

SAMANTA RIOS MELO

**Fatores prognósticos em mastocitoma canino:
Correlação entre parâmetros clínicos, histológicos, marcadores
de proliferação e análise termográfica**

São Paulo

2013

SAMANTA RIOS MELO

Fatores prognósticos em mastocitoma canino: Correlação entre parâmetros clínicos, histológicos, marcadores de proliferação e análise termográfica.

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Julia Maria Matera

São Paulo
2013

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.2811 Melo, Samanta Rios
FMVZ Fatores prognósticos em mastocitoma canino: correlação entre parâmetros clínicos, histológicos, marcadores de proliferação e análise termográfica / Samanta Rios Melo. -- 2013.
95 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Julia Maria Matera.

1. Mastocitoma canino. 2. Fatores prognósticos. 3. Marcadores de proliferação. 4. Avaliação histopatológica. 5. Termografia. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estudo funcional da termografia como estratégia de avaliação do mastocitoma canino e seu monitoramento terapêutico”, protocolado sob o nº 2446/2011, utilizando um número indeterminado de cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Júlia Maria Matera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/10/2011.

We certify that the Research “Functional study of thermography as a strategy for the evaluation of canine mast cell tumor and its therapeutic monitoring”, protocol number 2446/2011, utilizing an unspecified number of dogs, under the responsibility Profa. Dra. Júlia Maria Matera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/26/2011.

São Paulo, 27 de outubro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MELO, Samanta Rios

Título: **Fatores prognósticos em mastocitoma canino:** Correlação entre parâmetros clínicos, histológicos, marcadores de proliferação e análise termográfica.

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha mãe Marlene Rios Melo; minha musa inspiradora... Pela inteligência, coragem, amor e dedicação a nossa família. Certamente que sem seu esforço, sem suas palavras, e sua confiança, esse trabalho não teria sido possível e eu não seria metade de quem sou.

Ao meu pai Luiz Antonio Melo; meu herói... De inteligência, sagacidade e docura inimagináveis; cuja essência me faz acreditar que sempre vale a pena buscar ser feliz. Já foi suporte em muitos momentos difíceis e me fez acreditar que eu podia ser quem eu sempre sonhei.

Ao querido companheiro, amigo verdadeiro e doce amor, Bruno Modesto. Que mudou minha vida de inúmeras maneiras, e ajudou especialmente a superar as últimas etapas desse trabalho; ensinando-me a buscar a calma, meditar quando necessário, e comemorando cada conquista assim que se tornasse possível.

Aos meus lindos amores Zulu, Violeta, Tulho e Sophie por serem cães (e gata) incomparáveis e companheiros, que hoje cuidam dos meus pais - bens mais preciosos.

A inesquecível Dalila, primeiro amor canino. A cachorrinha cuja passagem por este mundo fez de mim veterinária; e cada lembrança sua ainda faz de mim melhor em cada pedacinho.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. Julia Maria Matera, pela orientação deste trabalho e por toda a orientação de vida ao longo desses anos de convivência. Agradeço por cada segundo de preocupação, de alegrias, de viagens inesquecíveis, de confiança e de carinho. Sem dúvida, alguém sem a qual não seria metade da veterinária e do ser humano que sou hoje.

A querida Doutoranda Thais Rodrigues Macedo, pela companhia diária nesses anos de pesquisa. Pelas cirurgias, pelas risadas, pela amizade, pelo apoio em todas as dificuldades vividas... e superadas.

A Prof^a. Dr^a Thais Andrade Costa Casagrande; companheira de pesquisa, amiga e profissional incomparável, por ser a primeira a incentivar o início deste projeto e por permanecer me presenteando com sua alegria e carinho.

A todos os amigos da pós-graduação, que incentivaram diariamente esse trabalho, com amizade e confiança; em especial Carolina Scarpa Carneiro, Claudia Inglez de Souza, Fernanda Auler, Leda Marques, Larissa Cardozo, Ana Eyherabide, Bruno Pedron, Paula Finkensieper, Maria Fernanda Rizzo, Adriana Valente, Jaqueline França, Marcos Della Nina, Kelly Ito, Daniela Izquierdo, Renato Cavalcante.

Ao Prof. Dr. Bruno Cogliati, por todo o seu tempo dedicado, por concordar em cooperar com este trabalho e fazer dele parte de sua rotina.

A pós graduanda Fernanda Rodrigues Agreste pela inestimável ajuda na realização dos cortes das lâminas e das colorações.

Ao Dr. Antonio Carlos de Camargo Andrade Filho, que se dedicou de muitíssimo bom coração a nos ensinar um pouco mais sobre termografia e transmitir um pouco de sua vasta experiência. Fez toda a diferença neste trabalho.

As médicas veterinárias do Serviço de Cirurgia e Serviço de Anestesia de Pequenos Animais, pelo encaminhamento dos casos, pela ajuda nos momentos difíceis na vida dos nossos pacientes, pela dedicação diária e pela amizade de muitos anos, onde o apoio e as alegrias

ultrapassam as portas do HOVET; Viviane Galeazzi, Andressa Nitrini, Patrícia Ferreira de Castro, Tatiana Soares, Sandra Rosner, Patrícia Flor, Geni Cristina Patrício.

A grande amiga e Médica Veterinária do Serviço de Diagnóstico por Imagem Luciane Maria Kanayama; que nunca deixou de acreditar, apoiar e incentivar qualquer coisa que fosse importante, neste trabalho e em minha vida, desde que nos conhecemos. Sua calma me inspira, seu sorriso me ilumina.

As minhas queridas “Sweets” Carine Sanchez, Caroline Caseiro, Fernanda dos Santos, Lívia Maria, Paula Coelho, Palloma Carvalho, Priscila Marques e Rúbia Polegato, pelo apoio sempre incondicional, pelo carinho e amizade de muitos anos, por toda a alegria que trazem a minha vida, e pela torcida pela conclusão desse trabalho.

A todos os ex-residentes e amigos, que fizeram parte da semente deste projeto e hoje são algumas das maiores alegrias de minha vida; em especial Maiara Leme, Cecília Augusto, Ricardo Cabral, Cleber Fontana, Fernanda Vituri, Cinthia Almeida, Eric Vieira, Camila Glens, Natália Azevedo.

Aos enfermeiros e amigos de todas as horas, Cledson Lélis dos Santos, Jesus dos Anjos, Otávio Rodrigues dos Santos.

Aos secretários da pós graduação Belarmino Ney Pereira e Livia Gimenes, que tantas vezes correram contra o tempo e os prazos para me ajudar nessa caminhada.

As bibliotecárias, em especial Sr^a Elza Faquim, que dedicou tempo e foi de grande ajuda na concretização final deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cassio Ricardo Auada Ferrigno por ter nos cedido por empréstimo a câmera termográfica, para realização desse trabalho.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por me acolher a nove anos, por ser sede deste e tantos outros sonhos.

Ao CNPq pela Bolsa de Mestrado concedida.

Aos proprietários dos animais participantes deste projeto e dos que fazem parte da nossa rotina de atendimento de mastocitomas. Pela luta, pela persistência, pela dedicação e pelo carinho com nossos cães.

A todos os amigos e todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Miracles happen outside the comfort zone of our rational mind. To connect with them, we need to get a little illogical, and yes – a little uncomfortable” (Yehuda Berg)

RESUMO

MELO, S. R. Fatores prognósticos em mastocitoma canino: Correlação entre parâmetros clínicos, histológicos, marcadores de proliferação e análise termográfica. [Prognostic factors in canine mast cell tumors: correlation between clinical and histological parameters, proliferation markers and thermographic analysis.]. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Os objetivos deste trabalho foram: Analisar prospectivamente a eficácia da correlação entre parâmetros clínicos, histológicos, e marcadores de proliferação celular buscando melhores indicadores de prognóstico em casos de mastocitoma canino; Testar o uso de nova ferramenta diagnóstica e prognóstica para mastocitomas caninos: a termografia. Para isso, um total de 20 cães com diagnóstico citológico e histopatológico de mastocitoma tiveram suas formações excisadas e foram utilizados para estudo clínico e imunohistoquímico e dentre estes, 15 também para estudo termográfico. As avaliações imunohistoquímicas incluíram quantificação de AgNORs, PCNA, VEGF, localização de KIT. Os estudos termográficos incluíram análise e correlação das temperaturas no ponto central da formação (SpT), e na área da formação (AT) e em ponto de pele sadia (SpNT) e área equivalente, em pele sadia (ANT). Estatisticamente pode-se demonstrar uma correlação positiva significativa entre a classificação proposta determinada pela presença dos fatores prognósticos e o estadiamento proposto pela WHO. Não foi observada correlação estatística entre tempo livre de doença (óbito, novas formações, recidiva ou metástase) e o estadiamento ou fatores prognósticos. 95% (19/20) dos cães teve suas formações classificadas como Grau II e 5% (1/20) Grau I, segundo a classificação histológica de Patnaik (1984). Todos os cães tiveram suas formações classificadas como Baixo Grau, de acordo com a classificação proposta por Kiupell (2011). 5,6% (1/18) dos animais foi considerada padrão KIT - I, 44,4% (8/18) padrão KIT - II e 50% (9/18) padrão KIT - III. Não foi observada correlação estatística entre o padrão KIT e tempo livre de doença ou graduação histológica. Apesar de não significativo estatisticamente, foi notado menor tempo de sobrevida livre de doença nos animais com PCNA e AgNOR acima das medianas ($p = 0,089$ e $p = 0,080$, respectivamente). O VEGF foi o único marcador a demonstrar relação significativa com o tempo livre de doença ($p = 0,004$). As análises termográficas indicaram média de temperatura do SpT de 33,18°C, média de temperatura do SpNT de 33,39°C, temperatura média de AT de 33,27°C e temperatura média de ANT de 33,95°C. A diferença entre os pontos mensurados foi em média -0,21°C (variando entre -5,60°C e +4,4°C). A diferença entre os pontos mensurados foi em média -0,21°C (variando entre -5,60°C e

+4,4°C). Esta diferença foi negativa em 7/15 casos (47%) – formações mais frias que a pele distante; e positiva em 8/15 casos (53%) – formações mais quentes que a pele distante. Não foi possível correlacionar estatisticamente essas alterações de temperatura com a presença dos marcadores estudados, mas as análises estatísticas demonstram que a termografia na região tumoral é estatisticamente diferente da região não tumoral.

Palavras-chave: Mastocitoma canino. Fatores prognósticos. Marcadores de proliferação. Avaliação histopatológica. Termografia. Imagens infravermelhas.

ABSTRACT

MELO, S. R. **Prognostic factors in canine mast cell tumors:** correlation between clinical and histological parameters, proliferation markers and thermographic analysis [Fatores prognósticos em mastocitoma canino: Correlação entre parâmetros clínicos, histológicos, marcadores de proliferação e análise termográfica.]. 2013. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The objectives of this study were: To prospectively analyze the effectiveness of the correlation between clinical, histologic, and cell proliferation markers, seeking better indicators of prognosis in cases of canine mast cell tumor; and testing the use of new diagnostic and prognostic tool for canine mast cell tumor: thermography (infrared images); A total of 20 dogs with histopathological and cytological diagnosis of mast cell tumor were excised and their formations were used for immunohistochemical and clinical study, and 15 of those were also used for thermographic study. The evaluations included immunohistochemical quantification of AgNOR, PCNA, VEGF, KIT location. The studies included thermographic images analysis and correlation of the temperatures at the midpoint of tumor (SPT), and tumor area (AT) and point of healthy skin (SpNT) and equivalent area in healthy skin (ANT). We were able to demonstrate a statistically significant positive correlation between the proposed classification determined by the presence of prognostic factors and staging proposed by the WHO. No correlation was found between disease-free interval (death, new formations, recurrence or metastasis) staging, and prognostic factors. 95% (19/20) of the dogs had their tumors classified as Grade II and 5% (1/20) as Grade I, according to the histological classification of Patnaik (1984). All dogs had their tumors classified as low-grade, according to the classification proposed by Kiupell (2011). 5.6% (10/18) of the animals was graduated as KIT - I, 44.4% (8/18) as KIT - II and 50% (9/18) as KIT - III. No correlation was found between the KIT pattern and disease-free interval or histological grade. Although not statistically significant, we observed a shorter disease-free survival in animals with PCNA and AgNOR above the median ($p = 0.089$ and $p = 0.080$, respectively). VEGF was the only marker to show a significant relationship with disease-free interval ($p = 0.004$). The thermographic images analysis indicated average temperature on SpN of 33.18°C , SpNT average temperature of 33.39°C , AT average temperature of 33.27°C and ANT average temperature of 33.95°C . The difference between the measured points averaged -0.21°C (ranging between -5.60°C and $+4.4^{\circ}\text{C}$). The difference between the

measured points averaged -0.21°C (ranging between -5.60°C and $+4.4^{\circ}\text{C}$). This difference was negative in 7/15 cases (47%) - formations cooler than the healthy skin, and positive in 8/15 cases (53%) - formations warmer than the healthy skin. We could not statistically correlate these changes in temperature in the presence of the markers studied, but the statistical analyzes demonstrated that in the region thermography tumor is statistically different from non-tumor region.

Keywords: Canine mast cell tumor. Prognostic factors. Proliferation markers. Histopathological evaluation. Thermography. Infrared Images.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AgNOR	<i>Argirophilic Nucleolar Organizer Regions</i>
AT	Área da formação tumoral
ANT	Área de pele sadia
CAD	Cetoacidose diabética
CEUA	Comissão de Ética do Uso de Animais
F	Fêmea
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
Prof.	Professor
M	Macho
MTD	Membro torácico direito
MTE	Membro torácico esquerdo
MPD	Membro pélvico direito
MPE	Membro pélvico esquerdo
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
SpN	Ponto central da formação tumoral
SpNT	Ponto em região de pele sadia
cm	Centímetro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
SRD	Sem raça definida
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
VPT	Departamento de Patologia
VCI	Departamento de Cirurgia
WHO	<i>World Health Organization</i>
HOVET-	Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
FMVZ/USP	Universidade de São Paulo
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnica da Universidade de São Paulo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 -	Variação dos animais do estudo, de acordo com quantidade de marcações positivas e negativas para o PCNA.....	61
Gráfico 2 -	Variação dos animais do estudo, de acordo com quantidade de marcações positivas e negativas para o VEGF-A.....	62
Figura 1 -	Ficha de Atendimento dos casos de Mastocitoma Canino – Incluindo caracterização da formação, detalhamento dos fatores prognósticos, estadiamento e evolução do tratamento.....	50
Figura 2 -	Imagens de colorações para AgNOR, KIT, PCNA e VEGF.....	63
Figura 3 -	Imagens de Análises Termográficas.....	66
Figura 4 -	Gráficos da Função de sobrevida de Kaplan-Meier do tempo livre de doença segundo cada um dos parâmetros analisados no estudo.....	70
Quadro 1 -	Distribuição dos dados epidemiológicos e sinais clínicos dos 20 cães incluídos na pesquisa. FMVZ/USP, São Paulo, 2013.....	59
Quadro 2 -	Descrição das porcentagens PCNA e VEGF, valores AgNOR, KIT e valores das análises termográficas referente aos 20 cães do projeto. FMVZ/USP, São Paulo, 2013.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição das características quantitativas avaliadas nos animais. FMVZ/USP. São Paulo, 2013.....	66
Tabela 2 -	Descrição dos estadiamentos e C-KIT dos animais.....	67
Tabela 3 -	Resultado da correlação de Spearman, indicando as diferenças na termografia entre região tumoral e não tumoral, estadiamento, fatores prognósticos e marcadores.....	67
Tabela 4 -	Descrição das diferenças absolutas da termografia entre região tumoral e não tumoral e resultado dos testes comparativos.....	68
Tabela 5 -	Estimativa dos tempos médios livre de doença segundo categorias de interesse e resultado dos testes comparativos.....	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3. 2 Local e aparência	25
3. 3 Patogênese	25
3. 4 Quadro clínico, síndromes paraneoplásicas e complicações	27
3. 5 Diagnóstico	28
3. 6 Classificação baseada em marcadores nucleares e oncogenes	31
3. 7 Estudos termográficos em oncologia.....	37
3. 8 Tratamento.....	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Delineamento do projeto	49
4.2 Processamento e Graduação Histopatológica.....	52
4.3 Imunohistoquímica para detecção de c-Kit, PCNA e VEGF	53
4.3.1 Análise morfométrica – PCNA e VEGF	53
4.3.2 Análise de localização de proteína c-KIT	54
4.4 Coloração e contagem das AgNOR.....	54
5 RESULTADOS.....	56
5. 1 Estudo clínico	57
5. 3 Quantificação PCNA	60
5.4 Classificação c-KIT	61
5.5 Quantificação AgNOR	61
5.6 Quantificação VEGF	61
5. 7 Análises Termográficas	65
5. 7 Análise Estatística	66
6 DISCUSSÃO.....	72
6. 1 Estudo clínico	73
6. 2 Estudo Histopatológico	75
6. 3 Estudo imunohistoquímico - Quantificação de PCNA, VEGF, AgNOR e classificação pela localização de KIT	77
6. 4 Estudo termográfico	79
6. 5 Considerações Finais	81
7 CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Mastócitos são células encontradas na maior parte dos órgãos e tecidos do corpo e estão presentes em maior número em órgãos que têm contato com o ambiente, como a pele, o pulmão, e trato gastrointestinal. São derivados de células CD34, progenitoras da medula óssea. As CD34 deixam a medula óssea como células morfológicamente indiferenciadas e se diferenciam apenas após infiltrarem em tecido de mucosa ou tecido conjuntivo. Mastócitos granulados em mastocitomas bem diferenciados podem realizar mitose, indicando que células mastocitárias bem diferenciadas têm o potencial de proliferar.

Células mastocitárias podem ser reconhecidas em tecidos pelos seus grânulos citoplasmáticos quando fixadas e coradas com corantes catiônicos que aderem às proteoglicanas dos grânulos, resultando em metacromasia. Estes grânulos contêm mediadores inflamatórios, incluindo histamina, proteases, fatores quimiotáticos, citocinas e metabólitos do ácido aracdônico, conferindo aos mastócitos importante papel em reações inflamatórias, imunológicas e alérgicas.

A liberação extracelular dos grânulos de mastócitos podem ser precipitadas por fatores físicos ou químicos, como calor, trauma e toxinas, ou por mecanismos imunológicos, como antígenos-específicos IgE ligantes, aderindo a receptores IgE da superfície das células mastocitárias.

Os mastócitos também são conhecidos por sua transformação neoplásica em múltiplos ou solitários nódulos (mastocitomas) cutâneos assim como em espalhamento pela pele e órgãos internos (mastocitose visceral ou sistêmica). O comportamento biológico dos mastócitos é altamente variável, e o maior entendimento da sua história natural pode levar a melhora em conhecimento de indicadores prognósticos assim como terapia multimodal e resultando em melhor expectativa de vida para pacientes com mastocitoma.

Mastocitomas são neoplasias comuns em cães, podendo ser focais ou multifocais na pele, e/ou envolver as vísceras como baço, fígado e intestino. Cães das raças Boxer, Pug, Boston Terrier, Weimaraner e Labrador são predispostos ao desenvolvimento destes tumores cutâneos. A maioria dos tumores se desenvolve em animais de meia-idade e não há evidências de predisposição sexual. O mastocitoma no cão é uma das neoplasias cutâneas mais comuns, e corresponde a 7-21% dos tumores cutâneos e 11-27% de todos os tumores cutâneos malignos no cão (MACY, 1984; STREFEZZI et al., 2003).

Os tumores de células derivadas de mastócitos têm aparência macroscópica bem variável, mas a maior parte é caracterizada por placas ou massas eritematosas, alopecicas e edematosas. A maioria dos tumores tem cores que variam de branco a amarelo claro, mas muito da cor e da consistência da formação depende do grau da degranulação e das inflamações secundárias que ocorrem no mastocitoma. Nas formações de grande volume é comum ocorrer ulcerações, assim como em formações pequenas com rápido desenvolvimento recente (THAMM; VAIL, 2007).

A maior parte dos mastocitomas caninos ocorre na derme e no tecido subcutâneo. Contudo, eles são ocasionalmente relatados em locais fora da região de pele, incluindo conjuntiva, glândula salivar, nasofaringe, laringe, cavidade oral, trato gastrointestinal, uretra e coluna vertebral. (WELLE et al., 2008). A apresentação conhecida como mastocitoma visceral (mastocitose sistêmica ou disseminada) é quase sempre resultante de um tumor cutâneo primário pouco diferenciado, e pode ser caracterizada como metástase.

Na maioria das formações, ao exame citológico os mastócitos neoplásicos se parecem com as células normais, tornando o diagnóstico relativamente fácil. As células são quase poligonais com núcleo central a ligeiramente excêntrico e com citoplasma levemente róseo-pálido contendo grânulos que se mostram azulados com a coloração hematoxilina e eosina (H&E) ou roxos com colorações metacromáticas. Eosinófilos são quase sempre observados nos mastocitomas caninos e podem algumas vezes ser o tipo celular predominante. Muitas formações terão tipos celulares agregados aos eosinófilos que podem ser interpretados como parte do tumor quando são avaliadas as margens da excisão cirúrgica. Colagenólise, esclerose, edema, necrose e inflamações secundárias são encontrados nos mastocitomas e, quando aparecem de maneira intensa, podem mascarar células neoplásicas e tornar difícil a avaliação destas margens.

Os critérios citológicos para avaliação da malignidade do tumor incluem a predominância de grandes células monocíticas de vários tamanhos e o reconhecimento de que elas não pertencem ao tecido original. Também são avaliadas as características nucleares das células encontradas, como variação do tamanho, forma, número, proeminência de nucléolo e figuras mitóticas anormais.

A avaliação citológica de amostras de tumor pode ser muito útil na tentativa de diagnóstico e planejamento cirúrgico, mas o exame histopatológico é sempre necessário para estabelecer diagnóstico definitivo e sua classificação para definição de prognóstico clínico. A biópsia excisional tem intenção de prover informações úteis para prognóstico e tratamento,

tornando necessário o uso de técnica apropriada para a obtenção de amostras adequadas às análises histológicas sobre o tumor.

O critério celular histopatológico para malignidade do tumor é similar ao critério usado em avaliação citológica, mas esta técnica, entretanto, permite o exame da arquitetura do tumor e do padrão de crescimento. Tumores malignos em geral exibem pleomorfismo e numerosas figuras mitóticas anormais. Estas células malignas podem invadir tecidos ao redor do tumor, bem como causar metástase por invasão de vasos sanguíneos e linfáticos. Para prover o prognóstico imediato do paciente, o exame histopatológico é o mais próximo do ideal. A graduação histológica dos mastocitomas caninos tem sido o critério mais comum para a rotina diagnóstica destes tumores por ser preditivo, de baixo custo e de fácil coloração com uso de formulações de hematoxilina-eosina (PREZIOSI et al., 2007).

Muitos estudos sugerem uma correlação entre o grau de diferenciação celular e o comportamento biológico do tumor. Assim, sistemas de classificação do mastocitoma foram desenvolvidos no sentido de procurar esclarecer o prognóstico aos caninos portadores destes tumores. O diagnóstico citológico de mastocitomas é razoavelmente direto na maioria dos casos devido à presença de numerosos grânulos citoplasmáticos.

As atuais decisões de tratamento deste tipo de neoplasia são baseadas na apresentação clínica da doença, nas características do exame histopatológico e na presença ou ausência de fatores prognósticos negativos. Estes, embora sejam bons métodos de avaliação preditiva do comportamento da doença, por vezes se mostram falhos e insuficientes. Sendo assim, em estudos mais recentes têm-se buscado a avaliação imunohistoquímica das formações, com o objetivo de melhorar a acurácia diagnóstica.

Algumas tentativas de avaliação do prognóstico do mastocitoma canino foram realizadas, utilizando critérios como graduação histopatológica em graus I, II e III (PATNAIK et al., 1984); mensuração da atividade proliferativa com métodos imunohistoquímicos (SIMOES et al., 1994); estadiamento clínico e taxa de crescimento tumoral (THAMM; VAIL, 2007). Atualmente, em grande parte da rotina de tratamento desta formação, a análise do grau histopatológico por si só tem sido amplamente usada para ditar um parâmetro parcialmente preditivo para o comportamento desta neoplasia. Sabemos, no entanto, que esta classificação isolada não consegue prever de forma adequada o comportamento biológico das neoplasias mastocitárias, em especial quando classificadas como de grau intermediário (mastocitomas grau II), que se encontram à margem das duas classificações, e usualmente tem comportamento imprevisível. Ainda, há a discordância entre patologistas veterinários quanto

a classificação histológica de um mesmo mastocitoma chegando até a 36% (KIUPEL et al., 2011)

Este tem sido o maior desafio na atualidade para pesquisadores desta neoplasia no mundo todo, e o uso de diferentes sistemas de graduação por patologistas veterinários por vezes torna o valor prognóstico da graduação histológica altamente questionável.

