. Disponível em:
<<http://jaaha.org/doi/10.5326/JAAHA-MS-6305>>. Acesso em: 9 jan. 2017.

HUANG, W.-C. et al. Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy. **Journal of Lipids**, v. 2011, p. 565316, 2011. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3066853&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 maio 2015.

INFERNUSO, T. et al. Thermal imaging of normal and cranial cruciate ligament-deficient stifles in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 39, n. 4, p. 410–7, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20459492>>. Acesso em: 18 maio 2015.

KOMDEUR, R. et al. Metastasis in soft tissue sarcomas: prognostic criteria and treatment perspectives. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 21, n. 2, p. 167–183, 2002. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036432822&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 14 maio 2015.

KUNTZ, C. A. et al. Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue sarcomas in dogs: 75 cases (1986-1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 211, n. 9, p. 1147–1151, 1997.

LAHIRI, B. B. et al. Medical applications of infrared thermography: a review. **Infrared Physics & Technology**, v. 55, n. 4, p. 221–235, 2012. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350449512000308?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

LAWSON, R. Implications of surface temperatures in the diagnosis of breast cancer. **Canadian Medical Association Journal**, v. 75, n. 4, p. 309–11, 1956. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1824571&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 maio 2015.

LIPTAK, J. M.; FORREST, L. J. Soft tissue sarcomas. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. (Ed.). **Small animal clinical oncology**. 4th. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2007. p. 425–454.

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. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/full/10.2460/ajvr.68.10.1064>>. Acesso em: 18 maio 2015.

LUNA, A. C. D. L. et al. The new potential pharmacological of liposomal formulation in tumors. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Microscopy**: advances in scientific research and education. Badajoz: FORMATEX, 2014. p. 557–563.

LUNA, A. C. de L. **Potencial antitumoral da formulação lipossomal DODAC/fosfoetanolamina sintética no modelo de hepatocarcinoma**. 2017. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5167/tde-15122017-092710/>>. Acesso em: 2 mar. 2019.

MACEWEN, E. G.; POWERS, B. E.; MACY, D. Soft tissue sarcomas. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. (Ed.). **Small animal clinical oncology**. 3rd. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001. p. 283–304.

MADEJ, J. A. et al. Correlation between expressions of hypoxia-inducible factor (HIF-1 α), blood vessels density, cell proliferation, and apoptosis intensity in canine fibromas and fibrosarcomas. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 58, n. 1, p. 117–123, 2014. Disponível em: <<http://content.sciendo.com/view/journals/bvip/58/1/article-p117.xml>>. Acesso em: 25 maio 2019.

MAGALHAES, C.; VARDASCA, R.; MENDES, J. Recent use of medical infrared thermography in skin neoplasms. **Skin Research and Technology**, v. 24, n. 4, p. 587–591, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/srt.12469>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

MAULDIN, G. N. Soft tissue sarcomas. **The Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 27, n. 1, p. 139–148, 1997. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030636413&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 18 maio 2015.

MCKEE, M. D. et al. The prognostic significance of margin width for extremity and trunk sarcoma. **Journal of Surgical Oncology**, v. 85, n. 2, p. 68–76, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14755506>>. Acesso em: 4 maio 2015.

MCSPORRAN, K. D. Histologic grade predicts recurrence for marginally excised canine subcutaneous soft tissue sarcomas. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 5, p. 928–33, 2009. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/46/5/928.abstract>>. Acesso em: 12 maio 2015.

MELO, S. R. **Fatores prognósticos em mastocitoma canino**: correlação entre parâmetros clínicos, histológicos, marcadores de proliferação e análise termográfica. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MELO, S. R. et al. 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**. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação da Interunidades em Bioengenharia (EESC/FMRP/IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-12022008-135651/pt-br.php>>. Acesso em: 12 maio 2015.

MILLER, A. B. et al. Reporting results of cancer treatment. **Cancer**, v. 47, n. 1, p. 207–214, 1981. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0142%2819810101%2947%3A1%3C207%3A%3AAID-CNCR2820470134%3E3.0.CO%3B2-6>>. Acesso em: 22 maio 2019.

