SAMANTA RIOS MELO

**Estudo crítico de mastocitomas caninos e avaliação termográfica de
técnicas de anaplastia**

São Paulo

2017

SAMANTA RIOS MELO

Estudo crítico de mastocitomas caninos e avaliação termográfica de técnicas de anaplastia

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

Departamento:

Departamento de Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Julia Maria Matera

São Paulo

2017

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. 3519
FMVZ

Melo, Samanta Rios
Estudo crítico de mastocitomas caninos e avaliação termográfica de técnicas de anaplasia. / Samanta Rios Melo. -- 2017.
100 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Julia Maria Matera.

1. Mastocitoma canino. 2. Retalhos cutâneos pediculados. 3. Termografia. 4. Cirurgia oncológica. 5. Fatores prognósticos. I. Título

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que a aluna Samanta Rios Melo entregou, nesta data, o projeto de pesquisa intitulado: "Estudo termográfico no uso de retalhos cutâneos pediculados", sob responsabilidade da Profa. Dra. Júlia Maria Matera, o qual foi protocolado sob o nº 3074/2013.

São Paulo, 26 de junho de 2013.

Roseli da Costa Gomes

Chefe do Serviço de Apoio Acadêmico
e secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MELO, Samanta Rios

Título: **Estudo crítico de mastocitomas caninos e avaliação termográfica de técnicas de anaplastia.**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marlene e Luiz, por seu carinho e amor imensuráveis, por sua dedicação e empenho em me deixar ser tudo que eu quisesse. Obrigada por me fazerem realizada e feliz, sou um pedacinho de cada um e isso me faz completa.
Amo vocês!

Ao meu querido Bruno Modesto, companheiro de estudos, de vida e de sonhos. Obrigada por ser forte quando eu não pude ser e por me impulsionar a ser sempre melhor. Obrigada pela ajuda e por tornar possível minha felicidade diária. Te amo!

Ao meu doce pequeno Jon Snow; que aqueceu meu colo todas as vezes que sentei para escrever, e aquece minha alma toda vez que meu sorriso falta. Te amo filho!

Aos meus pacientes desses anos todos de USP; que me fizeram sentir tantas vezes amada, que alegraram minhas manhãs mais cinzentas, e me fizeram ter a certeza inúmeras vezes de que, por eles TUDO vale a pena.

“É bem mais difícil julgar a si mesmo que julgar os outros”

Antoine de Saint-Exupéry – O pequeno Príncipe

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. Julia Maria Matera, pela orientação neste trabalho, pela orientação diária de vida e de como ser uma veterinária melhor. Seu carinho, sua confiança e seu respeito me orgulham e me fazem sentir que conseguimos tudo quando tenho seu apoio. Agradeço imensamente todos os anos de convivência, e de enormes alegrias. Vida de pós graduação incrível foi essa com a melhor orientadora que eu poderia imaginar.

Aos queridos colegas de pesquisa, Eric Vieira Januário (que alegria quando você entrou!), Erika Zanuto, Bruna de Castro Miranda (inesquecível BCM), Cláudia Inglez de Souza, Sebastian Aristizabal, pela companhia diária nesses anos. Pelos cafés, pelas alegrias, pelas dificuldades vividas e superadas. Vocês fizeram essa jornada mais fácil e mais, muito mais, divertida.

As médicas veterinárias do Serviço de Cirurgia e 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; Andressa Nitirini, Ayne Hayashi, Geni Patrício, Patrícia Ferreira de Castro, Patrícia Flor, Sandra Rosner, Viviane Galeazzi.

A grande amiga e Médica Veterinária do Serviço de Diagnóstico por Imagem (por boa parte desse trabalho) Luciane Maria Kanayama; que ainda hoje é minha base, minha família. De coração imenso, só tenho a agradecer pela sua sempre presença.

Aos enfermeiros do Serviço de Cirurgia Otávio, Lelis, Jesus e Miron; que fazem boa parte da nossa vida ser mais divertida, mais fácil e que sem dúvida alguma, sem eles não somos nada.