A mais recente contraposição a graduação histológica em 3 graus (PATNAIK et al., 1984) é a classificação em 2 graus: alto grau e baixo grau histológico (KIUPEL et al., 2011). Com o intuito de buscar a melhor definição histológica do comportamento tumoral, muitos patologistas veterinários vêm apresentando ambas as classificações em seus laudos, cabendo ao clínico a análise combinada das classificações histológicas e dos fatores prognósticos para decisões de tratamento.

Os estudos recentes têm mostrado o uso de técnicas de imunohistoquímica, expressão gênica e histopatologia combinadas para buscar correlacionar fatores que possam indicar um prognóstico em cada tipo de mastocitoma (SIMOES et al., 1994; KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2007; OHMORI et al., 2008; GIANTIN et al., 2012). Estes estudos buscam elucidar e possivelmente prever o comportamento destas neoformações, especialmente as de graduação histológica intermediária.

Por meio de cuidadosa revisão de literatura, escolheu-se para este trabalho correlacionar o uso de técnicas já estudadas em mastocitomas caninos, com o estadiamento clínico e evolução pós-cirúrgica dos pacientes, e acrescentar o uso de uma ferramenta diagnóstica: a termografia.

Sendo assim, incluiremos nesta pesquisa a avaliação dos graus histológicos (seguindo ambas as classificações atualmente aceitas – Patnaik e Kiupel); estadiamento clínico da neoplasia; grau de proliferação celular, pela correlação entre dois métodos marcadores de ciclo celular (a determinação da frequência de Regiões Organizadoras Nucleolares com a afinidade pela prata – AgNOR, e pela detecção de células marcadas com Antígeno Nuclear de Proliferação Celular – PCNA); a coloração imunohistoquímica para marcadores do receptor de tirosina-quinase KIT, que tem se mostrado um importante meio de sobrevivência da célula mastocitária normal, bem como sua proliferação, migração e indiferenciação; e a marcação imunohistoquímica para o fator de crescimento endotelial vascular VEGF (ou VEGF-A), que atua como um potencial fator de crescimento autócrino para células neoplásicas.

As imagens termográficas foram obtidas das formações por meio de Câmera Termográfica Flir® T400. Muitos autores descrevem a termografia como um método diagnóstico seguro, preciso e não invasivo; aprovado para uso em Medicina Humana e em

especial para avaliação de crescimento tumoral (JIANG et al., 2005; MIKULSKA, 2006; SONG et al., 2007; ARORA et al., 2008). O uso da termografia é baseado no princípio de que a atividade metabólica e a vascularização no tecido neoplásico e comprometido ao seu redor deve estar mais alta que no tecido normal.

Na Medicina Veterinária a termografia é mais amplamente pesquisada e documentada em estudos ortopédicos. Não foram encontrados dados em literatura atual para uso da termografia como método adjunto diagnóstico e/ou prognóstico no mastocitoma canino. Cabe ressaltar que o entendimento do comportamento térmico do corpo humano ainda não é totalmente elucidado e o comportamento térmico do corpo canino é ainda mais desconhecido e descrito por um banco de dados destas imagens infinitamente menor.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho incluíram:

- [1] analisar prospectivamente a eficácia da correlação entre parâmetros clínicos, histológicos, e marcadores de proliferação celular buscando melhores indicadores de prognóstico em casos de mastocitoma canino;
- [2] testar o uso de nova ferramenta diagnóstica e prognóstica para mastocitomas caninos: a termografia;
- [3] avaliar se os métodos utilizados neste estudo poderão ser utilizados como métodos rotineiros para indicação do prognóstico em mastocitomas.

Para o desenvolvimento desses objetivos, no desenvolver deste trabalho buscou-se:

- ✓ determinar as características clínicas do paciente e de cada tumor;
- ✓ determinar o estadiamento clínico de cada paciente;
- ✓ determinar o grau histopatológico (método de Patnaik e método de Kiupell) dos tumores apresentados;
- ✓ determinar a frequência de Regiões Organizadoras Nucleolares com a afinidade pela prata – AgNOR dos tumores apresentados;
- ✓ determinar a quantidade de núcleos marcados com PCNA por imunohistoquímica dos tumores apresentados;
- ✓ determinar a intensidade de marcação imunohistoquímica para KIT dos tumores apresentados;
- ✓ determinar a intensidade de marcação imunohistoquímica para VEGF-A dos tumores apresentados;
- ✓ capturar e analisar imagens infravermelhas dos tumores por meio de câmera termográfica;
- ✓ associar estas variáveis com a evolução da doença e óbito, e verificar sua importância nesta associação.



3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Incidência e predisposição

O mastocitoma é reportado em várias espécies, incluindo seres humanos, porém a prevalência é maior em caninos e felinos do que no homem (ROCHA et al., 2004). A maior parte dos mastocitomas ocorre em cães, representando de 7-21% de todos os tumores cutâneos caninos e 11-27% de todos os tumores cutâneos caninos malignos (MACY, 1984; WELLE et al., 2008). Ainda, mastocitomas são relatados como o tipo de tumor canino mais comum de ser submetido a histopatológico e de ser diagnosticados em hospitais escola veterinários (BRODEY, 1970; ROTHWELL et al., 1987).

Esta neoplasia já foi descrita em todas as raças caninas, no entanto os animais das raças Boxer, Boston Terrier, Bulldog, Labrador Retriever, Basset Hound, Weimaraner, Beagle, Pointer, Terrier Escocês e Pastor Alemão são amplamente descritas como as mais acometidas. Em um estudo, Boxers e Boston Terriers representaram mais de 50% dos cães com mastocitoma. O risco relativo de desenvolvimento destes tumores em Boxers é de 16,7 quando comparado a outras raças, e de 8,0 em Boston Terriers. A maior incidência em ambas estas raças pode ser relacionada a sua ancestralidade comum (os chamados ‘bulldogs’) (BRODEY, 1970). Uma grande incidência de animais sem raça definida (SRD) apresentando esta formação vem sendo descritos em trabalhos que envolvem casuística nacional (STREFEZZI, 2007; COSTA-CASAGRANDE et al., 2008; MELO et al., 2012).

A idade média de apresentação é de sete e meio a nove anos (BRODEY, 1970; GOVIER, 2003). Alguns mastocitomas são raramente encontrados em cães de quatro a seis meses de idade, de acordo com alguns casos descritos em literatura (DAVIS et al., 1992; MUKARATIRWA et al., 2005). O mastocitoma já foi até descrito em animais desde um mês a dezesseis anos de idade (SIMOES et al., 1994).

Quanto a predisposição sexual, a maior parte dos estudos refere não haver (LONDON; SEGUIN, 2003; WELLE et al., 2008), muito embora alguns autores relatam maior incidência em fêmeas (SIMOES et al., 1994), enquanto outros revelam predileção por fêmeas castradas e machos não castrados. Apenas um estudo Europeu refere um possível prognóstico mais favorável a quimioterapia em fêmeas do que em machos (GERRITSEN et al., 1998).

3.2 Local e aparência

Os mastocitomas, geralmente, são tumores pequenos, firmes e bem circunscritos, podendo ser eritematosos, alopecicos e/ou ulcerados, formando nódulos ou placas (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Podem também se apresentar pouco definidos, macios e como lesões flutuantes, se assemelhando a outros tumores, como ao lipoma, por exemplo. Outras vezes, eles podem ser grandes, difusos, envolver outros órgãos (LAVALLE et al., 2003). A aparência básica destes tumores varia muito e pode mimetizar outros tipo de tumores cutâneos e outras condições não-neoplásicas. Sendo assim, mastocitoma deve sempre ser considerado dentro dos diagnósticos diferenciais de qualquer nódulo cutâneo. De modo geral, ulceração, edema, eritema, aumento de temperatura local e prurido são associados a piores prognósticos (WELLE et al., 2008).

Os mastocitomas cutâneos são mais comuns de apresentarem-se no tronco (50-60%), seguido de extremidades (25-40%), cabeça e pescoço (10%) (ROTHWELL et al., 1987). Em geral, um grande número destes tumores afeta a parte posterior do corpo, como membros pélvicos, períneo e escroto.

3.3 Patogênese

A etiologia do mastocitoma é desconhecida, mas, assim como a maior parte das neoplasias, é provavelmente multifatorial, e a predisposição racial mais documentada indica fator genético envolvido.

Os genes envolvidos no desenvolvimento do mastocitoma estão atualmente em estudo. Análises de mastocitomas humanos e de roedores revelaram um número de mutações no proto-oncogene c-KIT. Este gene codifica para um receptor de superfície celular KIT, cujo ligante induz uma cascata de sinalização e transdução responsável pelo desenvolvimento, maturação e sobrevivência de várias linhagens celulares, incluindo células tronco hematopoiéticas, melanócitos e mastócitos (KITAYAMA et al., 1995; LIAO et al., 2002).

KIT é um receptor de fator de crescimento, normalmente expresso em superfície de mastócitos que consiste em um domínio de ligação extracelular, uma região transmembrânica e uma extremidade citoplasmática com um ligante dependente de atividade tirosina-quinase (ZEMKE et al., 2002). Trabalhos indicam receptores de fatores de células-tronco, os

receptores de tirosina quinase KIT, na etiologia dos mastocitomas caninos (GALLI et al., 1994; LONDON et al., 1996; WEBSTER et al., 2007).

Mutações no domínio quinase ou nos arredores do domínio justamembrana mostraram causar ativação contínua do KIT mesmo na ausência do seu ligante. O ligante de KIT é um fator de células tronco, também conhecido como fator de crescimento mastocitário, segundo vários autores (LONDON et al., 1996; REGUERA et al., 2000; MORINI et al., 2004; WEBSTER et al., 2006; WEBSTER et al., 2007). A ativação contínua do KIT em certas linhagens celulares de ratos leva a crescimento celular descontrolado e comportamento agressivo típico de desenvolvimento tumoral (KITAYAMA et al., 1995).

A expressão de KIT foi demonstrada por imunoistoquímica em mastócitos caninos normais e neoplásicos, com maior expressão em mastocitomas pouco diferenciados ou de alto grau (LONDON et al., 1996; REGUERA et al., 2000; MORINI et al., 2004; WEBSTER et al., 2006; WEBSTER et al., 2007). A mutação do c-KIT é responsável pela promoção da progressão de alguns mastocitomas caninos (DOWNING et al., 2002; KIUPEL et al., 2004; LETARD et al., 2008; OHMORI et al., 2008).

Mutações no gene c-KIT tem sido identificadas, mais especificamente no domínio justamembrana. Ma et al. (1999) descobriram pontos de mutações e pequenas deleções em aproximadamente 50% dos tumores investigados e duplicação em duas de três linhagens celulares. London et al. (1999) também encontraram duplicações em aproximadamente 50% dos tumores estudados (5 de 11) mas não foi evidenciado nenhum outro tipo de mutações. Ambos os grupos encontraram mutações em aproximadamente 50% dos tumores estudados, e embora não foram idênticas, elas se encontravam na mesma área aproximada do c-KIT.

Zembe et al. (2002) encontrou nos mastocitomas estudados cerca de 13% de mutações, consistentes com duplicação e deleção na área do domínio justamembrana do c-KIT, e encontrou uma significativa associação entre a presença de mutação e o alto grau dos tumores. Não foi encontrada nenhuma associação entre raça e a presença de mutação. Letard et al. (2008) avaliou os tipos e frequências das mutações do KIT em mastocitomas de 191 cães. O RT-PCR revelou alterações em 50 (26,2%) dos cães do estudo. A maior parte das mutações era no exon 11.

Estudos mostram que entre 15-40% dos cães são afetados por mutações no domínio justamembrana no gene do c-kit (REGUERA et al., 2000; DOWNING et al., 2002; KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2006;) e a presença dessas mutações está altamente relacionada com formações de alto grau, pois consistem em ativação do KIT o que resulta em cascatas de

sinalização que levam a proliferação, sobrevivência e invasão tumoral (MA et al., 1999; LONDON; SEGUIN, 2003).

Em soma às mutações genéticas, alguns autores tem sugerido que inflamações cutâneas crônicas podem ter um fator no desenvolvimento do mastocitoma canino, ainda que tenham sido reportados poucos casos de mastocitomas associados a dermatites crônicas, cicatrizes ou agentes irritantes da pele (HOTTENDORF; NIELSEN, 1967; GOVIER, 2003).

3.4 Quadro clínico, síndromes paraneoplásicas e complicações

A palpação de mastocitomas geralmente causa degranulação com liberação de histamina e outras substâncias vasoativas que resulta em vasodilatação local, edema e eritema, também conhecido como sinal de Darier (THAMM; VAIL, 2007).

Complicações consequentes da degranulação de mastócitos ocorrem em cerca de metade dos cães com mastocitomas (WEELE et al., 2008). Hemorragia local é frequentemente encontrada durante a excisão cirúrgica, citologia por agulha fina e manipulação excessiva de mastocitomas. Isso ocorre em razão do prejuízo da coagulação em razão da liberação de heparina (THAMM; VAIL, 2007).

Úlceras gastrointestinais em razão dos mastocitomas caninos causam anorexia, êmese, hematoquezia, melena, anemias, dor abdominal, chegando até a perfuração intestinal e peritonite. Vale lembrar que ulcerações gastrointestinais foram encontradas em 35(83%) dos cães com mastocitomas submetidos à necropsia (HOWARD et al., 1969).

Choque anafilático por conta de degranulação súbita e liberação massiva de histamina das células neoplásicas são consequências incomuns, mas relatadas na literatura em animais que continham formas disseminadas da doença (THAMM; VAIL, 2007). Sinais sistêmicos como anorexia, vômitos, melena, eritema em lençol, edema e úlceras gastrointestinais são relacionadas a formas sistêmicas do mastocitoma e estes associados a piores prognósticos também.

A Organização Mundial de Saúde estabeleceu um sistema de estadiamento clínico para mastocitomas. Os estágios clínicos 0 ou I implicam em melhores prognósticos que estágios mais altos. Ainda, metástase no momento do diagnóstico inicial compromete ainda mais o prognóstico (WELLE et al., 2008). Este estadiamento clínico pode ser usado em

conjunto com as classificações histológicas do tumor para melhor avaliação de prognóstico, seleção de terapia e decisões clínicas.

Mastocitomas subcutâneos são usualmente circundados de camada de gordura. Até recentemente (NEWMAN et al., 2007; THOMPSON et al., 2011a, b) este tipo de mastocitoma não era estudado separadamente da forma cutânea. Os mastocitomas subcutâneos são classificados pelas mesmas graduações histológicas do cutâneo, mas a maior parte deles acaba sendo classificado como grau II ou maior (PATNAIK et al., 1984; GROSS et al., 2005; THOMPSON et al., 2011a). Como formações classificadas como grau II tem prognóstico altamente variável, estudos indicam que é necessário melhorar a caracterização dos mastocitomas subcutâneos, com fins prognósticos (GROSS et al., 2005; THOMPSON et al., 2011a).

Uma diminuição do tempo de sobrevida nos animais que apresentaram a forma subcutânea foi correlacionada ao índice mitótico (número de figuras em mitose em cada 10 campos de alta definição), padrão infiltrativo e presença de multinucleação. Análises estatísticas mostraram forte correlação entre índice mitótico e sobrevida, recorrência local e metástase. Os resultados do estudo mais recente (THOMPSON et al., 2011a) indicam que a maioria dos mastocitomas subcutâneos tem um prognóstico mais favorável, com tempo de sobrevida maiores e baixos índices de recorrência e metástase.

3.5 Diagnóstico

Aspiração por agulha fina (com amostras submetidas a exame citológico) é método simples e deve ser realizado antes de qualquer procedimento cirúrgico, já que diagnóstico pré-operatório de mastocitoma influencia no tipo e extensão da intervenção cirúrgica. A citologia leva a diagnóstico correto em 92 a 96% dos casos posteriormente confirmados por histologia (THAMM; VAIL, 2007).

O seguimento dos exames diagnósticos e estadiamento do tumor após a realização da citologia de mastocitomas têm sido recentemente reavaliados e depende da ausência ou presença de fatores prognósticos negativos, conforme proposto por Thamm e Vail (2007). De qualquer modo, a maior parte dos autores estabelece que o mínimo necessário requerido de exames para excisões de mastocitomas é a citologia do tumor e de linfonodos regionais, e ultrassonografia abdominal. Como mastocitomas raramente metastatizam em pulmão, radiografias de tórax são eventualmente indicadas.

Apesar de a citologia prover diagnósticos em geral convenientes, ela não provém uma classificação em graus, e, portanto não deve prever comportamento tumoral. Sendo assim, amostras obtidas por meio de biópsia excisional devem ser submetidas a exames histopatológicos para graduação da formação, bem como a avaliação de margens. Três classificações histopatológicas foram propostas para identificar o grau de diferenciação dos mastocitomas caninos. Todos os sistemas variam de bem diferenciados (baixo grau, maduro), diferenciação intermediária e não diferenciados (pouco diferenciados, alto grau).

O sistema de classificação em graus histológico mais usado atualmente é o sistema que determina três graus (PATNAIK et al., 1984): grau I para tumores confinados a derme, grau II e III para tumores estendidos até abaixo da derme e que se diferenciam pelo grau de diferenciação celular. Neste sistema, mastocitomas grau I são tumores da derme superficial, bem diferenciados e com baixo número de mitoses. Grau II são tumores estendidos até a derme profunda e o subcutâneo. Neste grau, há pouco pleomorfismo e o índice mitótico é mais alto que no grau I, embora geralmente seja menor que dois por campo sob o aumento de 40x. O grau III é determinado a tumores que se estendem ao tecido subcutâneo e são compostos por células anaplásicas de tamanho variável, de núcleo e nucléolo proeminentes. Os grânulos no citoplasma são menos numerosos e por vezes são indefiníveis sem o uso de colorações histoquímicas especiais (Giemsa, azul de Toluidina, Azul Astral) especialmente em neoplasias de grau III. Figuras mitóticas são frequentes e muitas são atípicas em mastocitomas menos bem diferenciados. Nestes tumores com menor grau de diferenciação outras características como infiltrados eosinofílicos, colagenólise multifocal e glândulas apocrinas dilatadas irão ajudar no diagnóstico.

Em seu trabalho, Patnaik et al. (1984) classificaram morfológicamente 83 mastocitomas caninos e após a excisão cirúrgica os cães foram avaliados por mais 1500 dias. A comparação com o grau do tumor e o índice de sobrevida e metástase revelou diferenças significativas entre os grupos. Tumores bem diferenciados (grau I) têm uma pequena ocorrência de recorrência após a excisão cirúrgica e têm taxa de três anos de sobrevida em cerca de 90% dos casos (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984). Tumores moderadamente diferenciados (grau II) têm potencial de metástase de baixo a moderado e taxa de três anos de sobrevida em cerca de 55% dos casos. Como esperado, tumores pouco diferenciados (grau III) têm o mais alto índice de metástase e taxa de três anos de sobrevida apenas em 10 - 15% dos casos. A recidiva após a excisão cirúrgica é potencialmente comum nos tumores de grau II e grau III porque estes tumores são mais profundos, menos circunscritos e em geral têm mais áreas de necrose, edema e hemorragia, o que impede a própria observação das margens do

tumor. Metástase em todos os casos ocorre primariamente nos linfonodos regionais e depois, mais raramente, se espalham para o fígado e baço. (HENDRICK; GOLDSCHMIDT, 2002).

Atualmente a maior parte das determinações de prognósticos e modalidades terapêuticas para cães com mastocitomas cutâneos são baseadas em grau histológico (PATNAIK et al., 1984). No entanto, a utilização de diferentes sistemas de classificação por patologistas veterinários e modificações institucionais faz o valor prognóstico desta graduação altamente questionável (KIUPEL et al., 2011).

Um estudo verificou a eficácia na determinação dos graus de mastocitomas caninos, de acordo com a variação individual de cada patologista. Os patologistas não obtiveram 100% de concordância em seus diagnósticos por meio da classificação em graus de Patnaik, sugerindo que um método mais objetivo deveria ser desenvolvido e que outros indicadores histológicos deveriam ser investigados. (NORTHRUP et al., 2005). Uma das soluções encontradas ao longo das últimas décadas para minimizar as variações entre observadores e consequentemente auxiliar no diagnóstico e nas decisões de tratamento foram as técnicas morfométricas computadorizadas. Assim, a citopatologia é uma ferramenta interessante. Strefezzi et al. (2003), tiveram a intenção de determinar se mastocitomas de diferentes graus histológicos mostram diferentes padrões nucleares morfométricos, aliando a precisão da morfometria computadorizada com o exame rápido e prático da citopatologia. Valores de área nuclear, e perímetro nuclear das células tumorais aumentaram com o aumento do grau histopatológico dos mastocitomas (I a III). Os resultados indicaram que a análise morfométrica nuclear, combinada com a citopatologia pode ajudar no diagnóstico de mastocitoma canino, contribuindo para um diagnóstico e previsão de tratamento mais preciso.

Para melhorar a concordância entre patologistas e fornecer melhor significado prognóstico, um sistema de classificação histológica em dois graus (alto grau e baixo grau) foi concebido por Kiupell et al. (2011). O diagnóstico de mastocitomas de alto grau é baseado na presença de qualquer um dos seguintes critérios: pelo menos 7 figuras de mitose em 10 campos de alta definição, pelo menos três células multinucleadas (3 ou mais núcleos) em cada 10 campos de alta definição, pelo menos três núcleos bizarros em 10 campos de alta definição; cariomegalia (diâmetro nuclear de pelo menos 10% das células neoplásicas variam com aumento de, pelo menos, duas vezes). Os campos com maior atividade mitótica ou com o maior grau de anisocariose devem ser selecionados para avaliação dos diferentes parâmetros. De acordo com o novo sistema de classificação, mastocitomas de alto grau foram significativamente associados com menor tempo de metástase ou desenvolvimento de novos tumores, e com menor tempo de sobrevida. O tempo médio de sobrevida foi de menos de 4

meses para mastocitomas de alto grau e mais de que 2 anos para mastocitomas de baixo grau (KIUPEL et al., 2011).

3.6 Classificação baseada em marcadores nucleares e oncogenes

Realizar a escolha do diagnóstico e tratamento apropriados para mastocitomas caninos ainda é algo desafiador. Um entendimento da heterogeneidade deste processo, as neoplasias associadas e o conhecimento de indicadores prognósticos podem ser úteis e levar a decisões de acordo com cada paciente. Uma abordagem multidisciplinar, que inclui várias técnicas de diagnóstico (histológico, imunohistoquímico, histoquímico e etc.), pode ser necessária para a melhor assistência a alguns pacientes (ROGERS, 1996).

Proliferação celular descontrolada é uma marca de neoplasias e, sendo assim, a mensuração da proliferação celular tem sido extensivamente usada na intenção de predizer o comportamento de doenças neoplásicas (WELLE et al., 2008). Na medicina veterinária os métodos de avaliação mais comumente utilizados incluem a determinação da frequência de Regiões Organizadoras Nucleolares com a afinidade pela prata – AgNOR (SIMOES et al., 1994; RECH et al., 2004), a contagem de células positivas para o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular – PCNA (SIMOES et al., 1994; ABADIE et al., 1999; LONDON; SEGUIN, 2003) e a contagem de células positivas para Ki-67 (ABADIE et al., 1999; SAKAI et al., 2002). Estes métodos têm sido extensivamente investigados para mastocitomas caninos e considerados importantes fatores na avaliação prognóstica (WEBSTER et al., 2008).

AgNORs são áreas presentes nos núcleos celulares que estão associadas a proteínas, como nucleolina e nucleoplasmina, envolvidas na transcrição do RNA ribossomal. Elas são amplamente usadas como marcadores da cinética e da atividade metabólica tumoral. Estas áreas se ligam a moléculas de prata e podem ser visibilizadas por meio de microscopia com o uso de um corante cuja base seja prata. A quantidade de AgNORs por núcleo tem sido relatada como proporcional ao grau de proliferação celular *in vitro* e ao grau de crescimento do tumor *in vivo* (TRERE et al., 1996; ABADIE et al., 1999). Vários estudos demonstram que altas contagens de AgNOR em mastocitomas estão relacionados a aumento de mortalidade, recorrência local e metástase (KRAVIS et al., 1996; WELLE et al., 2008). Posteriormente, estudos avaliaram o benefício e a eficácia do uso de outros meios alheios aos diagnósticos histológicos. Especificamente, a presença de regiões nucleares organizadas agirofílicas

(AgNORs) e porções do DNA foram avaliadas como indicadores de prognóstico (BOSTOCK et al., 1989; KRAVIS et al., 1996; ABADIE et al., 1999; WEBSTER et al., 2007). Avaliação quantitativa de AgNOR, permitiu, mais do que o índice mitótico, a correlação entre grau histológico e prognóstico (KRAVIS et al., 1996), já que essa contagem revela o estágio do ciclo celular. Estes estudos mostraram que muitas das AgNORS contadas foram correlacionadas com prognósticos piores e que esta técnica era menos subjetiva que a classificação em graus de Patnaik (1984).