MONTEIRO, B.; BOSTON, S.; MONTEITH, G. Factors influencing complete tumor excision of mast cell tumors and soft tissue sarcomas: a retrospective study in 100 dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n. 11, p. 1209, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez67.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC3196013/>>. Acesso em: 4 abr. 2019.

MURRAY, M. et al. Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 150, p. 109–128, 2015.

NOWAKOWSKI, A. Advances of quantitative IR-thermal imaging in medical diagnostics. **Brain**, v. 10, p. 1–3, 2006. Disponível em: <<http://www.qirt.org/archives/qirt2006/papers/101.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2019.

O'DONOVAN, N. et al. Caspase 3 in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 2, p. 738–42, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12576443>>. Acesso em: 8 maio 2019.

PERVAIZ, N. et al. A systematic meta-analysis of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy for localized resectable soft-tissue sarcoma. **Cancer**, v. 113, n. 3, p. 573–581, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18521899>>. Acesso em: 29 jan. 2017.

POLJAK-BLAZI, M. et al. 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. 431–6, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232842>>. Acesso em: 18 maio 2015.

RAMOS-VARA, J.; BORST, L. Immunohistochemistry: fundamentals and applications in oncology. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 5th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2016. p. 44–87.

REDAELLI, V. et al. Use of thermographic imaging in clinical diagnosis of small animal : preliminary notes. **Ann Ist Super Sanità**, v. 50, n. 2, p. 140–146, 2014.

RINGER, S. K.; LISCHER, C. J.; UELTSCHI, G. Assessment of scintigraphic and thermographic changes after focused extracorporeal shock wave therapy on the origin of the suspensory ligament and the fourth metatarsal bone in horses without lameness. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 10, p. 1836–42, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16273919>>. Acesso em: 1 maio 2019.

RODRIGUES, H. et al. Clinicopathological significance of caspase-3 and Ki-67 expression in canine mammary gland tumours. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 64, n. 1, p. 78–89, 2016. Disponível em: <<http://www.akademai.com/doi/abs/10.1556/004.2016.009>>. Acesso em: 13 maio 2019.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311–322, 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-4652%28200003%29182%3A3%3C311%3A%3AAID-JCP1%3E3.0.CO%3B2-9>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

SELTING, K. A. et al. Outcome of dogs with high-grade soft tissue sarcomas treated with and without adjuvant doxorubicin chemotherapy: 39 cases (1996-2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 9, p. 1442–8, 2005.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16279389>>. Acesso em: 26 maio 2015.

SELTING, K. A. Soft-Tissue Sarcomas. In: HENRY, C. J.; HIGGINBOTHAM, M. L. (Ed.). **Cancer management in small animal practice**. Missouri: Saunders, 2010. p. 403.

SONG, C. et al. Thermographic assessment of tumor growth in mouse xenografts. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 5, p. 1055–1058, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.22808>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

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.

STAHL, R. et al. Comparison of radiological and pathohistological response to neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia (RHT) and study of response dependence on the applied thermal parameters in patients with soft tissue sarcomas (STS). **International Journal of Hyperthermia: the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group**, v. 25, n. 4, p. 289–98, 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02656730902873616>>. Acesso em: 12 jul. 2018.

STEFANELLO, D. et al. Marginal excision of low-grade spindle cell sarcoma of canine extremities: 35 dogs (1996-2006). **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 5, p. 461–5, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18986313>>. Acesso em: 3 maio 2015.

STEFANELLO, D. et al. Canine cutaneous perivascular wall tumors at first presentation: clinical behavior and prognostic factors in 55 cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1398–1405, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-1676.2011.00822.x>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

STOJADINOVIC, A. et al. Analysis of the prognostic significance of microscopic margins in 2,084 localized primary adult soft tissue sarcomas. **Annals of Surgery**, v. 235, n. 3, p. 424–34, 2002. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1422449&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 maio 2015.

TERZIAN, A. C. B. et al. 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. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/BJVRAS/article/view/888>>. Acesso em: 3 maio 2018.

THERASSE, P. et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 3, p. 205–216, 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/jnci/article/2965042/New>>. Acesso em: 22 maio 2019.

THRALL, D. E.; GILLETTE, E. L. Soft-tissue sarcomas. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 10, n. 3, p. 173–179, 1995. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029349611&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 4 maio 2015.

VAINIONPÄÄ, M. **Thermographic imaging in cats and dogs usability as a clinical method**. 2014. Dissertação ([Mestrado?]) – Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland, 2014. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/20441286.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691116>>. Acesso em: 22 maio 2015.

VAN HOOGLMOED, L. M.; SNYDER, J. R. Use of infrared thermography to detect injections and palmar digital neurectomy in horses. **The Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 129–141, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023302907197?via%3Dihub>>. Acesso em: 21 abr. 2019.

VANCE, J. E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 7, p. 1377–87, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18204094>>. Acesso em: 4 fev. 2017.

VCOG. 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, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/vco.283>>. Acesso em: 11 dez. 2016.

VERONEZ, L. C. **Atividade da fosfoetanolamina sintética em melanoma murino experimental**. 2012. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

XIE, W. et al. 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. 790–4, 2004. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0347915673&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 18 maio 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Imagens de etapas desenvolvidas neste estudo (paciente G2: ID6):
Tomografia computadorizada

A figura 1 representa a imagem de tomografia computadorizada do STM grau II localizado em região glútea direita, nos cortes sagital (1A), transversal (1B) e oblíquo (1C) e a figura 2 ilustra a reconstrução em 3D com renderização de volume, ambas realizadas em T₀. A tomografia computadorizada permitiu a mensuração do tumor e auxiliou o planejamento cirúrgico.

Fonte: Arquivo do Serviço de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Cirurgia - FMVZ/USP.

APÊNDICE B – Imagens de etapas desenvolvidas neste estudo (paciente G2: ID 6):
Intervenção cirúrgica

Sequência de imagens da exérese (A e B) do STM grau II subtipo tumor de bainha neural, localizado em região glútea direita e confecção de retalho cutâneo por transposição 45°C (C, D e E) para síntese da ferida cirúrgica.

Fonte: Castro (2019)¹⁰.

¹⁰ Fotos realizadas no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET-FMVZ/USP.

Apêndice C - Resultados da literatura para cães com STM tratados com *Standard of Care* (SOC)

Tipo de estudo e local	Nº de pacientes e período	Tratamento SOC	Tipo de follow-up	Recidiva tumoral local (RTL) e Intervalo livre de recidiva local (ILRL)	Sobrevida	Referência
Retrospectivo; Colorado State University Veterinary Teaching Hospital	75 em 10 anos	Ressecção cirúrgica ampla ou radical (amputação) *nem todos apresentaram margens livres HP	Reavaliação presencial ou contato telefônico	15% (11/75) de 73 a 1856 dias, mediana 368 dias; 5,13% (2/39) considerados apenas os tumores ressecados com margens livres; 90% sem RTL 12m; 82% sem RTL 24m e 75% sem RTL 36m	33% (25/75) sobreviveu follow-up de 183 a 1911 dias (mediana 579 dias); 33% (25/75) morreram de causas relacionadas ao tumor incluindo a eutanásia	(KUNTZ et al., 1997)
Prospectivo; Colorado State University Veterinary Teaching Hospital	14 cães (15 tumores) em 1 ano	Ressecção cirúrgica ampla *margens cirúrgicas livres em 80% e estreitas em 20% dos tumores	Presencial até 12 meses após a cirurgia	6,7% (1/15), portanto cálculo de mediana para ILR não pode ser realizado; 93% sem RTL 12m	Nenhum óbito relacionado ao tumor, portanto mediana para Sobrevida não pode ser calculada	(BANKS, T.; STRAW, R.; THOMSON, M.; POWERS, 2004)

(continua)

(continuação)