O PCNA é uma subunidade auxiliar da proteína polimerase DNA delta e está envolvido em diversos processos dentro do núcleo, em sua maioria associados a reparo de DNA. O PCNA tem uma meia-vida longa e está relacionado a múltiplas funções nucleares, sendo que sua expressão máxima é encontrada na fase S do ciclo celular – fase de síntese de DNA (WEBSTER et al., 2007). É uma proteína não-histona necessária à síntese e reparo de DNA, detectada desde a fase G1 até a transição G2 a M, atingindo seu máximo na fase S do ciclo celular (MADEWELL, 2001). Esta proteína está ausente na fase G0, mas, diferentemente do Ki67, sua expressão varia muito nas fases G1, S, G2 e M. Ainda, pode ser induzida por dano ao DNA e possui meia-vida longa, fazendo com que as frações proliferativas sejam, muitas vezes, super-representadas (ABADIE et al., 1999; MADEWELL, 2001). Simoes et al. (1994) e Morini et al. (2004) mostram correlação entre a expressão de PCNA e a recorrência ou metástase em mastocitomas caninos. Ainda, a expressão de PCNA não tem sido analisada como um fator prognóstico isolado, e sua interpretação é dependente do grau histológico da formação (WELLE et al., 2008).

Grau histológico, índice mitótico, contagem das AgNORs – estes podem ser feitos em tecidos embebidos em parafina ou em espécies preparadas para análises citológicas comuns - e marcação imunoistoquímica para PCNA foram avaliados como indicadores de prognóstico (SIMOES et al., 1994; WEBSTER et al., 2007; WEBSTER et al., 2008). Graus histológicos, AgNORs e PCNA representaram significativa diferença entre tumores recorrentes e não-recorrentes. Estes fatores de prognóstico foram também significantemente diferentes entre tumores que tiveram metástase e aqueles que não. O tempo de sobrevida foi mais baixo em cães com mastocitomas grau III (método de Patnaik), contagens de AgNORs mais altas que 2.25, e PCNA contado em cinco campos mais alto que 261. Combinando estes dois índices mais significantes em índices de prognóstico, três modelos foram obtidos para determinar a probabilidade de não recorrência, a 3, 6 e 9 meses após a cirurgia. Os modelos mostraram

acurácia na previsão de prognóstico em 80% dos mastocitomas caninos. O uso destes modelos indicou meios menos subjetivos do prognóstico de mastocitomas caninos do que o uso isolado de um destes componentes (SIMOES et al., 1994; WEBSTER et al., 2007).

A expressão de KIT tem sido significativamente relacionada com a classificação histológica em graus, expressão de Ki67, AgNORs e necrose tumoral (GIL DA COSTA et al., 2007). O *c-kit* é um proto-oncogene que codifica para KIT (CD117), um tipo III de proteína tirosina quinase cujo ligante é o chamado *stem cell factor* (SCF), uma citocina estimulante do fator de crescimento do mastocitoma. Estudos indicam uma associação entre expressão citoplasmática de KIT aberrante e o alto nível de proliferação celular, a presença de mutações em c-kit, o aumento de recorrência local e diminuição da sobrevida. (WEBSTER et al., 2007).

A proliferação celular é o resultado de ambos os números de ciclos celulares (fração de crescimento) em um dado tumor e a taxa de progressão de ciclo celular (tempo de geração). A mensuração da atividade proliferativa pode acrescentar informações importantes para a formulação de um prognóstico mais confiável identificando, por meio de marcações histo e imuno-histoquímicas ou da contagem de mitoses, a fração de células em proliferação (ABADIE et al., 1999). Entre esses métodos, merecem destaque a contagem de células em mitose (ROMANSIK et al., 2007), a determinação da frequência de Regiões Organizadoras Nucleares com afinidade pela prata (AgNOR) (BOSTOCK et al., 1989, SIMOES et al., 1994, KRAVIS et al., 1996), a contagem de células positivas para o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) (SIMOES et al., 1994; ABADIE et al., 1999) e a contagem de células positivas para Ki67 (ABADIE et al., 1999, SAKAI et al., 2002).

Estudos indicam que para avaliar verdadeiramente a proliferação celular é necessário avaliar tanto a fração de crescimento (Ki-67) e o tempo de geração (AgNOR) (WEBSTER et al., 2007). Webster et al. (2007) recomendam a utilização de AgNOR e Ki-67, em associação à avaliação da expressão de *c-kit* como métodos rotineiros para indicação do prognóstico em mastocitomas.

Com relação aos mastocitomas cutâneos, a avaliação da atividade proliferativa revelou que o índice de PCNA foi maior nos cães que morreram em função do mastocitoma do que nos que sobreviveram, mas, apesar disso, não foi demonstrada diferença estatisticamente significante entre os graus histopatológicos (ABADIE et al., 1999; SCASE et al., 2006). A contagem de células positivas para PCNA foi considerada um indicador de sobrevida

confiável por Simoes et al. (1994), porém não apresentou valor prognóstico nos estudos realizados por Scase et al. (2006) e Webster et al. (2007).

Novos métodos de avaliação de crescimento, infiltração e proliferação neoplásica têm sido adicionados aos estudos do mastocitoma canino, como densidade microvascular intratumoral, mutações no gene p53, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e metaloproteinases de matriz celular.

O crescimento tumoral está diretamente relacionado com a neovascularização, a qual decorre do desequilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos, secretados pelas células neoplásicas. Tumores podem produzir fatores de estímulo ao crescimento de vasos, como o Fator de Crescimento Vascular Endotelial, da sigla em inglês VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou VEGF-A. O VEGF é uma proteína homodimérica ligante de heparina com diversas isoformas diferentes geradas por divisões alternadas (LADOMERY et al., 2007). Em condições fisiológicas, o VEGF é essencial na formação de vasos em embriões, induz permeabilidade vascular e estimula proliferação celular (WOLFESBERGER et al., 2007). O Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um regulador principal da angiogênese e um fator de crescimento autócrino potencial para células neoplásicas em vários graus de malignidade (GIANTIN et al., 2012). Ainda, a presença de mastócitos em diversos tipos de tumores sólidos esta associada a pior prognóstico, mais ocorrência de metástase, e tem sido relacionada com a expressão do VEGF nestas células (IAMAROON et al., 2003; KONDO et al., 2006; TUNA et al., 2006; CIUREA et al., 2012).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) desempenha papel chave na angiogênese tumoral, estimulando a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais. Atua através da ligação a receptores tirosina quinase específicos: VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR e VEGFR-3. O aumento da expressão do VEGF e de seus receptores tem sido associado à progressão, metastatização e pior prognóstico em diversos tumores malignos. A compreensão das vias moleculares que envolvem o mecanismo de indução da angiogênese tumoral por fatores de crescimento como o VEGF aumentam as possibilidades de novas terapêuticas a serem utilizadas no tratamento de tumores malignos humanos (CAPP et al., 2009).

A proliferação celular descontrolada representa um papel importante na progressão do mastocitoma canino (GIL DA COSTA et al., 2007; WEBSTER et al., 2007). Sendo assim, estudos vêm contemplando a análise do VEGF por imunohistoquímica (MEDERLE et al., 2009), ensaio imunoenzimático (ELISA) (PATRUNO et al., 2009), e por expressão gênica (REBUZZI et al., 2007; GIANTIN et al., 2012).

Rebuzzzi et al. (2007) investigaram a expressão de VEGF e receptores de VEGF em mastocitomas caninos e na linha de células do mastocitoma canino C2. Tal como avaliado por imunocoloração das secções de tecido, mastócitos neoplásicos primários (MC) e as células C2 expressaram a proteína VEGF. Além disso, as células C2 expressaram VEGF receptor-1 (Flt-1) e VEGF receptor-2 (KDR). Juntos, as células caninas C2 e os mastocitomas expressaram VEGF, bem como os receptores de VEGF. O estudo concluiu que apesar de co-expressão de VEGF e seus receptores, VEGF não é utilizado como um regulador de crescimento autócrino por células mastocitomas caninos.

Patruno et al. (2008) avaliaram as concentrações de soro (S), plasma pobre em plaquetas (P-PP), o plasma rico em plaquetas activadas- (P-APR) o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a densidade microvascular (MVD). O estudo sugere que o VEGF pode ser segregado a partir mastocitomas caninos e que estes tumores podem ser um modelo útil para estudar o papel de mastócitos caninos na angiogênese e na sua inibição da degranulação ou ativação. Ainda, pode ser uma estratégia anti-angiogênica digna de novas investigações.

Outro estudo realizado por Mederle et al. (2010) observou a expressão do VEGF em células de um mastocitoma canino, por meio de imunohistoquímica. A marcação positiva para o VEGF apresentou-se como padrão citoplasmático, de intensidade moderada a forte. Os autores consideraram a marcação do VEGF como possível fator prognóstico negativo a ser investigado.

A expressão do VEGF e da Prostaglandina E2 (PGE-s) foi avaliada também por imunohistoquímica em 53 mastocitomas caninos (AMORIM et al., 2010). Neste estudo não foi observada correlação entre a intensidade da coloração imunohistoquímica do VEGF e o grau histológico dos tumores; a correlação foi obtida apenas para a PGE-2.

Giantin et al. (2012) avaliaram a expressão de VEGF e de metaloproteínases em mastocitomas caninos. Foi relatado por estes autores que a expressão do VEGF-A, bem como de metaloproteínases de matriz celular está relacionada com o grau histológico e sugere estes marcadores como possíveis indicadores de malignidade e prognóstico do mastocitoma canino.

KIT é um receptor de fator de crescimento, normalmente expresso em superfície de mastócitos que consiste em um domínio de ligação extracelular, uma região transmembranica e uma extremidade citoplasmática com um ligante dependente de atividade tirosina-quinase (ZEMKE et al., 2002). Como já previamente exposto, em seção referente a patogênese do mastocitoma, trabalhos indicam a presença dos receptores de tirosina quinase KIT, na

etiologia dos mastocitomas caninos (GALLI et al., 1994; LONDON et al., 1996; WEBSTER et al., 2007).

Uma nova classificação para mastocitomas foi proposta por Kiupel et al. (2004) com base na marcação de KIT. O padrão KIT I consiste de um padrão predominantemente perimembranosa de localização de proteína KIT com o mínimo de localização citoplasmática. Padrão KIT II consiste de localização citoplasmática focal para pontilhada das proteínas KIT, e padrão KIT III consiste de localização citoplasmática difusa da proteína KIT. Foi observado por estes autores que mastocitomas com marcação KIT apenas na perimembrana (KIT I) não estavam associados com redução no tempo de sobrevida e com recidiva. Já os mastocitomas com marcações difusas no citoplasma (KIT II e III) estavam diretamente relacionadas a redução no tempo de sobrevida e maiores taxas de recidiva.

A expressão de KIT foi demonstrada em diversos estudos por imunoistoquímica em mastócitos caninos normais e neoplásicos, sendo divida nos padrões I, II e III, de acordo com a localização de KIT. (LONDON et al., 1996; REGUERA et al., 2000; MORINI et al., 2004; WEBSTER et al., 2006; WEBSTER et al., 2007).

Um estudo analisou a localização de KIT por imunohistoquímica e observou 41% dos animais com KIT padrão I (localização perimebranosa, conforme vista em mastócitos não neoplásicos), 40% dos animais apresentou KIT padrão II e 19% apresentou KIT padrão III. Neste estudo mastocitomas caninos com mutações no c-KIT foram significativamente associadas com um aumento da incidência de recidiva e óbito. As mutações do c-KIT foram também associadas a localização aberrante da proteína (KIT II e III), entretanto, o grau de expressão de KIT não foi correlacionado a mutações em c-kit ou a variações na localização da proteína KIT (WEBSTER et al., 2006).

Outro estudo define que a localização citoplasmática de KIT (localização aberrante – KIT II e III), foi associada a um menor intervalo livre de doença e menor sobrevida em cães com mastocitoma cutâneo. Definiu ainda que mutações em c-KIT e localizações aberrantes de KIT são associados com maiores expressões de Ki67 e das chamadas AgNORs (regiões celulares organizadas que coram com prata). Assim, Webster et al. (2007) estabelecem que uma melhor definição do prognóstico e do comportamento biológico dos mastocitomas são feitos por meio de avaliação conjunta de grau histológico, marcação de KIT e atividade proliferativa dos mastocitomas - por meio de marcação para AgNOR e Ki67 (WEBSTER et al., 2007).

Em contrapartida, outros estudos não encontraram associação da classificação do padrão KIT com a sobrevida e grau histopatológico (NEWMAN et al., 2007; STREFEZZI et

al., 2007). Também não foi encontrada associação quanto ao tempo livre de neoplasia e óbito e a localização de KIT, bem como grau histológico e localização de KIT em estudo de Costa-Casagrande et al. (2013) (No prelo)¹.

3.7 Estudos termográficos em oncologia

A relação entre temperatura corporal e doenças é documentada e relatada desde 400AC. Em muitas doenças, especialmente na área da oncologia, há variações em fluxo sanguíneo e elas afetam a temperatura da superfície corporal. A termografia e o estudo das suas imagens se mostram um método não invasivo de diagnóstico, baseado nesta relação entre inflamação, alteração de fluxo sanguíneo, e doença.

A termografia como ferramenta diagnóstica médica nasceu em 1957 com o cirurgião Ray Lawson, que descobriu que pacientes com neoplasias mamárias tinham temperatura corpórea mais elevada nas áreas invadidas pelo nódulo tumoral. Em 1977 métodos padronizados de interpretação das imagens termográficas para neoplasias mamárias foram estabelecidos. Em 1982 a FDA aprovou a termografia como método diagnóstico adjunto para pacientes com câncer de mama. De acordo com Darton e Black (1991), um termograma anormal é 10 vezes mais indicativo como fator de risco para o desenvolvimento de neoplasia mamária do que pacientes com histórico familiar de primeira ordem. Quando usado como parte de uma abordagem multimodal (exames clínicos + mamografia + termografia), há detecção de estágios precoces de neoplasia mamárias de 95%.

Desde os anos 70 a termografia tem sido empregada na medicina em muitas áreas, como ortopedia, angiologia, cirurgia plástica, reumatologia, doenças alérgicas e na própria oncologia. Gautherine e Gros (1980) foram os pioneiros em documentação e estudo sobre termografia em detecção precoce de câncer de mama.

A imagem térmica por infravermelho é atualmente conhecida na medicina humana como uma importante ferramenta e modalidade na determinação de fontes locais de calor ou frio, tendo sido relacionados a intensidade de fluxo sanguíneo e ao desenvolvimento de

¹ COSTA-CASAGRANDE, T. A.; DE OLIVEIRA BARROS, L. M.; FUKUMASU, H.; COGLIATI, B.; CHAIBLE, L. M.; DAGLI, M. L. Z.; MATERA, J. M. The value of molecular expression. Of KIT and KIT ligand analysed using real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry as a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Comparative Oncology*, 2013. doi: 10.1111/vco.12010.

formações neoplásicas. Como principais vantagens do uso desta ferramenta, pode-se citar: ausência de necessidade de contato para realização do exame – tornando 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).

Condições padronizadas do ambiente são essenciais para reprodução termográfica. Deve-se manter uma temperatura de 22°C na sala de exame ou a temperatura no momento deve ser mensurada e corrigida no momento da análise das imagens por meio de software específico. A sala deve ser de tal modo a impedir perdas térmicas por convecção forçada de ar diretamente sobre os pacientes. A velocidade do ar incidente, se houver, não deverá ultrapassar 0,2 m/s (FANGER, 1982). Deve-se lembrar de deixar o paciente afastado de equipamentos elétricos que possam gerar calor. A variação de temperatura do ambiente não pode ser maior do que 1°C dentro de um período de 20 minutos (BRIOSCHI, 2003).

De preferência, não deve haver janelas no laboratório; se houver, as mesmas devem ter duas camadas de vidro e ser equipadas com telas ou blindagens externas para evitar a luz solar. As lâmpadas fluorescentes, que são lâmpadas de luz fria, devem ser usadas, ao invés de lâmpadas de tungstênio. Um termômetro digital, com um visor suficientemente grande para ser observado a, pelo menos, três metros de distância, deve estar disponível para monitorar o local onde está o paciente. Deverá, da mesma forma, ser posicionado de modo que não seja afetado diretamente, pelas fontes de calor presentes na sala. É necessário um período de 15 minutos de exposição para que a pele entre em equilíbrio térmico com a temperatura da sala. O paciente pode permanecer em posição ortostática ou sentado, dependendo da área a ser avaliada (BRIOSCHI, 2003).

Sistemas modernos de análise gráfica das imagens obtidas com câmeras termográficas atuais representaram um importante avanço na área da termografia, e vem sendo ainda amplamente pesquisada e acredita-se que todas as suas aplicações ainda não estão inteiramente definidas, por razões do alto custo das câmeras ou o uso de algumas de baixo desempenho.

Jiang et al. (2005) descrevem algumas das tecnologias usadas para estudos termográficos humanos; dentre elas a tecnologia de processamento de imagens infravermelho – processamento de baixo grau por meio da captura de imagens de áreas específicas com câmera termográfica por uso de infravermelho (Ex. câmeras de sistema FLIR).

A termometria cutânea por imagem infravermelha é o meio mais eficiente para o estudo da distribuição da temperatura cutânea atualmente. A termometria cutânea é um

método diagnóstico que avalia a microcirculação da pele e que, indiretamente, também avalia o sistema nervoso autônomo simpático estreitamente relacionado com a pele. Por meio da mensuração das variações de temperatura causadas por maior ou menor irrigação de um território microvascular, é possível distinguir décimos de grau centígrado por milímetros quadrados de área de tecido através da utilização desta técnica, enquanto que o ser humano só discrimina diferenças de temperatura em média maiores que 2°C com a técnica semiológica da palpação com o dorso da mão (BRIOSCHI et al., 2003).

As alterações presentes em um ou mais territórios cutâneos vem sendo usadas em diagnóstico humano de tromboses, em transoperatório de cirurgias cardíacas para avaliar a perfusão do enxerto venoso, em avaliação de viabilidade de enxertos cutâneos e também podem refletir processo inflamatório, fraturas de estresse, artralgias patelofemorais, doenças reumáticas, doenças periodontais, inflamações do trato lacrimal, anormalidades da tireoide e, até mesmo, neoplasias: tumores de tireoide, paratireoide, melanomas e tumores de mama (BRIOSCHI et al., 2003).

A termografia vem sendo ainda amplamente estudada com intuito de desenvolver a tecnologia e usá-la de maneira mais ampla e significativa. Estudos vêm indicando o desenvolvimento da chamada Termografia Dinâmica Ativa e da Tomografia Térmica em aplicações médicas como: queimaduras de pele, inspeção em intervenções cirúrgicas cardiotorácicas, detecção de tumores de mama e outros (NOWAKOWSKI, 2006). Estes métodos mais recentes se baseiam nas propriedades térmicas dos tecidos, não em sua simples distribuição de temperatura; e podem representar o futuro dos estudos em termografia.

Trabalhos (JIANG et al, 2005; MIKULSKA, 2006; SONG et al., 2007) descrevem algumas das vantagens do uso destes métodos em oncologia perante outros: é um método não invasivo e não expõe o paciente a absolutamente nenhum risco; ao contrário de Tomografias e Ressonâncias Magnéticas, a Imagem Termográfica Infravermelha é baseada na detecção de neovascularização e alterações químicas e inflamatórias da região, associadas diretamente com o crescimento tumoral.

A utilização da termografia no campo da oncologia médica reside no fato de que os tumores geralmente têm um aumento no fornecimento de sangue e na angiogênese, assim como uma taxa metabólica aumentada, o que, por sua vez, traduz-se em maiores gradientes de temperatura em relação ao tecido normal circundante. Detectar estes "hotspots" e seus gradientes pode, assim, ajudar a identificar e diagnosticar malignidade tumoral (ARORA et al., 2008). Ainda, acredita-se que o processo de carcinogênese associada a neoangiogênese

resulta em aumento da temperatura ao redor da área da formação neoplásica (POLJAK-BLAZI et al., 2009).

A quase totalidade dos estudos atualmente publicados que associam termografia e oncologia humana tem sido representados pela avaliação da ferramenta no câncer de mama em mulheres (YAHARA et al., 2003; SONG et al., 2007; ARORA et al., 2008; WISHART et al., 2010; KONTOS et al., 2011; WANG et al., 2011; BOQUETE et al., 2012).

A termografia tem sido usada desde o início dos anos 60 na avaliação de pacientes com suspeita de câncer de mama, onde um padrão térmico anormal pode ser detectado antes da presença de mudanças clínicas ou do exame mamográfico. Uma imagem infravermelha típica de um tumor da mama revela 1-3 °C de elevação da temperatura da pele na periferia do tumor. Além disso, lesões com uma taxa de crescimento rápida e de prognóstico menos favorável podem ser identificadas quando estudos termográficos são utilizados em conjunto com os exames físicos e radiológicos convencionais (GAUTHERIE et al., 1980).

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 destas mudanças de temperatura não é totalmente compreendida, embora seja assumido por alguns autores que a elevação de temperatura na periferia do tumor é devido a hipervascularidade em torno do tumor como resultado de neoangiogênese induzida pelo tumor (XIE et al., 2004).

A gama de interações entre inflamação e câncer não é bem compreendida, embora a associação de inflamação e câncer foi descrita por Virchow já em 1863. Ele descreveu a presença de um infiltrado leucocitário em tecidos tumorais e concluiu que deve haver algumas ligações entre inflamação e câncer.

Yahara et al. (2003) se propuseram a avaliar e validar o uso da termografia no diagnóstico do câncer de mama, por meio da termografia de contato o uso de agulhas para mensuração da temperatura por meio direto. A avaliação da temperatura do tumor (dT_t) e do tecido ao redor (dT_s) foi comparada com a de tecidos normais. Neste estudo, a dT_t foi significativamente maior do que a dT_s e sugeriu uma relação entre a dT_t e o prognóstico do tumor de mama. Também foi descrito neste estudo que anormalidades de temperatura mensuradas diretamente foram refletidas por meio das imagens termográficas.

Song et al. (2007) observaram contrastes de temperatura em xenoxertos de tumores de mama humanos em ratos, objetivando fornecer um quadro para a utilização de imagens térmicas como uma ferramenta de pesquisa para avaliação objetiva de tumores. Este estudo mostrou como as imagens térmicas evoluíram durante o desenvolvimento do tumor e evidenciou que os tumores eram mais frios do que o tecido que os envolvia, com uma redução

da temperatura máxima de 1,5° C a 3°C no 14º dia após a inoculação. Além disso, foi demonstrado que a temperatura dos tumores xenoxertados diminuiu progressivamente à medida que estes foram aumentando seu tamanho durante o período de observação. O estudo conclui que a termografia pode ter considerável potencial no controle de xenoxertos tumorais humanos e suas respostas a fármacos anticancerígenos.

Arora et al. (2008) fazem um estudo duplo-cego com 92 pacientes sobre a efetividade da termografia infravermelha digital no estudo e detecção de câncer de mama em mulheres. Este estudo determina que o sistema pode detectar câncer mamário com sensibilidade de até 97% e com um valor preditivo negativo de 82%. A especificidade do método foi considerada mais baixa, indo de 12% a 45%. Por fim, o estudo conclui que a termografia infravermelha digital é um valioso complemento à mamografia e ultrassonografia, especialmente para mulheres com parênquima mamário denso.

Wishart et al. (2010) relataram resultados do uso da termografia digital infravermelha em 100 pacientes, antes da realização de biópsia por agulha e analisou os resultados usando inteligência artificial (*No Touch Breast Scan*). Este método foi considerado eficaz para auxiliar a detecção do câncer da mama em mulheres com menos de 70 anos e parece ser particularmente eficaz em mulheres com menos de 50, onde a sensibilidade máxima (78%) e especificidade (75%) foram observados.

Recentemente, Kontos et al. (2011) apresentam valores diferentes de especificidade e sensibilidade do método por meio de um estudo que incluiu a avaliação de termogramas de 63 pacientes sintomáticos para câncer de mama. O estudo mostra especificidade de 85% e sensibilidade de 25%, com valor preditivo negativo de 86%. Estes autores declaram que, apesar de ser não-invasivo e indolor, devido à baixa sensibilidade para câncer da mama, a termografia infravermelha não é indicada para a avaliação primária de doentes sintomáticos nem deve ser usada de forma rotineira como teste de triagem para câncer de mama, na ausência de prova de sua eficácia.

A associação das imagens termográficas, de receptores hormonais e de receptores de fator de crescimento foi analisada por Wang et al. (2011). Um total de 163 mulheres com 171 formações histopatologicamente comprovados como carcinomas mamários tiveram suas mamas caracterizadas por imagem termográfica antes da cirurgia de excisão. As imagens termográficas foram associados com a presença de receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR) e Receptores de fatores de crescimento (HER2). As formações triplo-negativas apresentou maior diferença termográfica (IR1) que outros tipos de cânceres. O

estudo sugere que a termografia pode ser considerada um avaliador de prognóstico em câncer de mama.