Tipo de estudo e local	Nº de pacientes e período	Tratamento SOC	Tipo de follow-up	Recidiva tumoral local (RTL) e Intervalo livre de recidiva local (ILRL)	Sobrevida	Referência
Retrospectivo; Gribbles Veterinary, Auckland (New Zealand)	Prontuários médicos e tumores de 236 cães; 1 ano e 6m	34 tumores (25%) foram ressecção ampla com margens livres HP e 104 (75%) ressecção marginal	Informações obtidas de prontuários médicos; follow-up de 24m para 50 casos	RTL= 15 casos de 1 a 25 meses, mediana 365 dias para todos os tumores; RTL= 0, se considerados apenas os 30 tumores com margens livres HP com follow-up completo	23% (7/31) morreram como resultado do STM	(MCSPORRAN, 2009)
Retrospectivo; University of Cambridge Queen's Veterinary School Hospital	56 em 6 anos	Ressecção cirúrgica marginal (margens cirúrgicas comprometidas pelo HP) e radioterapia	Reavaliação presencial ou contato telefônico	24% (13/53) sem cálculo de mediana; 19% com RTL 12m; 30% com RTL 36m e 35%, com RTL 60m	25% (13/53) sobreviveu follow-up de 426 a 2035 dias (mediana 1339 dias); 35% (12/40) dos cães que morreram apresentavam RTL e/ou metástase; não realizado exame post-mortem	(DEMETRIOU et al., 2012)

(conclusão)

APÊNDICE D – Tabela referente aos 27 casos selecionados para o estudo segundo os critérios de inclusão, São Paulo, 2019

ID	HP	Margens cirúrgicas	MD	Grupo	Técnica cirúrgica de síntese	Complicações pós-operatórias
1	STM grau II	Livres	Não	G1	Retalho por avanço	Perda de coxins/unhas
2	STM grau I	Livres	Não	G1	Retalho parcial de bolsa escrotal	Deiscência parcial*
3	STM grau III	Livres	Não	G1	Retalho em bolsa torácica	Nenhuma
4	STM grau I	Livres	Não	G2	Retalho por transposição 90°C	Deiscência parcial* + inversão bordas
5	STM grau II	Livres	Não	G2	Retalho por avanço + incisões de liberação múltiplas	Deiscência parcial* + úlcera de pressão
6	STM grau II	Livres	Não	G2	Retalho por transposição 45°C	Deiscência pontual#
7	STM grau II	Livres	Não	G1	Síntese simples	Nenhuma
8	STM grau I	Livres	Não	G2	Síntese simples	Nenhuma
9	STM grau II	Livres	Não	G2	Retalho em bolsa torácica	Nenhuma
10	STM grau II	Livres	Não	G1	Síntese simples	Nenhuma
11	STM grau III	Livres	Não	G1	Retalho por transposição 45°C	Deiscência parcial*
12	STM grau II	Livres	NHSN	E	Retalho por transposição >90°C	Nenhuma
13	STM grau I	P. estreita	Não	E	Retalho por avanço	Deiscência parcial*
14	STM grau II	P. comprometida	Não	E	Retalho padrão axial (superficial temporal)	Nenhuma
15	STM grau I	Livres	Não	G1	Síntese simples	Nenhuma
16	STM grau I	Livres	Não	G1	Síntese simples	Nenhuma
17	STM grau I	Livres	Não	G1	Retalho em bolsa torácica	Nenhuma
18	STM grau II	Livres	Não	G1	Retalho em bolsa torácica	Desvitalização e deiscência parciais* /infecção
19	STM grau II	Livres	Não	G2	Retalho em bolsa abdominal	Desvitalização parcial*
20	STM grau I	Livres	Não	G2	Retalho por transposição 90°C	Úlcera de pressão
21	STM grau I	Livres	Não	G2	Retalho por transposição 90°C	Deiscência parcial* + úlcera de pressão
22	STM grau I	Livres	Não	G2	Síntese simples	Deiscência parcial*
23	STM grau I	Livres	Não	G2	Retalho por transposição 90°C	Nenhuma
24	STM grau I	Livres	Não	G2	Retalho por avanço + incisões de liberação múltiplas	Nenhuma
25	DFA	-	Não	E	Síntese simples	Nenhuma
26	Fibroma	-	Não	E	Retalho por transposição 90°C	Nenhuma
27	Lipoma	-	Não	E	Retalho por avanço	Nenhuma

Fonte: Castro (2019).

Nota: ID= Número de identificação do paciente; HP= Histopatológico; MD= Metástases à distância; STM= Sarcoma de tecidos moles; DFA= Displasia fibro-anexial; P.= Profunda; NHSN= Nódulo hepático suspeito para neoplasia; E= Excluído do estudo; - significa valor nulo; * significa segmento acometido <50% total da ferida cirúrgica; # significa apenas em pequena área de maior tensão.