Boquete et al. (2012) propõe um novo método automatizado de análise de imagens termográficas para detecção de zonas de alto risco de tumor, com base em um componente de análise de componentes independente (ICA) e pós-processamento das imagens resultantes deste algoritmo. A hipótese de trabalho é que o tecido tumoral, sua angiogênese e inflamação emitem um padrão diferente da temperatura do tecido saudável. Isso se traduz em diferentes características estatísticas que podem ser trazidos pelo algoritmo ICA e extraído por aplicação de processamento de imagem dos algoritmos em uma fase posterior do método. O método proposto mostrou que o aparecimento de uma anomalia de calor, indicando uma zona potencialmente cancerígena é refletida como uma fonte independente pela análise do ICA e dos componentes. O conjunto de imagens disponíveis na pequena série do estudo resultou em uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 94,7%. Este estudo, apesar de ser caracterizado como um projeto-piloto tem mostrado o potencial de recurso de um sistema automatizado de análise de imagem termográfica ICA aplicado para a detecção precoce do câncer de mama.

No estudo do desenvolvimento do carcinoma (carcinoma experimental Walker 256) as imagens termográficas também aparecem como ferramenta de estudo das interações com o tecido. Poljak-Blazi et al. (2009) delinearam um estudo com o objetivo de usar a termografia infravermelha para monitorar mudanças na temperatura da superfície da pele associadas a hematoma, inflamação e desenvolvimento de Carcinoma Walker 256 no membro posterior direito de ratos. O aumento de temperatura periférica foi observado após a inoculação das células tumorais, como reflexo da inflamação local ou hematoma. Oposto a isso, diminuição transitória da temperatura da superfície da pele foi observada logo após o transplante do tumor. O crescimento progressivo do tumor foi associada com o aumento da temperatura da superfície da pele a partir do 10º dia da inoculação do tumor, quando há desenvolvimento neoangiogênico, confirmado pela histologia. Embora o aumento de temperatura periférica em tumores em estágios avançados de desenvolvimento foi apresentado e relacionado a neoangiogênese, a redução da temperatura da superfície da pele num período inicial logo após a inoculação de células de tumor indicam um decaimento de células tumorais transplantados, devido à resposta imunitária e a falta de fornecimento sanguíneo. Assim, os autores concluem que a imagem termográfica infravermelha pode ter valor considerável na avaliação do desenvolvimento do tumor e de discernimento entre processo como câncer, inflamação e hematoma.

O uso da termografia em veterinária vem aos poucos evidenciando maior confiabilidade e entendimento diagnóstico. O uso desta ferramenta em animais de grande porte aumentou consideravelmente com o advento das câmeras termográficas portáteis; permitindo o uso da ferramenta em campo aberto ou em condições diversas. As imagens infravermelhas podem ser usadas como auxiliares no diagnóstico de problemas como: claudicação, dores de coluna, estiramento ou ruptura muscular, tendinites, fraturas, neurites, periostites, alterações de fluxo sanguíneo, rupturas de ligamento, artrites, miosites, laminites, manejo de feridas entre outras (HARPER, 2000).

Dentre os estudos recentes sobre termografia em cães, nota-se uma crescente utilização deste método para avaliação de quadros ortopédicos. Estes vão desde a caracterização termográfica do joelho canino em animais sadios (LOUGHIN; MARINO, 2007), passando pela avaliação de animais com ruptura de ligamento cruzado cranial (INFEMUSO et al., 2010) e pela caracterização do joelho canino por meio de termografia (MARINO; LOUGHIN, 2010).

Uma grande discussão em termografia veterinária, especialmente no que se refere a animais de companhia refere-se a tricotomia. A manutenção do pelame para obtenção das imagens termográficas deveria influenciar na mensuração de temperaturas cutâneas superficiais. Por outro lado, a tricotomia muito próxima a obtenção das imagens também poderia representar um aumento momentâneo da temperatura nesta região. Um estudo (LOUGHIN; MARINO, 2007) avaliou imagens infravermelhas de joelhos caninos com o intuito de descrever e estabelecer protocolo de obtenção de imagens termográficas nestes animais. Cada cão foi avaliado no mesmo ambiente (temperatura controlada em 21°C) e foram obtidas imagens no momento 0. Após estas imagens, o cão foi submetido a tricotomia desta área e cada cão foi reavaliado termograficamente em 15, 60 minutos e 24 horas após a tricotomia. Comparações das imagens evidenciaram que houve uma estabilização da temperatura nos três momentos após a tricotomia. O estudo estabeleceu que a presença do pelame pode ser representativo na diminuição da temperatura do local, especialmente para animais de pelame denso, mas observou que há manutenção do padrão térmico a partir de 15 minutos após tricotomia.

Deve-se ressaltar que os resultados obtidos pela termometria infravermelha (ou termografia) devem ser apropriadamente correlacionados com uma história clínica completa, um exame físico bem realizado e outros estudos diagnósticos, quando indicados. Dessa maneira, a imagem térmica poderá ser ferramenta decisiva no estabelecimento de diagnóstico correto e na determinação mais precisa do prognóstico do paciente (BRIOSCHI et al., 2003).

3.8 Tratamento

A progressão de mastocitomas caninos de grau II tratados apenas com excisão cirúrgica foi estudada em um trabalho retrospectivo de 55 casos (entre 1996 e 1999). Sessenta tumores foram incluídos no estudo, e os resultados mostram que a média do tempo de sobrevida após a excisão do tumor é de 540 dias. Apenas 5% dos cães desenvolveram metástases em média em 158 dias, e outros 5% tiveram recidiva local em tempo médio de 62 dias. Como 84% dos cães ficaram livres de mastocitomas durante o período estudado, o estudo sugere que a inclusão de um tratamento local adjuvante pode não ser necessária se a excisão do tumor for com margem de segurança, e que a maioria dos cães não necessita de tratamento sistêmico. (SÉGUIN et al., 2001).

O tratamento mais efetivo para mastocitomas é a retirada cirúrgica e radioterapia adjuvante quando a excisão com margem de segurança não é possível. Chick Weisse e Karine Sorenmo (2002) realizaram estudo retrospectivo em 31 cães com mastocitoma diagnosticado histologicamente como grau II, na intenção de determinar os índices de recorrência e os sítios do tumor. Tumores recorrentes distantes do foco inicial se desenvolveram em 22% dos cães e recidiva local foi apresentada em 11%; entretanto a maioria destes animais teve excisão incompleta inicialmente. A excisão completa do grau II é associada ao controle local efetivo em 89% destes casos. Sendo assim, este estudo indica que a radioterapia adjuvante pode não ser indicada na grande maioria dos casos com excisão cirúrgica completa.

Vários estudos demonstram a importância da completa excisão cirúrgica do tumor, Simpson et al. (2004) fizeram uma avaliação das margens cirúrgicas requeridas para a completa excisão de mastocitomas caninos cutâneos. Após o pré-operatório, a pele de cada cão foi marcada em 1, 2 e 3 cm das margens do tumor (a 0°, 90°, 180° e 270°). A fáscia profunda foi exposta e suturada a pele; o tumor foi excisado em procedimento cirúrgico de rotina e fixado em formalina. Os tumores foram classificados e as margens examinadas histologicamente para células mastocíticas neoplásicas. Os resultados mostram que todos os tumores de grau I foram completamente excisados em todas as margens (de 1, 2 e 3 cm). Setenta e cinco por cento dos tumores de grau II foram completamente excisados a margem de 1 cm, e 100% foram completamente excisados a 2cm de margem. Dois tumores de grau II localizados no membro pélvico de cães foram excisados com uma completa, porém pequena margem (próximo de 1 mm). Estes resultados sugerem que uma margem lateral de 2 cm e

uma margem profunda de 1 plano muscular parece ser adequada para a completa excisão de graus I e II de mastocitomas caninos.

O uso da radioterapia em mastocitomas é recomendada para excisões cirúrgicas incompletas, doença subclínica ou microscópica, caso nova excisão cirúrgica não seja possível. Ainda, há estudos que sugerem a radioterapia como método de diminuição da formação para posterior procedimento cirúrgico de excisão. O tratamento com radioterapia, associado a cirurgia tem boas correlações com o controle da doença, especialmente em casos onde a cirurgia isolada não é capaz de excisar completamente o nódulo (LARUE; GILLETTE, 2007).

O uso da quimioterapia no manejo do mastocitoma canino primeiramente tem o objetivo de tratar a doença disseminada, inoperável ou tumores de alto grau onde a doença é considerada microscópica. Ainda assim, a radioterapia, seria a primeira escolha para tratamento de doença microscópica (WELLE et al., 2008).

Os níveis de resposta a quimioterapia chegam a 78% em protocolos com múltiplas drogas, associadas ao tratamento cirúrgico (GOVIER, 2003). Vários protocolos tem sido estudados para o mastocitoma canino. O protocolo mais antigo e difundido é o que combina vinblastina e prednisona. Este é sabido que tem eficácia relativamente baixa, com resposta menores que 50% dos casos em cães com doenças disseminadas (THAMM et al., 1999).

Um estudo com 27 cães com mastocitomas excisados cirurgicamente e que apresentaram margens comprometidas foi realizado, com o objetivo de avaliar a eficácia do tratamento quimioterápico combinando vinblastina e prednisolona (DAVIES et al., 2004). Neste estudo, os animais apresentaram-se livres da doença em apenas 58% dos casos, e a toxicidade apresentada foi considerada moderada. Protocolos que incluem lomustina apresentaram toxicidade em 54% dos cães tratados em Cooper et al. (2009). De modo geral, todos os sintomas decorrentes da aplicação foram considerados de natureza média, e os autores acreditam que protocolo parece ser bem tolerado e pode ser uma considerado para tratamento de mastocitoma canino, em casos inoperáveis.

Webster et al. (2008) desenvolveram um estudo com o intuito de avaliar o protocolo convencional (vimblastina + prednisona) para mastocitomas no pós-operatório, por meio da avaliação de fatores prognósticos (grau histológico, mutações do c-KIT, marcadores de proliferação AgNOR, Ki676). O estudo mostrou que cães com mastocitoma Grau III, com mutações no c-KIT e com valores aumentados de AgNOR e ki67 foram associados com menor intervalo livre de doença e com menor sobrevida. Os autores ainda acreditam que, embora não tenha conseguido obter significância estatística pelo baixo número amostral,

mastocitomas grau III e com mutações no c-KIT tratados no pós-cirúrgico com protocolo de vimblastina e prednisona tiveram maior sobrevida e menor intervalo livre de doença.

Outro estudo com 21 cães testou o uso do clorambucil (Leukeran®) associado a prednisolona como opção de protocolo para cães com mastocitoma (TAYLOR et al., 2008). Neste estudo nenhuma toxicidade foi relatada, a resposta (diminuição do tamanho da formação) foi discretamente menor, mas o tempo de sobrevida foi equiparável a outros protocolos mais comumente usados (vinblastina e prednisona). Foi considerado por estes autores como um protocolo aceitável e a vantagem de toxicidade mínima.

O estudo do efeito do estágio e do número de formações, relacionados ao prognóstico de mastocitomas caninos foi realizado por Murphy et al. (2006). Entre 1997 e 1999, 280 cães foram identificados, sendo 21% dos casos com tumores múltiplos. Os dados de análise de sobrevivência vieram de 145 casos de cães com tumores únicos e de 50 casos com tumores múltiplos. O trabalho mostra que não há diferença significativa no tempo de sobrevivência dos dois grupos (tumores únicos e múltiplos): os índices de sobrevida após 12 e 24 meses foram de 88 e 83%, respectivamente, para os cães com tumores únicos e 86% para os dois intervalos de idade para os cães com tumores múltiplos. Oito dos cães com tumores únicos tinham metástase de linfonodos (mastocitoma grau II) e estes cães tiveram um tempo médio de sobrevida de 431 dias, ao passo que os 50 cães com tumores múltiplos (classificados como mastocitomas grau III) e os cães com tumores únicos (classificados como grau I) não tiveram seu tempo de sobrevida muito mais estendido que este. Dentre a população estudada, a raça Golden Retriever parece ser predisposta a desenvolver tumores múltiplos. Assim, este estudo não encontrou evidências de que cães com tumores únicos tenham diferenças nos índices de sobrevida de tumores múltiplos, embora as evidências de que a presença de metástase de linfonodos em geral acarreta num prognóstico pior.

Outro estudo retrospectivo de casos entre 1998 e 2004, com 54 animais buscou avaliar os fatores prognósticos associados com a conclusão de casos de cães com múltiplos mastocitomas cutâneos retirados com cirurgia, aliada ou não a tratamento coadjuvante. Foram avaliados 54 animais, obtendo-se um total de 153 tumores. Os resultados indicam que o tempo médio de sobrevida foi de 658 dias. O índice de metástase foi de 15%. Fatores que influenciaram negativamente o tempo de sobrevida nas análises incluíam: a incompleta excisão cirúrgica, recidiva local, tumores maiores que 3 cm, sinais clínicos no momento do diagnóstico e o uso de tratamento adjuvante. Os resultados sugerem que mastocitomas caninos cutâneos múltiplos são associados com um baixo índice de metástases e um bom prognóstico está bem relacionado com a excisão cirúrgica completa (MULLINS et al., 2006).

Mastocitomas caninos são atualmente tratados com um ou uma combinação de quatro métodos terapêuticos diferentes: cirurgia, radioterapia, quimioterapia clássica e uso dos inibidores de tirosina-quinase (recentemente introduzidos TKI). A última modalidade principalmente atua inibindo KIT, um receptor de tirosina-quinase cuja ativação é um dos mais importantes estímulos de proliferação de células normais e neoplásicas mastocitárias.

A proliferação do mastocitoma depende em grande parte da atividade do KIT, um receptor tirosina-quinase. Os inibidores da tirosina-quinase KIT, foram recentemente introduzidos e aplicados com sucesso como um agente terapêutico para esse tipo de tumor (KLOPFLEISCH et al., 2012).

Além das terapias acima citadas, estão sendo testados outros medicamentos que inibem o receptor de tirosina-quinase KIT. Alguns ainda têm apenas publicações de sua efetividade *in vitro* (PRYER et al., 2003; LIN et al., 2008) e outros já possuem publicações de resposta clínica em cães com mastocitoma, demonstrando efetividade sozinhos ou em combinação de tratamentos. Entre as substâncias testadas está o sulfato de toracenib, o masitinib, o imatinib (LONDON et al., 2003; ISOTANI et al., 2008; MARCONATO et al., 2008; LONDON et al., 2009).



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi aprovada pela CEUA da FMVZ/USP em 27 de outubro de 2011, recebendo o número de protocolo 2246/2011 . A inclusão dos pacientes no presente trabalho foi autorizada pelos proprietários.

Foram incluídas neste estudo formações de animais atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – do Departamento de Cirurgia junto ao HOVET – FMVZ/USP no período de janeiro/2011 a janeiro/2013, com diagnóstico citológico aspirativo por agulha fina de mastocitoma, que se adequavam aos critérios de inclusão e não se enquadravam em nenhum critério de exclusão.

Os critérios de inclusão foram:

- a. cães com diagnóstico citológico de mastocitoma, passível de excisão cirúrgica da formação sem necessidade de quimioterapia neoadjuvante;
- b. cães com confirmação do diagnóstico através do exame de histopatológico após a excisão cirúrgica.

Os critérios de exclusão estabelecidos foram:

- a. formações que não fossem cirurgicamente excisáveis (por tamanho ou localização) em primeiro momento, necessitando do uso de quimioterapia neoadjuvante;
- b. animais que estavam recebendo algum tratamento quimioterápico neoadjuvante prévio (prescritos por colega antes do encaminhamento);
- c. presença de metástases distantes (verificadas por exame de ultrassonografia abdominal completa e radiografias de tórax em três projeções);
- d. presença de alterações em exames de triagem do animal (hemograma, perfil renal, perfil hepático) que impediriam o procedimento cirúrgico.

4.1 Delineamento do projeto

Cães com mastocitoma foram submetidos a avaliação clínica e laboratorial. Todas as avaliações incluíram preenchimento de ficha de anamnese e exame físico, e informações

relacionadas a neoplasia; como evolução, localização, consistência, presença de sangramento, características de crescimento, dimensão, superfície, presença de alopecia, eritema ou ulceração, temperatura sensível da formação, base de inserção. Análises laboratoriais e outras ferramentas diagnósticas foram incluídas, com intuito de estadiamento da doença: hemograma, bioquímica sérica, citologia dos linfonodos regionais – quando aplicável, radiografias torácicas e ultrassonografia abdominal.

Foi também detalhado o estadiamento clínico de cada animal e a presença de fatores prognósticos negativos. A ficha de atendimento está exposta abaixo, na figura 1.

Figura 1 - Ficha de Atendimento dos casos de Mastocitoma Canino – Incluindo caracterização da formação, detalhamento dos fatores prognósticos, estadiamento e evolução do tratamento

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA, DENTAL, ZOOTECNIA - UFVZ DEPARTAMENTO DE CIRURGIA SERVIÇO DE CIRURGIA DE PEGUINOS ANAIS - HCPET</p> <p>MASTOCITOMA CANINO</p> <p>PROTÓTIPO N° _____ DATA: _____ ATENDIDO POR: _____</p> <p>NOME: _____ IDADE: _____</p> <p>SEXO: _____ DATA: _____</p> <p>LIMITADORES Mastocito: <input type="checkbox"/> Ossos/Superfície: <input type="checkbox"/> Aderente: <input type="checkbox"/> Mastocito: <input type="checkbox"/> Cervical/Superfície: <input type="checkbox"/> Aderente: <input type="checkbox"/> Mastocito: <input type="checkbox"/> Cervical/Superfície: <input type="checkbox"/> Aderente: <input type="checkbox"/></p> <p>NÓDULOS CUTÂNEOS - MEDIDAS (3 dimensões)</p> <p>1. 2. 3. 4. 5.</p> <p>NÓDULO 1: Tempo de evolução: _____ Crescimento: <input type="checkbox"/> Rápido <input type="checkbox"/> Lento <input type="checkbox"/> Estático Consistência: <input type="checkbox"/> Macia <input type="checkbox"/> Firme <input type="checkbox"/> Rígida Superfície: <input type="checkbox"/> Lisa <input type="checkbox"/> Vermosa <input type="checkbox"/> Irregular Aderente a planos: Profundos: <input type="checkbox"/> Tratamento: <input type="checkbox"/> Percaísmo <input type="checkbox"/> Não aderente Alvejante: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Hipersugravidação: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Extensa: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Sensibilidade: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Ulceração: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Base: <input type="checkbox"/> Pedunculada <input type="checkbox"/> Sessil Temperatura local: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Aumentada <input type="checkbox"/> Diminuída</p> <p>NÓDULO 2: Tempo de evolução: _____ Crescimento: <input type="checkbox"/> Rápido <input type="checkbox"/> Lento <input type="checkbox"/> Estático Consistência: <input type="checkbox"/> Macia <input type="checkbox"/> Firme <input type="checkbox"/> Rígida Superfície: <input type="checkbox"/> Lisa <input type="checkbox"/> Vermosa <input type="checkbox"/> Irregular Aderente a planos: Profundos: <input type="checkbox"/> Tratamento: <input type="checkbox"/> Percaísmo <input type="checkbox"/> Não aderente Alvejante: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Hipersugravidação: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Extensa: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Sensibilidade: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Ulceração: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Base: <input type="checkbox"/> Pedunculada <input type="checkbox"/> Sessil Temperatura local: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Aumentada <input type="checkbox"/> Diminuída</p> <p>NÓDULO 3: Tempo de evolução: _____ Crescimento: <input type="checkbox"/> Rápido <input type="checkbox"/> Lento <input type="checkbox"/> Estático Consistência: <input type="checkbox"/> Macia <input type="checkbox"/> Firme <input type="checkbox"/> Rígida Superfície: <input type="checkbox"/> Lisa <input type="checkbox"/> Vermosa <input type="checkbox"/> Irregular Aderente a planos: Profundos: <input type="checkbox"/> Tratamento: <input type="checkbox"/> Percaísmo <input type="checkbox"/> Não aderente Alvejante: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Hipersugravidação: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Extensa: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Sensibilidade: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Ulceração: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Base: <input type="checkbox"/> Pedunculada <input type="checkbox"/> Sessil Temperatura local: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Aumentada <input type="checkbox"/> Diminuída</p> <p>NÓDULO 4: Tempo de evolução: _____ Crescimento: <input type="checkbox"/> Rápido <input type="checkbox"/> Lento <input type="checkbox"/> Estático Consistência: <input type="checkbox"/> Macia <input type="checkbox"/> Firme <input type="checkbox"/> Rígida Superfície: <input type="checkbox"/> Lisa <input type="checkbox"/> Vermosa <input type="checkbox"/> Irregular Aderente a planos: Profundos: <input type="checkbox"/> Tratamento: <input type="checkbox"/> Percaísmo <input type="checkbox"/> Não aderente Alvejante: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Hipersugravidação: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Extensa: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Sensibilidade: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Ulceração: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Base: <input type="checkbox"/> Pedunculada <input type="checkbox"/> Sessil Temperatura local: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Aumentada <input type="checkbox"/> Diminuída</p> <p>NÓDULO 5: Tempo de evolução: _____ Crescimento: <input type="checkbox"/> Rápido <input type="checkbox"/> Lento <input type="checkbox"/> Estático Consistência: <input type="checkbox"/> Macia <input type="checkbox"/> Firme <input type="checkbox"/> Rígida Superfície: <input type="checkbox"/> Lisa <input type="checkbox"/> Vermosa <input type="checkbox"/> Irregular Aderente a planos: Profundos: <input type="checkbox"/> Tratamento: <input type="checkbox"/> Percaísmo <input type="checkbox"/> Não aderente Alvejante: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Hipersugravidação: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Extensa: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Sensibilidade: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Ulceração: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Base: <input type="checkbox"/> Pedunculada <input type="checkbox"/> Sessil Temperatura local: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Aumentada <input type="checkbox"/> Diminuída</p> <p>FATORES PROGNÓSTICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Grau histológico: fator preditivo negativo (quanto mais indiferenciado pior) <input type="checkbox"/> Extensão clínica <input type="checkbox"/> Localização (preposta/ exófito/ nódulo/ subungual/ oral/ face/ auricular/ junções mao-olho/mão-orelha) envolvimento da MO → prognóstico ruim <input type="checkbox"/> Tamanho do tumor primário <input type="checkbox"/> Presença de ulceração <input type="checkbox"/> Edema/ extensa/ aumento de temperatura local <input type="checkbox"/> Rapidez de crescimento geral e rápido crescimento recente <input type="checkbox"/> Grau de infiltração nos tecidos periféricos <input type="checkbox"/> Presença de metástases, regionais ou distantes <input type="checkbox"/> Recidiva local após tratamento adequado <input type="checkbox"/> Desenvolvimento de um novo tumor primário em localização diferente <input type="checkbox"/> Sintomas paraneoplásicos <input type="checkbox"/> Raças bráquicéfalicas melhor prognóstico; other per prognóstico ruim <p>ESTADIMENTO: RESULTADO CITOLOGICO: RESULTADO HISTOPATOLOGICO:</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>TRATAMENTO:</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">CLÍNICO</td> <td style="width: 50%;">QT</td> </tr> <tr> <td>QGTO-ADJUVANTE</td> <td>QT ADJUVANTE</td> </tr> <tr> <td colspan="2">PROTOCOLO DE QT: _____</td> </tr> <tr> <td colspan="2">_____</td> </tr> <tr> <td colspan="2">_____</td> </tr> </table> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>OUTRAS:</p> </td> </tr> </table>	<p>TRATAMENTO:</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">CLÍNICO</td> <td style="width: 50%;">QT</td> </tr> <tr> <td>QGTO-ADJUVANTE</td> <td>QT ADJUVANTE</td> </tr> <tr> <td colspan="2">PROTOCOLO DE QT: _____</td> </tr> <tr> <td colspan="2">_____</td> </tr> <tr> <td colspan="2">_____</td> </tr> </table>	CLÍNICO	QT	QGTO-ADJUVANTE	QT ADJUVANTE	PROTOCOLO DE QT: _____		_____		_____		<p>OUTRAS:</p>
<p>TRATAMENTO:</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">CLÍNICO</td> <td style="width: 50%;">QT</td> </tr> <tr> <td>QGTO-ADJUVANTE</td> <td>QT ADJUVANTE</td> </tr> <tr> <td colspan="2">PROTOCOLO DE QT: _____</td> </tr> <tr> <td colspan="2">_____</td> </tr> <tr> <td colspan="2">_____</td> </tr> </table>	CLÍNICO	QT	QGTO-ADJUVANTE	QT ADJUVANTE	PROTOCOLO DE QT: _____		_____		_____		<p>OUTRAS:</p>	
CLÍNICO	QT											
QGTO-ADJUVANTE	QT ADJUVANTE											
PROTOCOLO DE QT: _____												

O estadiamento seguiu os parâmetros para estadiamento clínico do mastocitoma pela World Health Organization – WHO (IN: WELLE et al., 2008). Os fatores prognósticos negativos (13) foram determinados de acordo com a revisão de literatura (SIMOES et al., 1994; KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2007; OHMORI et al., 2008; GIANTIN et al., 2012) e cada animal recebeu pontuação (0 – 13) para a presença destes fatores.

MELO, S.R.

Os animais selecionados para este estudo foram então submetidos a intervenção cirúrgica de ressecção da formação, com margens amplas de 2 a 3 cm nas laterais e de um plano facial profundo. Os pacientes que necessitaram de terapias complementares, como quimioterapia adjuvante, ou nova intervenção cirúrgica para ampliação de margens foram também mantidos e submetidos ao tratamento, bem como acompanhamento.

Os cães foram acompanhados durante todo o período de pós-cirúrgico ou pós-quimioterapia adjuvante a cada mês nos primeiros três meses e após a cada três meses. Em casos de recidiva ou surgimento de nova formação o animal deveria retornar antes do prazo previsto.

Para a avaliação termográfica todos os cães foram fotografados com a mesma distância (0,5m) e no mesmo ambiente (sala de atendimento fechada, sem a presença de correntes de ar, com janelas fechadas e vidros com película protetora tipo *Insulfilm®*). A temperatura e umidade local foi mensurada por meio de termo-higrômetro digital² e depois inserida em Software³ para avaliação de cada imagem. Os animais foram submetidos a tricotomia da área de interesse e as imagens infravermelhas foram obtidas 15 minutos após este procedimento.

As imagens obtidas foram posteriormente analisadas em Software², com mensuração dos seguintes parâmetros:

- temperatura no ponto central da formação (SpT);
- temperatura em ponto distante da formação – maior que 3 cm de distância (SpNT);
- Área quadrangular abrangendo a formação (AT);
- Área quadrangular de igual tamanho a AT, no ponto mais distante da formação – área além da margem cirúrgica de segurança (ANT).

As médias dos valores obtidos foram analisadas estatisticamente para verificar se havia diferença significativa entre as regiões e pontos cujas temperaturas foram mensuradas.

As neoplasias excisadas com diagnóstico citológico de mastocitoma foram todas imersas em solução de formol a 10% imediatamente após excisão cirúrgica e submetidas à avaliação histopatológica para confirmação do diagnóstico, bem como avaliação de margens cirúrgicas e graduação histológica da formação.

² Equiterm® modelo TH439

³ FLIR® QuickReport

A graduação histológica foi realizada por grau de diferenciação celular, de acordo com critérios propostos por Patnaik et al. (1984) e também pelos novos critérios propostos por Kiupell et al. (2011), por meio da coloração de Hematoxilina - Eosina e com o uso da coloração histoquímica com azul de toluidina nos casos em que não era possível a diferenciação celular e graduação histopatológica.

Como marcadores de atividade do ciclo celular foram mensuradas as células positivas para PCNA e AgNOR; e a mensuração da marcação para c-KIT e VEGF também foram incluídos como métodos de avaliação prognóstica.

Com base nos dados de evolução clínica e pós-cirúrgica, foram correlacionados estatisticamente os dados como o tempo de sobrevida e intervalo livre de doença com os dados de estudo imunohistoquímico, histológico (graduação histológica, contagem de PCNA, AgNORs, e VEGF) e as mensurações obtidas por meio das imagens termográficas.

4.2 Processamento e Graduação Histopatológica

As amostras foram encaminhadas para confecção de lâminas com cortes de 5 μ m de espessura e coloração por Hematoxilina - Eosina no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia – FMVZ/USP. O diagnóstico e a classificação dos mastocitomas foram realizados pelo Serviço de Patologia Animal - HOVET – FMVZ/USP.

A classificação em graus foi baseada na diferenciação celular e em outros eventos descritos por Patnaik et al. (1984). A graduação divide o tumor em 3 graus histológicos, sendo o grau I, tumores que possuem células bem diferenciadas, enquanto o grau III são os tumores que mostram células pouco diferenciadas, sendo difícil visualizar os grânulos citoplasmáticos. Os tumores classificados como grau II são os que apresentam células com grau intermediário de diferenciação.

Ainda, foi incluída no estudo histopatológico das formações a classificação proposta por Kiupell et al. (2011) um sistema de classificação histológica em dois graus (alto grau e baixo grau). Neste sistema, o diagnóstico de mastocitomas de alto grau é baseado na presença de qualquer um dos seguintes critérios: pelo menos 7 figuras de mitose em 10 campos de alta definição, pelo menos três células multinucleadas (3 ou mais núcleos) em cada 10 campos de alta definição, pelo menos três núcleos bizarros em 10 campos de alta definição; cariomegalia

(diâmetro nuclear de pelo menos 10% das células neoplásicas variam com aumento de, pelo menos, duas vezes).

4.3 Imunohistoquímica para detecção de c-Kit, PCNA e VEGF

O processamento imunohistoquímico foi realizado no Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular do Departamento de Patologia - FMVZ/USP.

Para confecção das lâminas, foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura, aderidos em lâminas silanizadas, desparafinados em estufa por 30 minutos a 60º C, em xanol, seguidos por mais um banho de xanol, por 30 minutos e outro banho de 30 minutos em xanol com álcool também a 60º C. A rehidratação foi realizada com 2 banhos em álcool absoluto, por 5 minutos cada banho, seguido por banhos em álcool graduado (95% e 70%) e finalmente, um banho em PBS por 5 minutos.

Os cortes histológicos foram submetidos ao procedimento de recuperação antigênica em solução de ácido cítrico (10 mM, pH 6.0), na panela de pressão durante 3,5 minutos. Após bloqueio em solução aquosa de H₂O₂ 6%, os cortes foram incubados em câmera úmida, overnight e a 4ºC, com os anticorpos para PCNA⁴ (1:100), c-Kit⁵ (1:100) e VEGF⁶ (1:100). Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o polímero SuperPicture Poly HRP conjugate⁷ durante 30 minutos em estufa à 37°C; reveladas em solução de diaminobenzidina⁸ e contra-coradas com Hematoxilina de Harris.

4.3.1 Análise morfométrica – PCNA e VEGF

Após a realização das reações de imunohistoquímica para a detecção de PCNA e VEGF, as imagens das lâminas foram capturadas por meio de escaneamento de toda a

⁴ Dako

⁵ Dako

⁶ Santa Cruz Sc-152

⁷ Zymed, San Francisco, CA, USA

⁸ DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA

superfície dos cortes pelo equipamento Pannoramic MIDI⁹ para a quantificação das estruturas de interesse. Para a quantificação dos mastócitos em proliferação, os cortes escaneados da reação de imunohistoquímica para o PCNA foram identificados com a ajuda de Software⁸ e com o módulo NuclearQuant⁸. Inicialmente, as áreas com a presença de mastócitos tumorais foram selecionadas e isoladas do restante do tecido. Sendo assim, a quantificação das células positivas para o PCNA foi realizada apenas na região tumoral. Foram quantificadas todas as células presentes na região tumoral, diferenciando apenas entre negativas e positivas. Os resultados foram expressos em porcentagem. Para a quantificação do VEGF nos mastócitos, as regiões tumorais das lâminas escaneadas foram selecionadas e analisadas pelo software⁸ e com o módulo DensitoQuant⁸. Este módulo de análise de imagens permite quantificar a intensidade de marcação em negativa, leve (1+), moderada (2+) ou intensa (3+). Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.3.2 Análise de localização de proteína c-KIT

Para todas as lâminas analisadas foram atribuídos um dos três padrões de localização da proteína KIT, conforme descrito em literatura (WEBSTER et al., 2007). O padrão KIT 1 consiste de um padrão predominantemente perimembranoso de localização de proteína KIT com o mínimo de localização citoplasmática. Padrão KIT 2 consiste de localização citoplasmática focal para pontilhada das proteínas KIT, e padrão KIT 3 consiste de localização citoplasmática difusa da proteína KIT. As possíveis células nas margens das secções de tecido não foram consideradas, devido à possível coloração artificial.

4.4 Coloração e contagem das AgNOR

O processamento para coloração e contagem das AgNORs foi realizado no Patologia Morfológica e Molecular do Departamento de Patologia - FMVZ/USP.

A coloração foi realizada conforme descrita em literatura (SIMOES et al., 1994; COSTA et al., 2007). Os cortes histológicos de 5µm previamente preparados foram

⁹ Panoramic Viewer® 3D Histech, Hungria

desparafinizados por meio de imersão em xilol e então em solução de etanol a 100%. Solução de fixação foi preparada para cada experimento, por meio de uma solução de gelatina a 2% e 50% de nitrato de prata, em uma proporção de 1:2. Os cortes histológicos de 5 μ m previamente preparados foram imersos na solução corante sob condições de iluminação reduzida por 45 minutos e lavadas em água destilada. Os depósitos de prata foram fixados por meio de uma solução de 5% de tiosulfito de sódio, por cerca de 2 vezes de 5 minutos. Os cortes foram então lavados novamente em água destilada, e contra-corados com corante verde claro, foram novamente desidratados, e limpos em xilol e foram montados em suporte sintético médio.

As preparações coradas foram examinadas por meio de microscopia de luz, usando uma objetiva de 100x, e então foi contada e determinada uma média de AgNORs por núcleo em 100 mastócitos neoplásicos. Todos os pontos agirofílicos, sejam eles associados ao núcleo ou ao nucléolo foram contados. As AgNORs foram contadas excluindo áreas de necrose e inflamação.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

No período deste estudo foi atendido um total de 68 animais com diagnóstico citológico de mastocitoma, sendo 35 inicialmente selecionados. Dentre estes, apenas 20 puderam ser utilizados para estudo clínico e imunohistoquímico e dentre estes, 15 para estudo clínico, imunohistoquímico e termográfico.

5.1 Estudo clínico

As fêmeas representaram 55% (11/20) e os machos 45% (9/20) do total de cães selecionados. As raças mais prevalentes foram a Boxer e a Golden Retriever, cada uma representando 25% (5/20) do total de animais, seguidas pelos SRD com 20% (4/20), do Labrador Retriever com 15% (3/20); as raças Cocker Spaniel, Shar-pei e Pug foram observadas em igual proporção, cada uma com 5% (1/20) do total. A idade média dos animais deste estudo foi de 8,2 anos (mínimo de 2 e máximo de 14 anos).

As localizações das formações foram bastante variáveis: 40% (8/20) foram evidenciadas em membro pélvico; seguidas das localizações em cabeça e cervical - 15% (3/20) e região abdominal -15% (3/20); lateral de tórax - 10% (2/20) e membro torácico - 10% (2/20), cauda - 5% (1/20) e região de bolsa escrotal - 5% (1/20).

20% (4/20) dos animais apresentaram o surgimento de novo mastocitoma em região diferente da inicial no decorrer do acompanhamento clínico, num período médio de 11,5 meses (entre 6 a 19 meses); e apenas 10% (2/20) apresentaram recidiva da formação inicial, num período médio de 7,5 meses (entre 7 e 8 meses).

Apenas 10% (2/20) dos cães do estudo apresentaram margens laterais comprometidas após excisão com margem de 3 cm laterais e um plano fascial profundo. Para estes animais foi seguido protocolo de quimioterapia adjuvante (proprietários optaram por não realizar novo procedimento cirúrgico para ampliação de margens). Um destes animais veio a óbito por causas não relacionadas ao mastocitoma (em 6 meses) e o outro ainda apresenta-se livre de recidiva ou metástase (em 16,5 meses).

Com relação ao estadiamento, 65% (13/20) foi classificada como I-a. 20% (4/20) foram classificados como II-a; 10% (2/20) como III-a e apenas 5% (1/20) como IV-a. Quanto

a classificação pela presença de fatores prognósticos negativos; 45% (9/20) apresentou classificação 0/13, seguida de 35% (7/20) dos animais apresentando classificação 1/13 e 5% (1/20) para cada classificação a seguir: 2/13, 3/13, 4/13, 6/13.

15% (3/20) dos pacientes apresentaram metástase em linfonodo local, sendo 10% (2/20) deles apresentando metástase tardia, juntamente com recidiva; e apenas 5% (1/20) com metástase no momento do diagnóstico.

O tempo médio de acompanhamento dos pacientes foi de 16 meses (variando entre 6 a 24 meses). 20% (4/20) dos animais vieram a óbito no decorrer do estudo; sendo que apenas 10% (2/20) tiveram óbito relacionado ao mastocitoma (recidiva e metástase).

O quadro 1 resume todas as informações clínicas referentes aos animais do estudo.

Quadro 1 - Distribuição dos dados epidemiológicos e sinais clínicos dos 20 cães incluídos na pesquisa. FMVZ/USP - São Paulo - 2013

Quadro Clínico													
Cão N°	Raça	Sexo	Idade (anos)	Localização	Acompanhamento (meses)	Óbito (outras causas)	Óbito (relacionado)	Nova Formação (meses)	Recidiva (meses)	Estadiamento (WHO)	Fatores prognósticos (1-13/13)	Margens livres	Metástase linfonodo
1	Golden Retriever	F	10	Cervical	19,7	não	não	19	não	II-a	1/13	sim	não
2	Golden Retriever	M	12	Lábio superior	24,7	não	não	não	não	I-a	1/13	sim	não
3	Golden Retriever	F	2	Abdominal	21	não	não	não	não	I-a	0/13	sim	não
4	Boxer	F	7	MPD	18,6	não	não	não	não	I-a	0/13	sim	não
5	Labrador Retriever	F	11	Lateral tórax	6	CAD	não	não	não	I-a	0/13	não	não
6	Shar-Pei	F	6	MPD	16,5	não	não	não	não	II-a	4/13	não	não
7	Golden Retriever	F	9	MPD	12,2	não	sim	8	8	IV-a	3/13	sim	sim
8	Labrador Retriever	M	6	Cauda	9	não	não	não	não	I-a	1/13	sim	não
9	Labrador Retriever	M	14	MPE	13,1	não	não	não	não	I-a	1/13	sim	não
10	SRD	F	12	MTD	9,8	não	sim	não	7	II-a	6/13	sim	sim
11	SRD	M	11	MPE	15,7	não	não	não	não	I-a	0/13	sim	não
12	Boxer	M	5	MPE	13,1	não	não	12	não	I-a	0/13	sim	não
13	Boxer	M	12	Escroto	10,4	ICC	não	não	não	II-a	1/13	sim	sim
14	SRD	F	3	MPD	11,1	não	não	6	não	I-a	0/13	sim	não
15	Boxer	M	8	Lateral tórax	12,6	não	não	não	não	III-a	1/13	sim	não
16	Golden Retriever	M	5	Cervical	22	não	não	não	não	I-a	1/13	sim	não
17	Pug	F	6	Abdominal	20,6	não	não	não	não	I-a	0/13	sim	não
18	Cocker Spaniel	F	7	MTD	20	não	não	não	não	I-a	0/13	sim	não
19	SRD	M	11	Abdominal	21,7	não	não	não	não	III-a	2/13	sim	não
20	Boxer	F	7	MPD	22,4	não	não	não	não	I-a	0/13	sim	não

F= Fêmea, M = Macho, SRD = Sem Raça Definida, MTD = Membro torácico direito, MPD = membro pélvico direito, MPE = membro pélvico esquerdo. CAD = Cetoacidose diabética

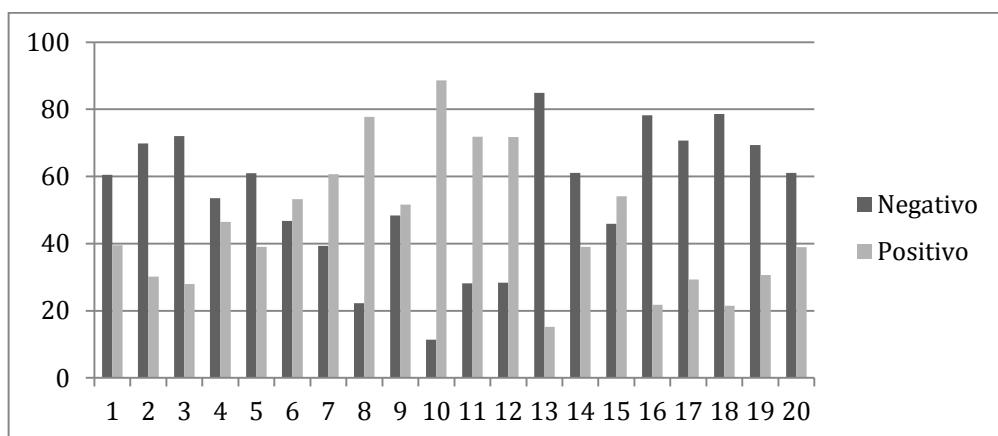
5.2 Estudo Histopatológico

Em relação a classificação histopatológica de Patnaik (1984), 95% (19/20) dos animais teve suas formações classificadas como Grau II; 5% (1/20) como Grau I. Dentre os animais de classificação grau II, 10% (2/20) tiveram suas formações classificadas como mastocitomas subcutâneos. Todos os cães do estudo (20/20) tiveram suas formações classificadas como Baixo Grau, de acordo com a classificação de Kiupell (2011).

5.3 Quantificação PCNA

Os dados da quantificação do PCNA encontram-se expostos na tabela 1. Durante a contagem, realizada em cada lâmina inteira, com o auxílio de Software¹⁰, foram estabelecidos padrões em cruzes para colorações fracamente positivas a fortemente positivas. Para análise estatística, os dados foram agrupados e as marcações fracamente positivas (+) foram considerados negativas na contagem final. O gráfico 1 ilustra as variações de marcação para cada animal do estudo.

Gráfico 1 - Variação dos animais do estudo, de acordo com quantidade de marcações positivas e negativas para o PCNA



¹⁰ Pannoramic Viewer®

5.4 Classificação c-KIT

A marcação para KIT foi evidenciada em 18 (90%) dos 20 animais do estudo. Destes, 50% (9/18) dos cães tiveram suas formações classificadas como c-KIT grau III, seguida de 44% (8/18) dos animais com classificação c-KIT grau II e apenas 5,5% (1/18) como c-KIT grau I. Os dados encontram-se expostos no quadro 2.

5.5 Quantificação AgNOR

Foi realizada marcação para AgNORs em todos os 20 animais do estudo. Excluindo áreas de necrose ou inflamação, foi realizada a contagem dos pontos agirofílicos em 100 mastócitos, e a contagem referente a cada paciente esta exposta no quadro 2. A média de pontos agirofílicos foi de 159,05 (variando entre 107 e 195 pontos).

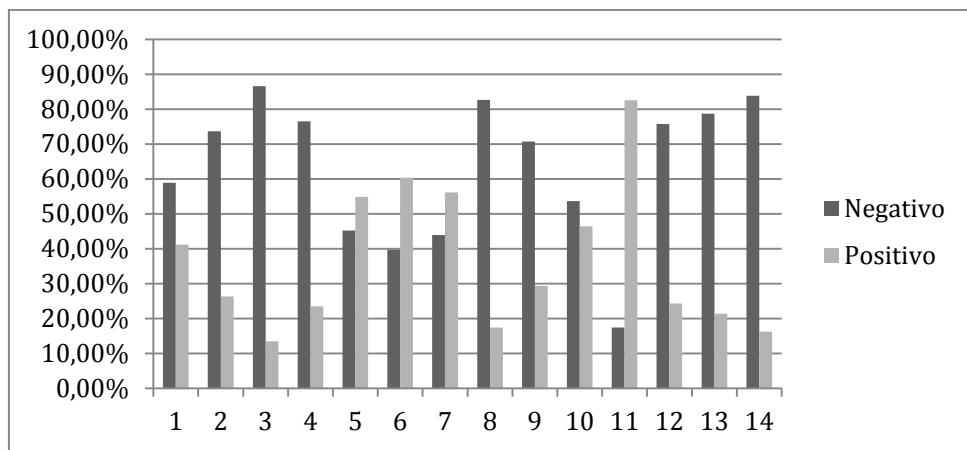
5.6 Quantificação VEGF

Dos 20 animais do estudo em 30% (6/20) não foi possível evidenciar a marcação para o VEGF. Assim sendo, 14 animais entraram nas contagens para esse marcador.

Durante a contagem, realizada em cada lâmina inteira, com o auxílio de Software¹¹, foram estabelecidos padrões em cruzes para colorações fracamente positivas a fortemente positivas. Para análise estatística, os dados foram agrupados e mesmo as marcações fracamente positivas (+) foram considerados positivas na contagem final (Quadro 2). O gráfico 2 ilustra as variações de marcação para cada animal do estudo.

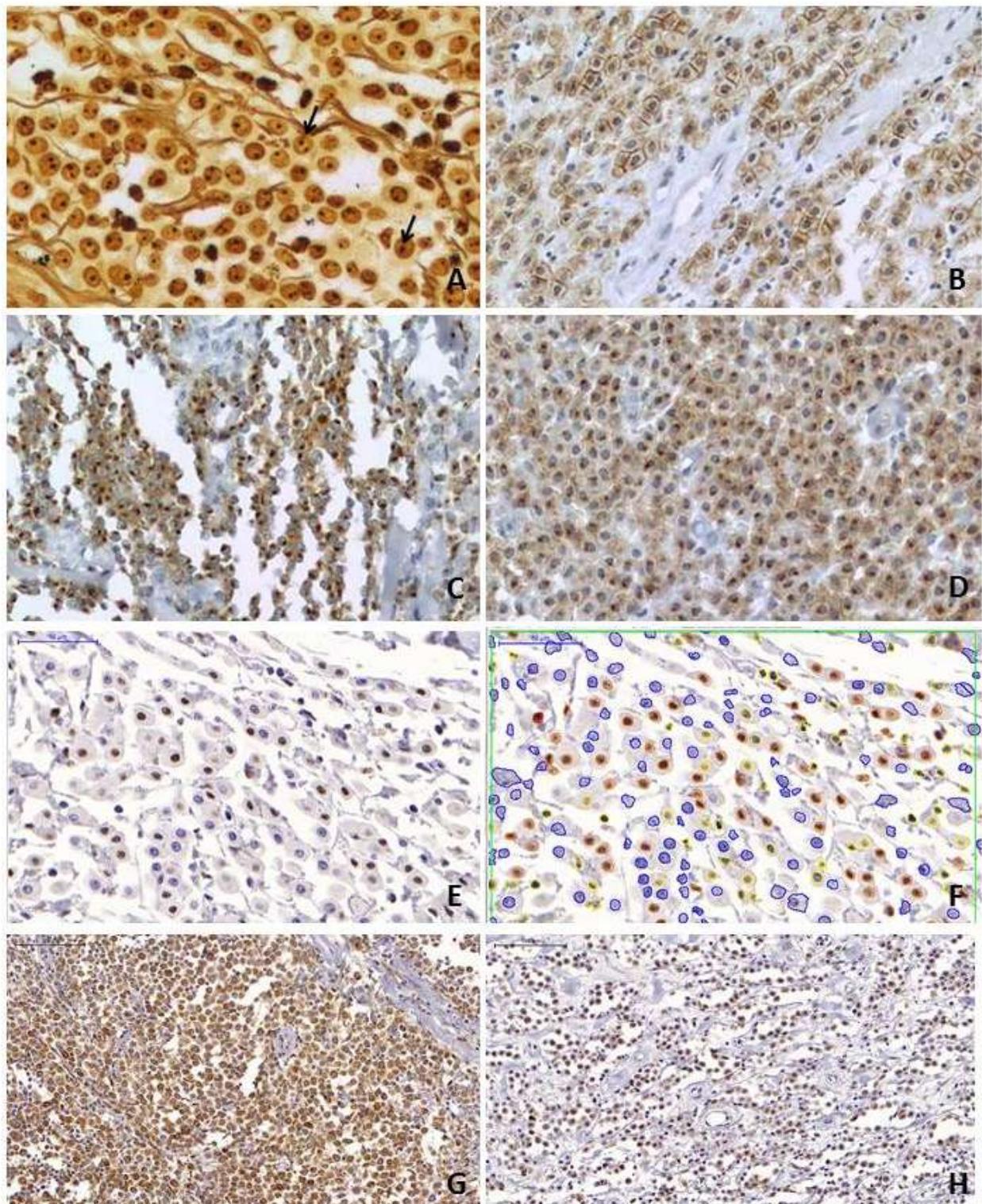
Gráfico 2 - Variação dos animais do estudo, de acordo com quantidade de marcações positivas e negativas para o VEGF-A

¹¹ Pannoramic Viewer



A figura 2 ilustra cada uma das marcações aqui realizadas.

Figura 2 - Exemplos das colorações para AgNOR, KIT, PCNA e VEGF em diferentes animais deste estudo.



Legenda: (A) Coloração para AgNOR em aumento de 40x . Setas indicam nucléolos positivamente marcados pela técnica. (B-D) Marcação para o padrão KIT em aumento de 20x – Classificação de acordo com a localização de KIT (B) KIT I, (C) KIT II, (D) KIT III. (E-F) Marcação para PCNA em aumento de 40 x. (E) Marcação para PCNA (F) Marcação para PCNA, na mesma área de “E”, com marcações estabelecidas pelo Software Pannoramic Viewer, onde linha verde evidencia área selecionada pelo Software para contagem, linhas azuis indicam células fortemente positivas (+++), linhas amarelas indicam células medianamente positivas (++) e linhas vermelhas células fracamente positivas (+). (G-H) Marcação para VEGF em aumento de 20x (G) Marcação para VEGF fortemente positiva (H) Marcação para VEGF fracamente positiva

Quadro 2 - Descrição das porcentagens PCNA e VEGF, valores AgNOR, KIT e valores das análises termográficas referente aos 20 cães do projeto. FMVZ/USP - São Paulo - 2013

CÃO Nº	PCNA (%)					KIT	AgNOR	VEGF (%)					Análise Termográfica (°C)					
	Negativo	+	++	+++	Total Positivo			Negativo	+	++	+++	Total Positivo	SpT	SpNT	Média	Diferença	AT	ANT
1	60,48	40,4	38,6	0,9	39,51	III	177	58,86	16,96%	20,75%	3,43%	41,14	35,40	34,10	34,75	1,3	34,60	33,40
2	69,85	28,7	29,3	0,9	30,14	-	174	73,67	3,02%	12,80%	10,52%	26,33	-	-	-	-	-	-
3	72,00	39,3	26,5	1,4	27,99	II	143	86,53	3,21%	7,01%	3,25%	13,47	34,50	36,30	35,40	-1,8	34,80	36,00
4	53,55	37,5	45,3	1,1	46,44	III	167	76,51	13,36%	9,32%	0,81%	23,49	35,60	35,90	35,75	-0,3	36,10	35,70
5	61,00	26,0	37,3	1,7	38,99	III	172	45,20	9,28%	29,85%	15,67%	54,80	36,00	34,90	35,45	1,1	34,80	35,60
6	46,79	36,4	52,9	0,4	53,20	II	182	-	-	-	-	-	30,10	35,70	32,90	-5,6	30,10	34,00
7	39,28	26,7	45,9	14,8	60,71	III	166	39,69	24,70%	33,89%	1,71%	60,31	36,50	35,00	35,75	1,5	34,50	35,80
8	22,20	14,5	52,1	25,7	77,79	II	159	43,92	11,45%	31,00%	13,63%	56,08	36,20	31,80	34,00	4,4	35,50	32,90
9	48,33	25,4	46,6	5,0	51,66	III	137	82,64	1,06%	11,25%	5,06%	17,36	28,70	33,50	31,10	-4,8	35,60	34,30
10	11,37	9,5	55,8	32,8	88,62	III	195	70,66	10,47%	18,71%	0,17%	29,34	32,30	28,50	30,40	3,8	29,30	32,90
11	28,17	18,3	53,1	18,7	71,82	II	145	53,65	16,37%	27,09%	2,89%	46,35	32,60	33,60	33,10	-1	32,50	34,10
12	28,30	16,0	59,4	12,3	71,69	II	141	17,43	19,64%	42,91%	20,02%	82,57	28,70	33,50	31,10	-4,8	31,60	33,60
13	84,85	27,3	15,0	0,1	15,14	III	107	-	-	-	-	-	30,90	34,20	32,55	-3,3	31,40	33,70
14	61,01	25,2	36,8	2,2	38,98	III	172	-	-	-	-	-	33,30	32,30	32,80	1	31,80	33,10
15	45,88	29,8	49,1	5,0	54,11	II	144	-	-	-	-	-	32,30	28,50	30,40	3,8	32,50	31,10
16	78,19	31,3	21,3	0,5	21,80	I	157	-	-	-	-	-	34,60	33,10	33,85	1,5	34,00	33,00
17	70,71	34,9	29,1	0,2	29,28	III	150	75,73	5,41%	10,91%	7,96%	24,27	-	-	-	-	-	-
18	78,56	34,9	30,1	0,6	21,43	-	141	78,65	8,78%	9,26%	3,32%	21,35	-	-	-	-	-	-
19	69,32	25,5	19,6	1,8	30,67	II	189	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	50,40	30,7	37,6	1,3	68,30	II	163	83,84	4,54%	6,69%	4,93%	16,16	-	-	-	-	-	-

Notas: (PCNA) Resultado final da expressão do PCNA para os animais do estudo; após agrupamento dos padrões em cruzes. (KIT) Classificação dos animais do estudo de acordo com marcação para a localização da proteína KIT. (AgNOR) Classificação dos cães do estudo, de acordo com a contagem de nucléolos positivos para AgNOR em 100 mastócitos. (VEGF) Resultado final da expressão do VEGF-A para os pacientes do estudo; divididos em positivos e negativos para coloração.(Análise termográfica) SpT - temperatura no ponto central da formação; SpNT - temperatura no ponto distante da formação; A T (temperatura média na área tumoral); ANT (temperatura média em área distante da formação, de igual tamanho da Área T). "Diferença" corresponde a variação de temperatura entre SpT e SpNT. Se negativa, formação mais fria; se positiva, formação mais quente que pele controle.

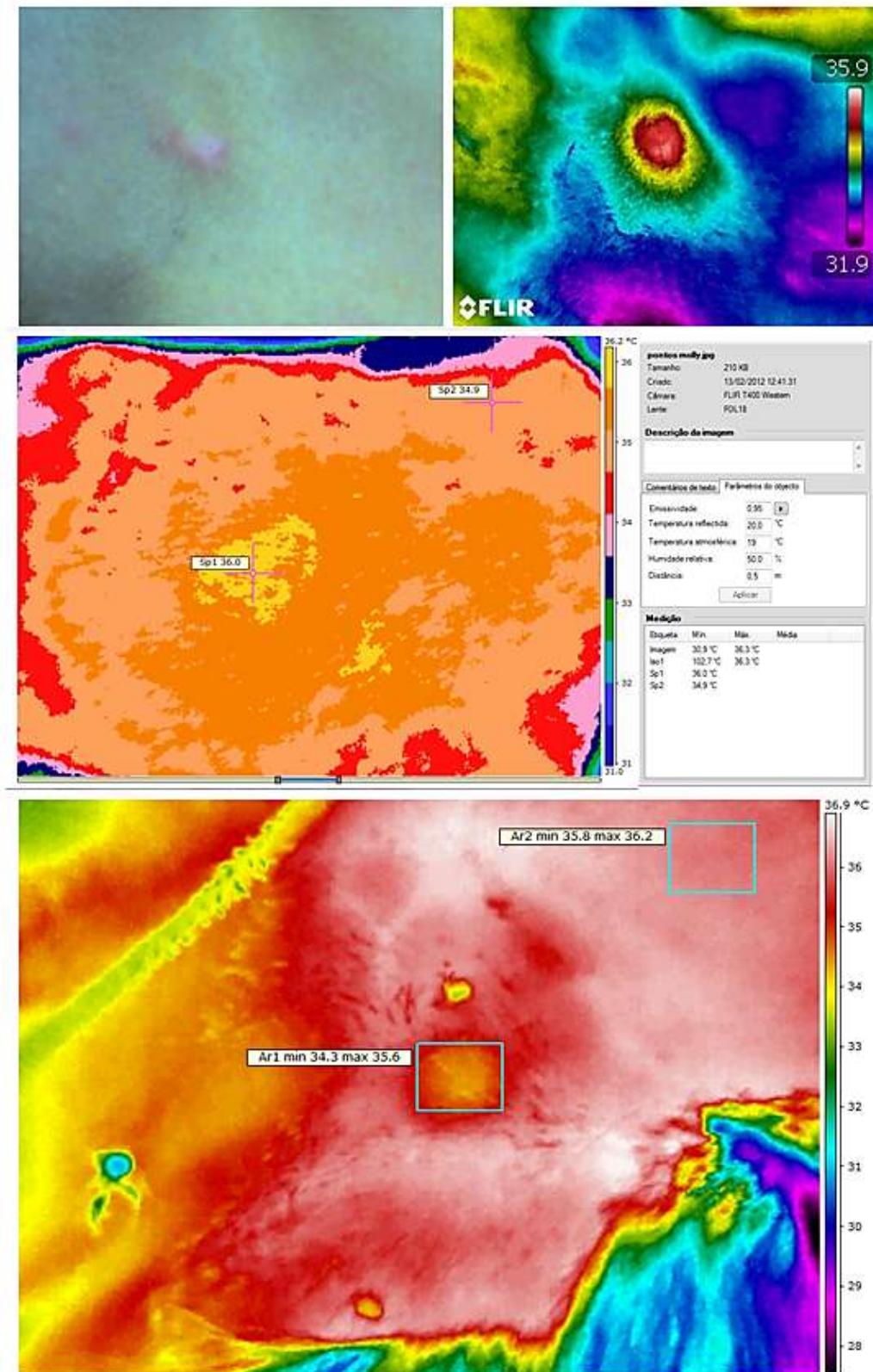
5.7 Análises Termográficas

As análises termográficas foram realizadas em 15 dos animais deste estudo. O quadro 2 resume as informações obtidas das análises das imagens térmicas de cada formação. A figura 3 ilustra e exemplifica as imagens obtidas e suas análises.

A média de temperatura do ponto central das formações (SpT) foi de 33,18°C (variando entre 28,70 e 36,5°C) e a média de temperatura do ponto não-tumoral distante da formação (SpNT) foi de 33,39°C (variando entre 28,50°C e 36,30°C). Ainda, foi realizada a mensuração de temperatura média dentro de área tumoral (AT) - 33,27°C (variando entre 29,30°C e 36,10°C) e de temperatura média dentro de área não tumoral (ANT) - 33,95°C (variando entre 31,10 e 36,00°C). A diferença entre os pontos mensurados foi em média - 0,21°C (variando entre -5,60°C e +4,4°C).

A diferença entre os pontos térmicos mensurados foi em média -0,21°C (variando entre -5,60°C e +4,4°C). Esta diferença foi negativa em 7 casos (47%) – formações mais frias que a pele distante; e positiva em 8 casos (53%) – formações mais quentes que a pele distante.

Figura 3 – Amostras das análises termográficas realizadas pelo Programa Quick Report.®



Legenda: (A) – Fotografia de mastocitoma do Cão N° 1 (B) Imagem infravermelha (paleta *rain*) da mesma região na foto A; (C) – Análise de imagem infravermelha (paleta *medical*) do mastocitoma do Cão N°5, no Software FLIR Quick Report®; Sp1 = SpT e Sp2 = SpNT. (D) Imagem infravermelha (paleta *rain*) de mastocitoma do Cão N°3; Ar1 – Área da formação AT e Ar2 – Área controle ANT. – Software FLIR Quick Report®.

5.7 Análise Estatística

As características quantitativas dos animais foram descritas com uso das chamadas “medidas resumo” (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e o estadiamento e C-Kit foram descritos com uso de frequências absolutas e relativas (KIRKWOOD; STERNE, 2006).

Foram calculadas as correlações de Spearman dos marcadores com estadiamento, fatores prognósticos e a diferença da termografia da região tumoral com a região não tumoral para verificar a existência de relação entre essas variáveis. Bem como das diferenças absolutas da termografia na região tumoral e não tumoral e verificada se as diferenças absolutas são diferentes de zero com uso de testes t-Student para uma população para verificar se há diferença na termografia entre a região tumoral e não tumoral, (KIRKWOOD; STERNE, 2006).

Foi estimado o tempo médio de sobrevida livre de doença segundo categorias dos marcadores (uso das medianas para categorizar), estadiamento, fatores prognósticos e diferença na termografia com os respectivos intervalos com 95% de confiança, não sendo estimados os tempos medianos devido ao baixo número de eventos (óbito, recidiva ou nova formação) com uso da função Kaplan-Meier (KLEINBAUM, 1996) e comparados tempos entre as categorias com uso de testes log-rank. Foram estimados os riscos relativos (Hazard Ratio-HR) com uso do modelo de regressão de Cox.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

Tabela 1- Descrição das características quantitativas avaliadas nos animais - FMVZ/USP - São Paulo - 2013

Variável	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N
Fatores prognósticos	1,10	1,59	1	0	6	20
PCNA	45,45	20,44	39,25	15,14	88,63	20
VEGF	36,64	20,64	27,84	13,47	82,57	14
AgNOR	159,30	21,14	161	107	195	20
SpT	33,18	2,66	33,3	28,7	36,5	15
SpNT	33,39	2,36	33,6	28,5	36,3	15
Diferença ponto (T-NT)	-0,21	3,26	1	-5,6	4,4	15
Área T	33,27	2,11	34	29,3	36,1	15
Área NT	33,95	1,36	33,7	31,1	36	15
Diferença área (T-NT)	-0,67	1,92	-1,2	-3,9	2,6	15
Acompanhamento (meses)	16,01	5,40	16,1	6	24,7	20

Notas: DP = Desvio Padrão, N = número de animais, T = Tumoral, NT = Não tumoral

A tabela 1 descreve os valores dos fatores prognósticos dos animais, sendo a variação de 0 a 6 fatores, há variação nos marcadores entre os cães e observa-se que as diferenças na

termografia (tumoral *versus* não tumoral) apresenta tanto valores positivos como negativos, o que representa que há tumores mais quentes e mais frios que a região sem tumor.

Tabela 2- Descrição dos estadiamentos e C-KIT dos animais

Variável	Frequência	%
Estadiamento		
I-a	13	65,0
II-a	4	20,0
III-a	2	10,0
IV-a	1	5,0
Total	20	100
KIT		
I	1	5,6
II	8	44,4
III	9	50,0
Total	18	100

A tabela 2 mostra que a maioria dos animais apresentou estadiamento I-a (65%) e padrão KIT - III (50%).

Tabela 3 - Resultado da correlação de Spearman, indicando as diferenças na termografia entre região tumoral e não tumoral, estadiamento, fatores prognósticos e marcadores

Correlação	PCNA	VEGF	KIT	AgNOR	Estadiamento	Fatores prognósticos	Diferença ponto (T-NT)
VEGF	r 0,626						
	p 0,017						
	N 14						
KIT	r -0,062	0,019					
	p 0,808	0,952					
	N 18	13					
AgNOR	r 0,147	0,191	0,164				
	p 0,535	0,513	0,516				
	N 20	14	18				
Estadiamento	r 0,208	0,349	0,239	0,004			
	p 0,380	0,221	0,339	0,988			
	N 20	14	18	20			
Fatores prognósticos	r 0,286	0,284	0,181	0,244	0,755		
	p 0,222	0,326	0,473	0,300	<0,001		
	N 20	14	18	20	20		
Diferença ponto (T-NT)	r 0,283	0,274	0,047	0,407	0,252	0,283	
	p 0,307	0,444	0,869	0,132	0,364	0,306	
	N 15	10	15	15	15	15	
Diferença área (T-NT)	r -0,061	-0,224	-0,062	-0,150	-0,192	-0,122	0,474
	p 0,830	0,533	0,827	0,593	0,494	0,664	0,074
	N 15	10	15	15	15	15	15

Resultado da correlação de Spearman; r=ratio, p=valor, N = número de animais, T = Tumoral, NT = Não tumoral

A tabela 3 mostra que há correlação direta estatisticamente significativa entre VEGF e PCNA ($r = 0,626$ e $p = 0,017$) e entre os fatores prognósticos e o estadiamento ($r = 0,755$ e $p < 0,001$), mas não há correlação estatisticamente significativa entre estadiamento e

marcadores, entre fatores prognósticos e marcadores ou entre diferenças na termografia e marcadores ($p > 0,05$).

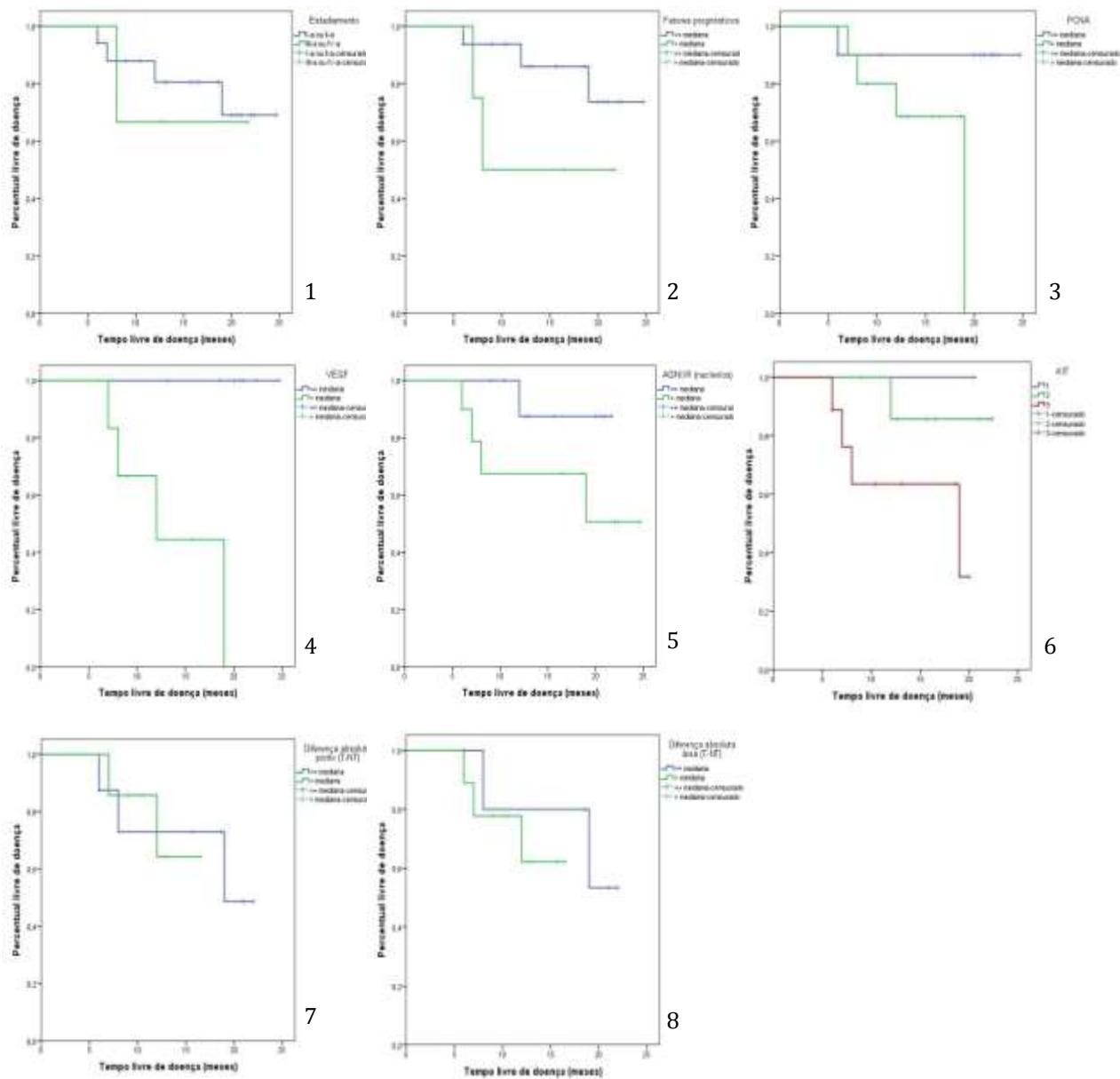
Tabela 4 - Descrição das diferenças absolutas da termografia entre região tumoral e não tumoral e resultado dos testes comparativos

Variável	Média	DP	IC (95%)		p
			Inferior	Superior	
Diferença absoluta ponto (T-NT)	2,67	1,75	1,70	3,63	<0,001
Diferença absoluta área (T-NT)	1,73	0,99	1,18	2,28	<0,001

Resultado do teste t-Student; DP = desvio padrão, IC = índice de confiança, p = p valor

A tabela 4 mostra que as diferenças absolutas na termografia entre as regiões tumoral e não tumoral são em média estatisticamente diferentes de zero, tanto na avaliação de um único ponto como na avaliação da área ao redor do tumor ($p < 0,001$). Isso mostra que a termografia na região tumoral apresenta resultados diferentes da região não tumoral, mas como foi apresentado na tabela 5, há tumores mais quentes e mais frios que a região não acometida.

Figura 4 - Gráfico (1) Função de sobrevida de Kaplan-Meier do tempo livre de doença segundo estadiamento. Gráfico (2) Função de sobrevida de Kaplan-Meier do tempo livre de doença segundo categoria de fatores prognósticos. Gráfico (3) Função de sobrevida de Kaplan-Meier do tempo livre de doença segundo categoria de PCNA. Gráfico (4) Função de sobrevida de Kaplan-Meier do tempo livre de doença segundo categoria de VEGF. Gráfico (5) Função de sobrevida de Kaplan-Meier do tempo livre de doença segundo categoria de AgNOR. Gráfico (6) Função de sobrevida de Kaplan-Meier do tempo livre de doença segundo padrão KIT. Gráfico (7) Função de sobrevida de Kaplan-Meier do tempo livre de doença segundo categoria das diferenças na termografia avaliada num único ponto. Gráfico (8) Função de sobrevida de Kaplan-Meier do tempo livre de doença segundo categoria das diferenças na termografia avaliada na área



Os gráficos 1 a 6 da figura 4 sugerem que apenas os marcadores apresentam alguma relação com os tempos de sobrevida livre de doença dos animais, pois, observa-se que os tempos de sobrevida dos animais com marcadores acima da mediana parecem ser menores.

Tabela 5 -1 Estimativa dos tempos médios livre de doença segundo categorias de interesse e resultado dos testes comparativos

Variável	Tempo médio (meses)	Erro Padrão	IC (95%)		HR	IC (95%)		Óbito/Recidiva/ Nova formação	Total	%	p
			Inferior	Superior		Inferior	Superior				
Estadiamento											
I-a ou II-a	20,90	1,68	17,62	24,19	1,00			4	17	23,5	0,766
III-a ou IV-a	17,13	3,73	9,83	24,44	1,39	0,16	12,51	1	3	33,3	0,179
Fatores prognósticos											
<= mediana	21,84	1,50	18,90	24,78	1,00			3	16	18,8	
> mediana	14,60	3,55	7,63	21,57	3,23	0,53	19,58	2	4	50,0	
PCNA											
<= mediana	22,83	1,77	19,35	26,31	1,00			1	10	10,0	0,089
> mediana	15,90	1,76	12,46	19,35	6,65	0,61	71,93	4	10	40,0	
VEGF											
<= mediana	24,70	0,00	24,70	24,70	1,00			0	7	0,0	
> mediana	13,61	2,51	8,68	18,54	#			4	7	57,1	
AgNOR											
<= mediana	20,49	1,13	18,26	22,71	1,00			1	10	10,0	
> mediana	18,00	2,65	12,80	23,19	4,79	0,53	43,01	4	10	40,0	
KIT											
1	20,60	0,00	20,60	20,60	1,00			0	1	0,0	
2	20,91	1,38	18,22	23,61	#			1	8	12,5	
3	14,95	2,12	10,80	19,11	#			4	9	44,4	
Diferença absoluta ponto (T-NT)											
<= mediana	17,23	2,37	12,59	21,87	1,00			3	8	37,5	
> mediana	14,18	1,39	11,46	16,90	1,05	0,15	7,51	2	7	28,6	
Diferença absoluta área (T-NT)											
<= mediana	18,40	2,42	13,67	23,13	1,00			2	6	33,3	
> mediana	13,58	1,41	10,81	16,34	2,10	0,22	20,23	3	9	33,3	

Não é possível estimar por ausência de casos nessas condições, HR = Hazard ratio, IC = Índice de confiança, p = p valor

Pela tabela 5, tem-se que apenas o VEGF influencia estatisticamente no tempo de sobrevida livre de doença dos animais com mastocitoma ($p = 0,004$), mas apesar de não significativo, observa-se menor tempo de sobrevida livre de doença nos animais com PCNA e AgNOR acima das medianas ($p = 0,089$ e $p = 0,123$ respectivamente).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A seleção dos animais deste estudo, baseada nos critérios de inclusão e exclusão, bem como a avaliação da viabilidade do material histológico para a obtenção de boas colorações imunohistoquímicas refletiu na retirada de boa parte dos animais atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Departamento de Cirurgia junto ao HOVET-FMVZ/USP. No período deste estudo foi atendido um total de 68 animais com diagnóstico citológico de mastocitoma, sendo 35 inicialmente selecionados. Dentre estes, apenas 20 puderam ser utilizados para estudo clínico e imunohistoquímico e dentre estes, 15 para estudo clínico, imunohistoquímico e termográfico. Sendo assim, o número de animais aqui representados foi muito inferior ao número de casos analisados, e por não refletir a totalidade dos animais não pode ser utilizada como base epidemiológica para esta neoplasia.

As informações obtidas com relação a tempo de sobrevida e tempo livre de doença foram obtidas nas consultas de acompanhamento dos casos, ou quando não possível, por meio de contato telefônico.

A literatura ainda não define se a presença de novos tumores são metástases de formação original ou tratam-se de evento isolado (SEGUIN et al., 2001). Neste trabalho, tempo livre de doença foi estabelecido como tempo livre de recidiva local, de surgimento de novos mastocitomas em qualquer parte do corpo do animal, de surgimento de metástase e/ou de óbito relacionado ao mastocitoma. Sendo assim, qualquer um destes eventos após o procedimento cirúrgico foi estabelecido como progressão da doença e foi buscado correlação com os outros parâmetros aqui apresentados.

6.1 Estudo clínico

Com base nos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 20 animais para este estudo. As fêmeas representaram 55% e os machos 45% do total de animais, o que corrobora, dentro desta seleção, com a descrição da literatura de que não há predileção sexual no desenvolvimento desta neoplasia (WELLE et al., 2008; LONDON; SEGUIN, 2003) .

As raças mais prevalentes foram a Boxer e a Golden Retriever, cada uma representando 25% (5/20) do total de animais, seguidas pelos SRD com 20% (10/20) e do

Labrador Retriever com 15% (3/20). Da mesma forma, podemos estabelecer que há concordância com a literatura, que descreve o aparecimento desta formação em diversas raças, e inclui a raça Boxer como a de maior risco relativo para o aparecimento da doença (BRODEY, 1970). Ainda, podem-se citar diversos estudos em que as raças Boxer e Retrievers aparecem como a de maior prevalência (SIMOES et al., 1994; WEBSTER et al., 2007; STREFEZZI et al., 2010). A proporção de 20% (4/20) animais sem raça definida, embora não descrita em literatura estrangeira, pode ser observada em proporções similares dentro da casuística nacional (COSTA-CASAGRANDE et al., 2008; MELO et al., 2012).

A idade média dos animais deste estudo foi de 8,2 anos. A literatura internacional aponta como idade média de apresentação de 7,5 a 9 anos (BRODEY, 1970; GOVIER, 2003), e estudo realizado na mesma área geográfica deste indica idade média de 8,43 anos (COSTA-CASAGRANDE et al., 2013 no prelo)¹² mostrando também uma íntima associação de outros estudos com os nossos resultados.

As localizações das formações foram bastante variáveis: 40% (8/20) foram evidenciadas em membro pélvico; seguidas das localizações em cabeça e cervical - 15% (3/20) e região abdominal -15% (3/20); lateral de tórax - 10% (2/20) e membro torácico - 10% (2/20), cauda - 5% (1/20) e região de bolsa escrotal - 5% (1/20). Trabalhos indicam maior prevalência desta neoplasia em região de tronco e períneo, seguidos de extremidade e então de cabeça e pescoço (ROTHWELL et al., 1987; O'KEEFE, 1990). Frente a essa não concordância dos locais observados, cabe ressaltar que nossa seleção de casos incluía animais passíveis de excisão cirúrgica em primeira instância. Sendo assim, algumas localizações podem ter sido selecionadas com maior frequência do que outras por facilidade de excisão cirúrgica sem necessidade de quimioterapia citorredutora, e não devem refletir as localizações presentes na casuística local.

Com relação ao estadiamento, a 65% (13/20) foi classificada como I-a, 20% (4/20) foram classificados como II-a; 10% (2/20) como III-a e apenas 5% (1/20) como IV-a. Quanto a classificação proposta pela presença de fatores prognósticos negativos; 45% (9/20) apresentou classificação 0/13, seguida de 35% (7/20) apresentando classificação 1/13 e 5% (1/20) para cada classificação a seguir: 2/13, 3/13, 4/13, 6/13. Estatisticamente pudemos demonstrar uma correlação positiva significativa entre a classificação proposta determinada pela presença dos fatores prognósticos e o estadiamento proposto pela WHO, o que demonstra

¹² COSTA-CASAGRANDE, T. A.; DE OLIVEIRA BARROS, L. M.; FUKUMASU, H.; COGLIATI, B.; CHAIBLE, L. M.; DAGLI, M. L. Z.; MATERA, J. M. The value of molecular expression. Of KIT and KIT ligand analysed using real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry as a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Comparative Oncology*, 2013. doi: 10.1111/vco.12010.

a importância da determinação e análise dos fatores prognósticos para direcionamento do tratamento; especialmente quando o estadiamento completo (como por exemplo, determinação de comprometimento ou não linfonodos regionais) não for possível.

O tempo médio de acompanhamento dos animais foi de 16 meses (variando entre 6 a 24 meses). Dois animais tiveram acompanhamento por menos de 9 meses e cinco por menos de 12 meses. A literatura sugere que o período de seguimento dos casos seja a partir de 12 meses (KIUPEL, 2005; THAMM et al., 2006; PREZIOSI et al., 2007), mas por conta da nossa seleção de casos e necessidade de exclusão de muitos animais ao longo do estudo, optamos por diminuir tempo de acompanhamento de alguns animais, afim de incluí-los neste estudo.

Animais que vieram a óbito no decorrer do estudo representaram 20% (4/20), sendo que apenas metade - 10% (2/20) teve óbito relacionado ao mastocitoma (recidiva e metástase). A mesma proporção de animais - 20% (4/20) apresentou o surgimento de novo nódulo, diagnosticado por histologia como mastocitoma, em região diferente da inicial no decorrer do acompanhamento clínico, num período médio de 11,5 meses (entre 6 a 19 meses); e apenas 10% apresentaram recidiva da formação inicial, num período médio de 7,5 meses (entre 7 e 8 meses). 15% dos cães (3/20) apresentaram metástase em linfonodo local, sendo 10% (2/20) apresentando metástase tardia, juntamente com recidiva; e apenas 5% (1/20) dos casos apresentavam metástase no momento do diagnóstico.

Não foi observada correlação estatística entre tempo livre de doença (óbito, novas formações, recidiva ou metástase) e o estadiamento ou fatores prognósticos. Pode-se apenas sugerir por meio das análises gráficas das funções de Kaplan-Meier que, a avaliação de um número maior de animais ou um seguimento clínico por período maior poderia indicar associações positivas entre tempo livre de doença e fatores prognósticos.

6. 2 Estudo Histopatológico

95% (19/20) dos animais tiveram suas formações classificadas como Grau II, segundo a classificação histológica padrão (PATNAIK et al., 1984) e 5% (1/20) classificação Grau I. Todos os animais (20/20) tiveram suas formações classificadas como Baixo Grau, de acordo com a classificação proposta por Kiupell (2011).

A literatura descreve que a recidiva após a excisão cirúrgica é potencialmente comum nos tumores de grau II e, mais ainda, nos de grau III, e a metástase e os piores prognósticos estão fortemente associados aos tumores grau III (PATNAIK et al., 1984; SIMOES et al., 1994; HENDRICK; GOLDSCHMIDT, 2002; WEBSTER et al., 2007). Em nosso estudo não houve associação estatística entre tempo livre de doença e a graduação histológica, bem como não houve associação estatística entre nenhum dos fatores aqui analisados e a classificação histológica. Atribuímos isso ao fato de que tivemos a quase totalidade das formações classificadas como Grau II, baixo grau.

Pode-se sugerir que a necessidade de exclusão de casos onde não era possível a excisão cirúrgica em primeiro momento, sem o uso de quimioterapia neoadjuvante, pode ter levado a seleção de tumores menos agressivos, e isso ter refletido na graduação dos tumores apresentada.

Ainda assim, cabe expor que o fato de termos tido certa homogeneidade de classificação histológica em nosso estudo, mesmo com evoluções clínicas e variáveis imunohistoquímicas diferentes, apenas corrobora com a literatura atual (SIMOES et al., 1994; KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2007; OHMORI et al., 2008; GIANTIN et al., 2012) onde determina-se que a classificação histológica não mais pode ser usada isoladamente como método de definição prognóstica e decisões terapêuticas.

Dois animais - 10% (2/20), tiveram suas formações classificadas como mastocitomas subcutâneos. Em literatura, os mastocitomas subcutâneos são descritos pelas mesmas graduações histológicas do cutâneo, e a maior parte deles acaba sendo classificado como grau II (PATNAIK et al., 1984; GROSS et al., 2005, THOMPSON et al., 2011a). Entretanto, estes mastocitomas específicos vêm sendo amplamente estudados por alguns autores como sendo formações de classificação distinta e comportamento também distinto (NEWMAN et al., 2007; THOMPSON et al., 2011a, b). Como formações classificadas como grau II tem prognóstico altamente variável, estudos indicam que é necessário melhorar a caracterização dos mastocitomas subcutâneos, com fins prognósticos (GROSS et al., 2005; THOMPSON et al., 2011a). Dessa forma, optamos por ressaltar esta classificação em nosso estudo.

Dos nossos casos de mastocitoma subcutâneo, 50% (1/2) deles apresentaram evolução clínica favorável (ausência de metástase, recidiva ou óbito no período estudado) e 50% (1/2) apresentou evolução clínica ruim - apesar de excisão cirúrgica com margens livres e uso de quimioterapia adjuvante - levando a recidiva, metástase e óbito em decorrência do tumor. Os resultados do estudo mais recente (THOMPSON et al., 2011a) indicam que a maioria dos mastocitomas subcutâneos tem um prognóstico mais favorável, com tempo de sobrevida

maiores e baixos índices de recorrência e metástase, o que não corrobora com os dados aqui apresentados. O número baixo de animais com esta classificação não nos permitiu correlacionar estatisticamente esses dados, mas cabe ressaltar que acreditamos ser necessária a individualização destes tumores nos estudos relacionados ao mastocitoma, e que uma análise comparativa e com maior número de casos podem nos levar a resultados diferentes do sugerido em literatura atual (GROSS et al., 2005; THOMPSON et al., 2011a).

6. 3 Estudo imunohistoquímico - Quantificação de PCNA, VEGF, AgNOR e classificação pela localização de KIT

A avaliação do padrão KIT foi passível de análise em 18 animais do estudo, tendo sido observadas as seguintes variações na classificação: 5,6% (1/18) dos animais foi considerada KIT - I, 44,4% (8/18) padrão KIT - II e 50% (9/18) padrão KIT - III. Não foi observada correlação estatística entre o padrão KIT e tempo livre de doença ou graduação histológica neste estudo. Embora autores tenham reportado como positiva a associação da localização aberrante de KIT a um menor intervalo livre de doença e menor sobrevida em cães com mastocitoma cutâneo (KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2006; WEBSTER et al., 2007); outros estudos tiveram resultados similares aos nossos e também não encontraram associação da classificação do padrão KIT com a sobrevida e grau histopatológico (NEWMAN et al., 2007; STREFEZZI et al., 2007; COSTA-CASAGRANDE, 2010). Sendo assim, podemos estar frente a uma dificuldade de padronização desta avaliação, visto que as análises são semi-quantitativas e representam o maior padrão presente em 100 mastócitos aleatórios.

Ainda, não houve associação estatística do padrão KIT a nenhum dos outros marcadores (PCNA, AgNOR e VEGF). Webster et al. (2007) demonstraram que localizações aberrantes de KIT foram associados com formações de maior proliferação celular, representadas pelas maiores expressões de Ki67 e das AgNORs.

Nossos resultados sugerem que, associados a outros estudos (NEWMAN et al., 2007; STREFEZZI et al., 2007; COSTA-CASAGRANDE, 2010, ; COSTA-CASAGRANDE, 2013 no prelo¹³) que também não encontraram as mesmas correlações apresentadas por certos autores (KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2006; WEBSTER et al., 2007), a marcação

¹³ COSTA-CASAGRANDE, T. A.; DE OLIVEIRA BARROS, L. M.; FUKUMASU, H.; COGLIATI, B.; CHAIBLE, L. M.; DAGLI, M. L. Z.; MATERA, J. M. The value of molecular expression. Of KIT and KIT ligand analysed using real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry as a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Comparative Oncology*, 2013. doi: 10.1111/vco.12010.

da localização de KIT não deve ser usada isoladamente como padrão de avaliação do prognóstico e comportamento biológico do mastocitoma, e, mesmo associado a outros marcadores, deve ser levado em consideração a dificuldade de sua reproduzibilidade. Ainda assim, cabe ressaltar que o marcador para KIT é muito útil para a diferenciação imunohistoquímica do mastocitoma entre outras neoplasias de células redondas.

A marcação para o VEGF foi observada em 14 animais, tendo sido apresentados como variando de 13 a 82% de positividade, e uma média de 36% de positividade. Embora não tenhamos obtido significância estatística entre a marcação para VEGF e o grau histológico, como Amorim et al. (2010) demonstraram em seu estudo; atribuímos isso ao fato de que nossa classificação histológica foi extremamente homogênea. Em contraposição ao estudo de Amorim, Giantin et al. (2012) relataram que a expressão do VEGF-A, está relacionada com o grau histológico e sugere estes marcadores como possíveis indicadores de malignidade e prognóstico do mastocitoma canino.

Nossa análise estatística demonstra que o VEGF foi o único marcador a demonstrar relação significativa com o tempo livre de doença ($p = 0,004$). Dessa forma, os dados obtidos estão compatíveis com literatura, onde o aumento da expressão do VEGF e de seus receptores tem sido associado à progressão, metastatização e pior prognóstico em diversos tumores malignos (CAPP et al., 2009;). Estudos recentes consideram a marcação do VEGF como possível fator prognóstico negativo a ser investigado em mastocitomas (MEDERLE et al., 2010; GIANTIN et al., 2012) e nossos resultados comprovam os dados de literatura e podem reforçar a inclusão do VEGF dentro dos marcadores a serem analisados para definição do perfil prognóstico dos mastocitomas.

Cabe ainda ressaltar que a análise estatística multivariada dos marcadores aqui apresentados evidenciou que há uma correlação direta estatisticamente significativa entre os marcadores VEGF e PCNA ($r=0,626$ e $p=0,017$), assim como há entre os fatores prognósticos e estadiamento. Desse modo, podemos reforçar a importância da análise da marcação para VEGF – ainda não rotineira - no estudo da proliferação tumoral dos mastocitomas, visto sua associação direta com um marcador de significativa representatividade na divisão celular.

A mensuração da atividade proliferativa pode acrescentar informações importantes para a formulação de um prognóstico mais confiável identificando, por meio de marcações histo e imuno-histoquímicas (ABADIE et al., 1999). Entre esses métodos, merecem destaque a contagem de células em mitose (ROMANSIK et al., 2007), a determinação da frequência de Regiões Organizadoras Nucleolares com afinidade pela prata (AgNOR) (BOSTOCK et al., 1989, SIMOES et al., 1994, KRAVIS et al., 1996) e a contagem de células positivas para o

Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) (SIMOES et al., 1994; ABADIE et al., 1999).

Neste estudo, a marcação para PCNA foi analisada em todos os animais, e foi positiva, em média, em 45% dos casos, com uma variação de 15 a 88%. A contagem de nucléolos positivos para coloração AgNOR em 100 mastócitos também foi realizada em todos os animais do estudo, tendo demonstrado média de contagem de 161 nucléolos, com mínimo de 107 e máximo de 195.

Vários estudos demonstram que altas contagens de AgNOR em mastocitomas estão relacionados a aumento de mortalidade, recorrência local e metástase (SIMOES et al., 1994; KRAVIS et al., 1996; MORINI et al., 2004; WELLE et al., 2008). O índice de PCNA foi maior nos cães que morreram em função do mastocitoma do que nos que sobreviveram, mas, apesar disso, não foi demonstrada diferença estatisticamente significante entre os graus histopatológicos (ABADIE et al., 1999; SCASE et al., 2006). A contagem de células positivas para PCNA foi considerada um indicador de sobrevida confiável por Simoes et al. (1994), porém não apresentou valor prognóstico nos estudos realizados por Scase et al. (2006) e Webster et al. (2007). Graus histológicos, AgNORs e PCNA representaram significativa diferença entre tumores recorrentes e não-recorrentes. (SIMOES et al., 1994; WEBSTER et al., 2007).

Apesar de não significativo estatisticamente, em nosso estudo, observa-se menor tempo de sobrevida livre de doença nos animais com PCNA e AgNOR acima das medianas ($p = 0,089$ e $p = 0,080$, respectivamente). Assim, pode-se sugerir por meio das projeções estatísticas gráficas e numéricas que, possivelmente, ao aumentarmos o numero de animais do estudo, encontrámos correlações positivas entre evolução da doença e os marcadores estudados (PCNA e AgNOR), conforme sugere a literatura apresentada.

6.4 Estudo termográfico

As análises termográficas foram realizadas em 15 dos animais deste estudo, e seguiram as especificações sugeridas em literatura (BRIOSCHI et al., 2003). Assim sendo, as imagens foram obtidas em ambiente próprio (sem incidência de luz solar, sem presença de correntes de ar e com iluminação por lâmpadas frias), a temperatura e umidade foram mensuradas a cada imagem obtida, por meio de um termômetro digital, e depois inseridas em

software Quick Report®. O paciente permaneceu ao menos 15 minutos na sala antes da realização das imagens, de forma a permitir equilíbrio térmico entre a pele e a sala.

Em relação a tricotomia também foram seguidas as especificações da escassa literatura veterinária, que relata métodos de uso de termografia em cães (LOUGHIN; MARINO, 2007) e sugere aguardar ao menos 15 minutos após a tricotomia de animais de pelame longo para captura das imagens infravermelhas, garantindo a manutenção do padrão térmico.

A média de temperatura do ponto central das formações (SpT) foi de 33,18°C (variando entre 28,70 e 36,5°C) e a média de temperatura do ponto não-tumoral distante da formação (SpNT) foi de 33,39°C (variando entre 28,50°C e 36,30°C). Ainda, foi realizada a mensuração de temperatura média dentro de área tumoral (AT) - 33,27°C (variando entre 29,30°C e 36,10°C) e de temperatura média dentro de área não tumoral (ANT) - 33,95°C (variando entre 31,10 e 36,00°C). A diferença entre os pontos mensurados foi em média - 0,21°C (variando entre -5,60°C e +4,4°C).

As análises estatísticas demonstram que as diferenças de temperatura obtidas por meio das imagens infravermelhas entre a região tumoral e a não tumoral são em média estatisticamente diferentes, tanto na avaliação de um único ponto como na avaliação da área ao redor do tumor ($p < 0,001$). Isso mostra que a termografia na região tumoral é estatisticamente diferente da região não tumoral. Assim, com base nos dados aqui apresentados podemos inferir que há uma diferença térmica entre pele sadia e pele comprometida pelo mastocitoma, mesmo que, conforme descrito em literatura, com o uso da técnica semiológica da palpação não seja possível evidenciar algumas dessas diferenças de temperatura (BRIOSHCI et al., 2003). Também foi descrito por Yahara et al. (2003) que anormalidades de temperatura mensuradas diretamente (por meio de agulhas termossensíveis) foram refletidas por meio das imagens termográficas.

Estudos inferem que uma imagem infravermelha típica de um tumor da mama *in vivo* revela 1-3 °C de elevação da temperatura da pele na periferia do tumor (GAUTHERIE et al., 1980). Yahara et al. (2003) demonstraram que a temperatura de tumores mamários de mulheres foi significativamente maior do que a do tecido ao redor e sugeriu uma relação entre a temperatura tumoral e o prognóstico do tumor de mama. Estudos com o uso de xenoenxertos para pesquisa do carcinoma em mulheres (SONG et al., 2007; POLJAK-BLAZI et al., 2009) descrevem a variação de temperatura entre a pele e o tumor como sendo negativa, e estabelecem que embora seja evidenciada a elevação da temperatura da superfície da pele na periferia imediata do tumor, a massa tumoral em si, em alguns momentos de sua evolução,

mostra redução da temperatura em relação a pele sadia. A causa destas mudanças de temperatura não é totalmente compreendida mas sugere-se que seja associada a neoangiogênese local (XIE et al., 2004).

Nos dados por nós apresentados pudemos observar que a diferença entre os pontos térmicos mensurados foi em média -0,21°C (variando entre -5,60°C e +4,4°C). Esta diferença foi negativa em 7 casos (47%) – formações mais frias que a pele distante; e positiva em 8 casos (53%) – formações mais quentes que a pele distante. Isso nos mostra que, ao contrário do que demonstram os estudos com carcinomas mamários, mastocitomas não são necessariamente mais quentes que a pele distante e que a variação de temperatura encontrada (seja ela positiva ou negativa) pode ser maior ou menor do que a descrita em literatura.

Por conta do que sugere a literatura supracitada, em nosso estudo buscávamos uma correlação entre a neoangiogênese (por meio da marcação para VEGF) ou o grau de crescimento do mastocitoma (por meio das marcações AgNOR, PCNA e KIT) e as alterações de temperatura na superfície tumoral. Pelos dados coletados aqui ainda não foi possível correlacionar estatisticamente essas alterações de temperatura com a presença dos marcadores estudados.

6.5 Considerações Finais

A realização deste trabalho buscou descrever o uso da termografia como método diagnóstico complementar em mastocitomas caninos, e o uso de marcadores imunohistoquímicos – os já consagrados em literatura e o VEGF, que encontra-se descrito apenas em trabalhos mais recentes – associados a fatores prognósticos, estadiamento e evolução da doença.

Embora o número de animais da pesquisa não seja elevado e possa ter interferido nos resultados da análise estatística, ela reforça pontos considerados importantes dos mastocitomas caninos. A relativa homogeneidade de nosso perfil histopatológico (19/20 dos tumores classificados como grau II, baixo grau) comparado a grande variação das marcações imunohistoquímicas reforça o fato de que a graduação histopatológica por si só não deve mais ser considerada como única fonte de informações sobre os mastocitomas. Isso válido especialmente para a graduação intermediária – Grau II; que mesmo com a associação da classificação de Kiupell – baixo grau, não se mostrou pareável a nenhum dos marcadores, e a

própria evolução clínica da doença. Ainda, os mastocitomas subcutâneos podem e devem receber maior atenção de nossas pesquisas pois ainda consideramos bem controverso o seu comportamento relatado em literatura como mais “benigno”.

Com relação aos marcadores de proliferação, sugerimos a manutenção do uso do PCNA e do AgNOR, que devem ser associados ao Ki67 para um possível melhor perfil prognóstico. Apesar de não significativo estatisticamente, em nosso estudo, pudemos sugerir por meio das projeções estatísticas gráficas e numéricas que, possivelmente, ao aumentarmos o numero de animais, encontraríamos as correlações positivas entre evolução da doença e estes marcadores estudados.

Embora as marcações para o KIT não tenham evidenciado nenhuma associação com prognóstico ou com outros marcadores, pode-se ainda considerá-lo útil para diferenciação do mastocitoma com outros tumores de células redondas. Embora tenhamos um baixo numero de animais, neste estudo a marcação da localização do KIT foi bem heterogênea e não representou nenhuma importância prognóstica nos casos estudados.

Um dos dados mais importantes foi a correlação estatística obtida com o VEGF, que embora não seja usado como técnica de rotina dentro da determinação do perfil imunohistoquímico dos mastocitomas, foi o único marcador a demonstrar relação significativa com o tempo livre de doença neste estudo. Ainda, apresentou correlação positiva com a marcação do PCNA, que é mais bem descrita. Com base nessas evidências, acreditamos que deva-se incluir o VEGF-A na análise dos mastocitomas; bem como estudos futuros poderão incluir a expressão gênica do VEGF para melhores correlações.

Embora o uso da termografia neste estudo já tenha evidenciado diferenças entre a pele comprometida pelo mastocitoma e a pele sadia, não houve associação estatística entre os dados obtidos por meio desta técnica e todas as demais variáveis deste estudo; como tempo livre de doença, estadiamento, fatores prognósticos e os marcadores para PCNA, VEGF, AgNOR e KIT.

Possivelmente, o aumento do número de animais ou a variação de marcadores possa gerar alguma correlação com a termografia em estudos futuros. Reforçamos que o fato de não haver nenhuma referência em literatura ou padronização de técnica de análise destas formações em animais e em seres humanos torna a análise das imagens termográficas extremamente quantitativas e ainda pouco reproduzível como rotina. De qualquer forma, muitos estudos reforçam a expressividade da termografia no diagnóstico de tumores de mama em mulheres (ARORA et al., 2008; WISHART et al., 2010; WANG et al., 2011) e confiamos que a busca de novos métodos de análise destas imagens e novos estudos correlacionando a

termografia de mastocitomas com variáveis clínicas e histológicas possam nos levar ao encontro de uma nova ferramenta diagnóstica para a detecção e possivelmente avaliação prognóstica destas formações.

Dessa maneira, cremos que o uso das técnicas de captura e análise das imagens infravermelhas de mastocitomas, poderá ser ferramenta importante no estabelecimento de diagnóstico correto e na determinação mais precisa do prognóstico do paciente, desde que correlacionados com uma história clínica completa, um exame físico bem realizado e outros estudos diagnósticos, quando indicados.

7 - CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Frente aos nossos resultados pudemos concluir que:

- [1] há uma associação positiva entre a presença de fatores prognósticos aqui descritos e o estadiamento proposto pela WHO;
- [2] a graduação histológica de Patnaik, mesmo quando associada a classificação de Kiupell, não se mostrou correlacionada a nenhuma das variáveis aqui apresentadas, incluindo tempo livre de doença e marcadores imunohistoquímicos;
- [3] o VEGF foi o único marcador a demonstrar relação significativa com o tempo livre de doença neste estudo;
- [4] os padrões de KIT não puderam ser correlacionados com nenhuma das variáveis analisadas, bem como com fatores prognósticos e tempo livre de doença;
- [5] as análises das imagens termográficas evidenciaram diferenças significativas entre a temperatura da pele sadia e da pele comprometida pelo mastocitoma.

REFERÊNCIAS

MELO, S.R.

REFERÊNCIAS

- ABADIE, J. J.; AMARDEILH, M. A.; DELVERDIER, M. E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.11, n. 215, p. 1629–1634, 1999.
- AMORIM, R. L.; PINCZOWSKI, P.; NETO, R. T.; RAHAL, S. C. Immunohistochemical evaluation of prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 23-27, 2010.
- AYL, R. D.; COUTO, C. G.; HAMMER, A. S.; WEISBRODE, S.; ERICSON, J. G.; MATHES, L. Correlation of DNA ploidy to tumor histologic grade, clinical variables, and survival in dogs with mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 29, n. 5, p. 386-90, 1992.
- ARORA, N.; MARTINS, D.; RUGGERIO, D.; TOUSIMIS, E.; SWISTEL, A. J.; OSBORNE, M. P.; SIMMONS, R. M. Effectiveness of a noninvasive digital infrared thermal imaging system in the detection of breast cancer. **The American Journal of Surgery**, v. 196, p. 523-526, 2008.
- BRODEY, R. S. Canine and feline neoplasia. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 14, p. 309–354, 1970.
- BOQUETE, L.; ORTEGA, S.; MIGUEL-JIMÉNEZ, J. M.; RODRÍGUEZ-ASCARIZ, J. M.; BLANCO, R. Automated detection of breast cancer in thermal infrared images, based on independent component analysis. **Journal of Medical Systems**, v. 36, n. 1, p.103-111, 2012.
- BOSTOCK,, D. E.; CROCKER, J.; HARRIS, K.; Smith, P. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. **Brazilian Journal of Cancer**, v. 59, p. 915-918, 1989.
- BRIOSCHI, M. L.; MACEDO, J. F.; MACEDO, R. A. C. Termometria cutânea: novos conceitos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 2, n. 2, p. 151-160, 2003.
- CAMPS-PALAU, M. A.; LEIBMANN, N. F.; ELMSLIE, R.; LANA, S. E.; PLAZA, S.; MCKNIGHT, J. A.; RISBON, R.; BERGMAN, P. J. Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997–2004). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 5, p. 156–167, 2007.
- DA COSTA, G. R. M.; MATOS, E.; REMA, A.; LOPES, C.; PIRES, M. A.; GARTNER, F. CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. **BMC Veterinary Research**, v. 3, n. 19, 2007.
- COSTA-CASAGRANDE, T. A.; ELIAS, D. S.; MELO, S. R.; MATERA, J. M. Estudo retrospectivo do mastocitoma canino no serviço de cirurgia de pequenos animais – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 3, p. 176-183, 2008.
- COSTA-CASAGRANDE, T. A. **Avaliação de indicadores de prognóstico para mastocitoma canino: estudo clínico-cirúrgico, histológico, imunohistoquímico, estereológico e de expressão gênica**. 2010. 179 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DAVIES, R. D.; WYATT, K. M.; JARDINE, J. E.; ROBERTSON, I. D.; IRWIN, P. J. Vinblastine and Prednisolone as adjunctive therapy for canine cutaneous Mast Cell Tumors. **Journal of Animal Hospital Association**, v. 40, p. 124-130, 2004.

CAPP, C.; ZENNIG, N.; WAJNER, S.; MAIA, A. L. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireoide. **Revista HCPA**, v. 29, n. 1, 2009.

CHICK, V. M. D.; SORENMO, C. M. V. Recurrence rates and sites for grade II Canine Cutaneous Mast Cell Tumors following complete surgical excision. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 1, p. 71-73, 2002.

CIUREA, R.; MĂRGĂRITESCU, C.; SIMIONESCU, C.; STEPAN, A.; CIUREA, M. VEGF and his R1 and R2 receptors expression in mast cells of oral squamous cells carcinomas and their involvement in tumoral angiogenesis. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 52, n. 4, p. 1227-1232, 2011.

CULLEN, J. M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa. Iowa State Press, 2002. p. 3-27.

DAVIS, B. J.; PAGE, R.; SANNE, P. L.; MEUTEN, D. J. Cutaneous mastocytosis in a dog. **Veterinary Pathology**, v. 29, p. 363-365, 1992.

DARTON, K.; BLACK, C. M. Pyroelectric vidicon thermography and cold challenge quantify the severity of Raynaud's phenomenon. **Brazilian Journal of Reumatology**, v. 30, p. 190-195, 1991.

DOWNING, S.; CHIEN, M. B.; KASS, P. H.; MOORE, C. E.; LONDON, C. A. Prevalence and importance of internal tandem duplication in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 1718-1723, 2002.

FANGER, P. O. **Thermal comfort. Analysis and applications in environmental engineering**. Florida: Krieger Publishing Company, 1982.

FERNANDEZ, N. J.; WEST, K. H.; JACKSON, M. L.; KIDNEY, B. A. Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 4, p. 437-445, 2005.

GALLI, S. J.; ZSEBO, K. M.; GEISSLER, E. N. The kit-ligand, stem-cell factor. **Advances in Immunology**, v. 55, p. 1-96, 1994.

GAUTHERINE, M.; GROS, C. M. Breast thermography and cancer prediction. **Cancer**, v. 45, p. 51-56, 1980.

GERRITSEN, R. J.; TESKE, E.; KRAUS, J. S.; RUTTEMAN, G. R. Multi-agent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. **Veterinary Quarterly**, v. 20, p. 28-31, 1998.

GIANTIN, M.; ARESU, L.; BENALI, S.; ARICÒ, A.; MORELLO, E. M.; MARTANO, M.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R.M.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, n. 4, p. 419-429, 2012.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa State Press. Iowa, 2002. p. 105-107.

GOVIER, S. M. Principles of treatment for mast cell tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 103-106, 2003.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Mast cell tumors. In: GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. (Ed.). **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. 2nd ed. Oxford, UK, Blackwell Science Ltd, 2005. p. 853-865.

HARPER, D. Thermography in veterinary medicine. **Infrared Training Center**, v. 1, n. 4, p. 1-2, 2000.

HOTTENDORF, G. H.; NIELSEN, S. W. Pathologic survey of 300 extirpated canine mastocytomas. **Zentralblatt Veterinärmedizin A**, v. 14, p. 272-281, 1967.

HOWARD, E. B.; SAWA, T. R.; NIELSEN, S. W.; KENYON, A. J. Mastocytoma and gastroduodenal ulceration. Gastric and duodenal ulcers in dogs with mastocytoma. **Pathologia Veterinaria**, v. 6, p. 146-158, 1969.

IAMAROON, A.; PONGSIRIWET, S.; JITTIDECHARAKS, S.; PATTANAPORN, K.; PRAPAYASATOK, S.; WANACHANTARARAK, S. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 32, p. 195-199, 2003.

INFERNUSO, T.; LOUGHIN, C. A.; MARINO, D. J.; UMBAUGH, S. E.; SOLT, P. S. Thermal imaging of normal and cranial cruciate ligament-deficient stifles in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 39, n. 4, p. 410-417, 2010.

ISOTANI, M.; ISHIDA, N.; TOMINAGA, M.; TAMURA, K.; YAGIHARA, H.; OCHI, S.; KATO, R.; KOBAYASHI, T.; FUJITA, M.; FUJINO, Y.; SETOGUCHI, A.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M. Effect of Tyrosine Kinase Inhibition by Imatinib Mesylate on Mast Cell Tumors in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 985-988, 2008.

II-LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; CARNEIRO, R. A. Tratamento clínico e cirúrgico de mastocitomas em cães. **A Hora Veterinária**, v. 23, n. 138, p. 06-14, 2003.

JIANG, L. J.; NG, E. Y. K.; YEO, A. C. B.; WU, S.; PAN, S.; YAU, W. Y.; CHEN, J. H.; YANG, Y. A perspective on medical infrared imaging. **Journal of Engineering and Technology**, v. 29, n. 6, p. 257-267, 2005.

KLEINBAUM, D. G. **Survival analysis**: a self-learning text. New York: Springer, 1996. p. 324.

KIRKWOOD, B. R.; STERNE, J. A. C. **Essential medical statistics**. 2nd ed. Massachusetts USA.: Blackwell Science, 2006. 502 p.

KITAYAMA, H.; KANAKURA, Y.; FURITSU, T.; TSUJIMURA, T.; ORITANI, K.; IKEDA, H.; SUGAHARA, H.; MITSUI, H.; KANAYAMA, Y.; KITAMURA, Y.; MATSUZAWA, Y. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. **Blood**, v. 85, p. 790-798, 1995.

KIUPELL, M.; WEBSTER, J. D.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 371-377, 2004.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; BAILEY, K. L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C. J.; FITZGERALD, S. D.; GAMBLE, D.; GINN, P. E.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J.; HOWERTH, E. W.; JANOVITZ, E. B.; LANGOHR, I.; LENZ, S. D.; LIPSCOMB, T. P.;

MILLER, M. A.; MISDORP, W.; MOROFF, S.; MULLANEY, T. P.; NEYENS, I.; O'TOOLE, D.; RAMOS-VARA, J.; SCASE, T. J.; SCHULMAN, F. Y.; SLEDGE, D.; SMEDLEY, R. C.; SMITH, K. W.; SNYDER, P.; SOUTHORN, E.; STEDMAN, N. L.; STEFICEK, B. A.; STROMBERG, P. C.; VALLI, V. E.; WEISBRODE, S. E.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 147-155, 2011.

KLOPFLEISCH, R.; MEYER, A.; SCHLIEBEN, P.; BONDZIO, A.; WEISE, C.; LENZE, D.; HUMMEL, M.; EINSPANIER, R.; GRUBER, A. D. Transcriptome and proteome analysis of tyrosine Kinase inhibitor treated canine mast cell tumour cells identifies potentially kit gnaling-dependent genes. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 96, 2012.

KRAVIS, L. D.; VAIL, D. M.; KISSEBERT, W. C. descrever os demais autores Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 209, p. 1418-1420, 1996.

KONDO, K.; MURAMATSU, M.; OKAMOTO, Y.; JIN, D.; TAKAI, S.; TANIGAWA, N.; MIYAZAKI, M. Expression of chimaera-positive cells in gastric cancer and its correlation with the angiogenesis. **Journal of Surgical Oncology**, v. 93, p. 36-42, 2006.

KONTOS, M.; WILSON, R.; FENTIMAN, I. Digital infrared thermal imaging (DITI) of breast lesions: sensitivity and specificity of detection of primary breast cancers. **Clinical Radiology**, v. 66, p. 536-539, 2011.

LADOMERY, M. R.; HARPER, S. J.; BATES, D. O. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. **Cancer Letters**, v. 249, p. 133-142, 2007.

LARUE, S.M.; GILLETTE, E.L. Radiation therapy. In: Withrow SJ, Vail DM, eds. **Small Animal Clinical Oncology**, 4th edn. Philadelphia, PA: Saunders, p. 193–210, 2007.

LETARD, S.; YANG, Y.; HANSSENS, K.; PALMÉRINI, F.; LEVENTAL, P. S.; GUÉRY, S.; MOUSSY, A.; KINET, J. P.; HERMINE, O.; DUBREUIL, P. Gain of function mutations in the extracellular domain of KIT are common in mast cell tumors. **Molecular Cancer Research**, v. 6, p. 1137-1145, 2008.

LIAO, A. T.; CHIEN, M. B.; SHENOY, N.; MENDEL, D. B.; MCMAHON, G.; CHERRINGTON, J. M.; LONDON, C. A Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. **Blood**, v. 100, n. 2, p. 585-593, 2002.

LIN, T. Y.; BEAR, M.; DU, Z.; FOLEY, K. P.; YING, W.; BARSOUM, J.; LONDON, C. The novel HSP90 inhibitor STA-9090 exhibits activity against Kit-dependent and -independent malignant mast cell tumors. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 10, p. 1266-1277, 2008.

LONDON, C. A.; KISSEBERTH, W. C.; GALLI, S. J.; GEISSLER, E. N.; HELFAND, S. C. Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, p. 399–414, 1996.

LONDON, C. A.; GALLI, S. J.; YUUKI, T.; HU, Z.; HELFAND, S. C.; GEISSLER, E. N. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. **Experimental Hematology**, v. 27, p. 689–697, 1999.

LONDON, C.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p. 473-489, 2003.

- LONDON, C. A.; HANNAH, A. L.; ZADOVOSKAYA, R.; CHIEN, M. B.; KOLLIAS-BAKER, C.; ROSENBERG, M.; DOWNING, S.; POST, G.; BOUCHER, J.; SHENOY, N.; MENDEL, D. B.; MCMAHON, G.; CHERRINGTON, J. M. Phase I Dose-Escalating Study of SU11654, a Small Molecule Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Dogs with Spontaneous Malignancies. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 7, p. 2755-2768, 2003.
- 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. 1064-1069, 2007.
- MA, Y.; LONGLEY, B. J.; WANG, X.; BLOUNT, J. L.; Langley, K.; CAUGHEY, G. H. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, p. 165-170, 1999.
- MACY, D. W. Canine and feline: biologic behavior, diagnosis and therapy. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery**, v. 1, p. 72-83, 1984.
- MACY, D. W. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 15, n. 4, p. 783-803, 1985.
- MADEWELL, B. R. Cellular proliferation in tumors: A review of methods, interpretation, and clinical applications. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 334-340, 2001.
- MARCONATO, L.; MARCHETTI, V.; FRANCIONE, D.; MASSERDOTTI, C.; GREGORI, M.; LEOTTA, R.; ABRAMO, F. Morphometrical approach for predicting regional lymph node micrometastatic load in canine mast cell tumours: preliminary results. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 6, n. 3, p. 167-170, 2008.
- MARINO, D. J.; LOUGHIN, C. A. Diagnostic imaging of the canine stifle: a review. **Veterinary Surgery**, v. 39, n. 3, p. 284-295, 2010.
- MEDERLE, O.; MEDERLE, N.; BOCAN, E.V.; CEAUS, U. R.; RAICA, M. VEGF expression in dog mastocytoma. **Revista Medico-Chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi**, v. 114, p. 185-188, 2010.
- MELO, S. R.; COSTA-CASAGRANDE, T. A.; MATERA, J. M. Evaluation of Collection and Distribution of Samples for Histological, Stereological Analysis and Cell Culture of Canine Mast Cell Tumors. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 2, p. 216-224, 2012.
- MIKULSKA, D. Contemporary applications of infrared imaging in medical diagnostics. **Annales Academiae Medicae Stetinensis**, v. 52, n. 1, p. 35-39, 2006.
- MISDORP, W. Veterinary Cancer Epidemiology. **The Veterinay Quartely**, v. 18, n. 1, p. 32-36, 1997.
- O'KEEFE, D. A. Canine Mast Cell Tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 4, p. 1105-1115, 1996.
- MORINI, M.; BETTINI, G.; PREZIOSI, R.; MANDRIOLI, L. C-kit gene product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 52, p. 705-708, 2004.
- MUKARATIRWA, S.; CHIPUNZA, J.; CHITANGA, S.; CHIMONYO, M.; BHEBHE, E. Canine cutaneous neoplasms: prevalence and influence of age, sex and site on the presence and potential

malignancy of cutaneous neoplasms in dogs from Zimbabwe. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 76, p. 59–62, 2005.

MULLINS, M. N.; DERNELL, W. S.; WITHROW, S. J.; EHRHART, E. J.; THAMM, D. H.; LANA, S. E. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 1, p. 91-95, 2006.

MURPHY, S.; SPARKES, A. H.; BLUNDEN, A. S.; BREARLEY, M. J.; SMITH, K. C. Effects of stage and number of tumors on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumors. **The Veterinary Record**, v. 158, n. 9, p. 287-91, 2006.

NEWMAN, S. J.; MRKONJICH, L.; WALKER, K. K.; ROHRBACH, B. W. Canine subcutaneous mast cell tumour: diagnosis and prognosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, p. 231–239, 2007.

NORTHRUP, N. C.; HOWERT, E. W.; HARMON, B. G.; BROWN, C. A.; CARMICHEAL, K. P.; GARCIA, A. P.; LATIMER, K. S.; MUNDAY, J. S.; RAKICH, P. M.; RICHEY, L. J.; STEDMAN, N. L.; GIEGER, T. L. Variations among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. **Journal of the Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 6, p. 561-564, 2005.

NOWAKOWSKI, A. “Advances of quantitative ir-thermal medical diagnostics”. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON QUANTITATIVE INFRARED THERMOGRAPHY, 8., 2006, Falta local de realização do evento. 2006. p. 143–145.

O’KEEFE, D. A. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 20, n. 4, p. 1105-1115, 1990.

OGURA S.; ABE. S.; SUKOH, N.; KUNIKANE, H.; NAKAJIAMA, I.; INOUE, K.; KAWAKAMI, I. Correlation between nucleolar organizer regions visualized by silver staining and the growth rate in lung adenocarcinoma. **Cancer**, v. 70, p. 63–68, 1992.

PATNAIK, A. K.; EHLLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 5, p. 469-474, 1984.

PATRUNO, R.; ARPAIA, N.; GADALETA, C. D.; PASSANTINO, L.; ZIZZO, N.; MISINO, A.; LUCARELLI, N.M.; CATINO, A.; VALERIO, P.; RIBATTI, D.; RANIERI, G. VEGF concentration from plasma-activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 3, p. 555-561, 2009.

PETERSON, S. L. Scar-associated canine mast cell tumor. **Canine Practice**. v. 12, p. 23–29, 1995.

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

RASSNICK, K. M.; MOORE, A. S.; WILLIAMS, L. E.; LONDON, C. A.; KINTZER, P. P.; ENGLER, S. J.; COTTER, S. M. Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (lomustine). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 601–605, 1999.

REBUZZI, L.; WILLMANN, M.; SONNECK, K.; FLORIAN, K.; KONDO, R.; MAYERHOFER, M.; VALES, A.; GRUZE, A.; PICKL, W.; THALHAMMER, J.G.; VALENT, P. Detection of

vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, p. 320–333, 2007.

RECH, R. R.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; SALLIS, E. S. V.; RAFFI, M. B.; GARMATZ, S. L. Mastocitoma Cutâneo Canino. Estudo de 45 casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 441-448, 2004.

REGUERA, M. J.; RABANAL, R. M.; PUIGDEMONT, A.; FERRER, L. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. **American Journal of Dermatopathology**, v. 22, p. 49–54, 2002.

ROGERS, K. S. Mast cell tumors: dilemmas of diagnosis and treatment. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 87-102, 1996.

ROMANSIK, E. M.; REILLY, C. M.; KASS, P. H.; MOORE, P. F.; LONDON, C. A. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 3, p.335-341, 2007.

ROTHWELL, T. L.; HOWLETT, C. R.; MIDDLETON, D. J.; GRIFFITHS, D. A.; DUFF, B. C. Skin neoplasms of dogs in Sydney. **Australian Veterinary Journal**, v. 64, p. 161–164, 1987.

SCASE, T. J.; EDWARDS, D.; MILLER, J.; HENLEY, W.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; MURPHY, S. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. **Journal of Veterinary Intern Medicine**, v. 20, n. 1, p. 151-158, 2006.

SÉGUIN, B.; LEIBMAN, N. F.; BREGAZZI, V.S.; OGILVIE, G. K.; POWERS, B. E.; DERNELL, W. S.; FETTMAN, M. J.; WITHROW, S. J. Clinical outcome of dogs with grade II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). **Journal of the Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 7, p. 1120-1123, 2001.

SIMPSON, A. M.; LUDWIG, L. L.; NEWMAN, S. J.; BERGAM, P. J.; HOTTINGER, H. A.; PATNAIK, A. K. Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 2, p. 236-40, 2004.

SIMOES, J. P.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 6, p. 637-647, 1994.

SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. 3. ed. Falta local: Saunders, 2002. v. 2.

SONG, C.; APPLEYARD, V.; MURRAY, K.; FRANK, T.; SIBBETT, W.; CUSCHIERI, A.; THOMPSON, A. Thermographic assessment of tumor growth in mouse xenografts. **International Journal of Cancer**, v. 121, 1005-1058, 2007.

STREFEZZI, R. F.; XAVIER, G. J.; CATÃO-DIAS, J. L. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 268-275, 2003.

STREFEZZI, R. F. **Indicadores de prognóstico para mastocitomas: estudo morfométrico e imunohistoquímico**. 2007. 93 f. Tese de doutorado (Doutorado em Patologia Experimental Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2007.

STREFEZZI R. F.; KLEEB S. R.; XAVIER J. G.; CATÃO-DIAS, J. L. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 559-565, 2010.

TAYLOR, R. G.; HOATHER, T.; DOBSON, J. Chlorambucil and prednisolone chemotherapy for dogs with inoperable mast cell tumors: 21 cases. **Journal of Small Animal Practice**, v. 50, p. 284-289, 2009.

TAKAHASHI, T.; KADOSAWA, T.; NAGASE, M.; MATSUNAGA, S.; MACHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 16, n.1, p. 26-30, 2000.

THAMM, D. H.; MAUDLIN, E. A.; VAIL, D. M. Prednisolone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumour – 41 cases (1992-1997). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 491-497, 1999.

THAMM, D. H.; TUREK, M. M.; VAIL, D. M. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, p. 581–587, 2006.

THAMM, D. H.; VAIL, D. M. Mast cell tumors. In: WITHROW & MACEWEN'S, **Small animal clinical oncology**. 4^a ed. St Louis, MO: Saunders Elsevier, 2007, p. 402–424.

THOMPSON, J. J.; PEARL, D. L.; YAGER, J. A.; BEST, S. J.; COOMBER, B. L.; FOSTER, R. A. Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 156–168, 2011a.

THOMPSON, J. J.; YAGER, J. A.; BEST, S. J.; PEARL, D. L.; COOMBER, B. L.; TORRES, R. N.; KIUPEL, M.; FOSTER, R. A. Canine subcutaneous mast cell tumors: cellular proliferation and kit expression as prognostic indices. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 169-181, 2011b.

TRERE, D.; GRAMANTIERI, L.; SIRINGO, S.; MELCHIORRI, C.; BARBARA, L.; BLONDI, L.; DERENZINI, M. AgNOR protein expression correlates with tumour mass doubling time. **Journal of Hepatology**, v. 24, p. 60–65, 1996.

TUNA, B.; YORUKOGLU, K.; UNLU, M.; MUNGAN, M. U.; KIRKALI, Z. Association of mast cells with microvessel density in renal cell carcinomas. **European Urology**, v. 50, p. 530-534, 2006.

VIRCHOW, R. Die krankhaften Geschwülste: 30 Vorlesungen gehalten während des intersemesters 1862–63. **Vorlesungen über Pathologie**, v. 63, n. 3, p. 1–3, 1862.

WANG, J.; SHIH, T. T.; YEN, R. F.; LU, Y. S.; CHEN, C. Y.; MAO, T. L.; LIN, C. H.; KUO, W. H.; TSAI, Y. S.; CHANG, K. J.; CHIEN, K. L. The association of infrared imaging findings of the breast with hormone receptor and human epidermal growthfactor receptor 2 status of breast cancer. **Academical Radiology**, v. 18, n. 2, p.212-219, 2011.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; RESAU, J. H.; KIUPEL M. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia**, v. 8, p. 104–11, 2006.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B.; KIUPEL, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 298–308, 2007.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; THAMM, D. H.; HAMILTON, E.; KIUPEL, M. Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n. 32, p. , 2008.

WELLE, M. M.; BLEY, C. R.; HOWARD, J.; RÜFENACHT, S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 6, p. 321-339, 2008.

WISHART, G. C.; CAMPISI, M.; BOSWELL, M.; CHAPMAN, D.; SHACKLETON, V.; IDDLES, S.; HALLETT, A.; BRITTON, P. D. The accuracy of digital infrared imaging for breast cancer detection in women undergoing breast biopsy. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 36, n. 6, p. 535-540, 2010.

WOLFESBERGER, B.; GUIJA DE ARESPACOHAGA, A.; WILLMANN, M.; GERNER, W.; MILLER, I. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in canine lymphoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, p. 30-40, 2007.

XIE, W.; MCCAHON, P.; JAKOBSEN, K.; PARISH, C. Evaluation of the ability of digital infrared imaging to detect vascular changes in experimental animal tumours. **International Journal of Cancer**, v. 108, p. 790–794, 2004.

YAHARA, T.; KOGA, T.; YOSHIDA, S.; NAKAGAWA, S.; DEGUCHI, H.; SHIROUZU, K. Relationship between microvessel density and thermographic hot areas in breast cancer. **Surgery Today**, v. 33, n. 4, p. 243-248, 2003.