A todos os professores do Departamento de Cirurgia, que tantas vezes apoiaram, e ajudaram na realização do tratamento de todos esses animais; em especial Profa Dra Aline Magalhães Ambrósio, Profa Dra Ana Carolina Brandão de Campos Fonseca Pinto; Profa Dra Carla Aparecida Batista Lorigados, Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni, Profa Dra Silvia Renata Gaido Cortopassi, Prof Dr Stefano Carlo Filippo Hagen.

A Mariana Matera Veras, e aos funcionários do laboratório de Poluição da Faculdade de Medicina - USP pela ajuda na realização das imuno-histoquímicas.

A Prof. Angélica Miglino pelo uso do laboratório de microscopia eletrônica para a captura das imagens e leitura das lâminas de imuno-histoquímica.

Aos secretários da pós graduação Belarmino Ney Pereira e Livia Gimenes, que ajudaram muito na realização desse trabalho e que tornaram possível .

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.

A FAPESP pela Bolsa de Doutorado 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.

RESUMO

MELO, S.R. **Estudo crítico de mastocitomas caninos e avaliação termográfica de técnicas de anaplastia.** [Critical study of canine mast cell tumors and thermographic evaluation of reconstructive surgery]. 2017. 100f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2017.

Em grande parte das vezes, a excisão cirúrgica apropriada de mastocitomas em cães requer a realização de técnicas de reconstrução para o fechamento da ferida resultante, e o seu conhecimento se torna essencial para todo o cirurgião. Alcançar margens livres tem uma influência significativa sobre o tempo de sobrevida, e deve ser o objetivo para a maioria dos pacientes. A avaliação da evolução de retalhos cutâneos e a mensuração da aderência e neovascularização do tecido no local intencionado é extremamente importante para diagnóstico precoce de falhas na implantação do tecido. Não há evidências em literatura de trabalhos relacionados a avaliação da perfusão tecidual de retalhos cutâneos em animais de companhia, com o uso de técnicas de termografia. Neste trabalho, foram obtidas imagens, do tipo padrão e do tipo termográficas, de 63 mastocitomas, provenientes de 60 cães. A classificação histológica determinada neste estudo foi significativa na influência à sobrevida ($p < 0,001$). A pontuação prognóstica (0-13) aqui proposta, adaptada de Melo e colaboradores (2015) teve forte associação com sobrevida ($p < 0,001$). A presença de metástase foi observada em 17% dos casos, e de recidiva em 14%. Em ambas as ocorrências 90% dos animais acometidos vieram a óbito. Por meio de análises estatísticas comprovamos a associação entre esses dois fatores (metástase e recidiva) com o tempo de sobrevida (em ambas $p < 0,001$). Dentro do nosso estudo foi observado que, em tumores com a presença de AIM (agrupamentos independentes de mastócitos) há um risco de mortalidade 8,57 vezes maior do que animais com margens livres ou mesmo comprometidas. Esse risco é inclusive maior do que o risco de óbito em animais com recidiva (HR 5,13). VEGF-A se mostrou de significância estatística perante sobrevida; confirmando estudo anteriores e sugerido mais uma vez a inclusão desse marcador no perfil prognóstico do mastocitomas. Todas as formações apresentadas neste estudo tiveram análise termográfica concluída e documentada. Nota-se que mesmo quando considerado ponto central ou quando considerada toda área tumoral, 65 e 67% respectivamente, dos mastocitomas eram mais quentes que a pele sadia circundante. A causa destas mudanças de temperatura não é totalmente compreendida, mas sugere-se que esteja associada a neoangiogênese e inflamação local (XIE et al., 2004). Por meio das análises estatísticas é possível afirmar que as regiões tumoral e não tumoral são significativamente diferentes, tanto na avaliação de ponto central (SpT e SPNT) como na avaliação da área (AT e ANT) do tumor e pele circundante sadia ($p < 0,001$). Ainda por meio de termografia, pudemos estabelecer que retalhos cutâneos pediculados apresentaram chance de deiscência 5,57 vezes maior do que o uso de outras técnicas de anaplastia e deslizamento de tecidos. Por fim, conseguimos estabelecer uma curva

térmica de evolução das feridas da nossa população do estudo, bem como diferenciar o comportamento térmico quando há ou não deiscência. Isso pode ser útil a estudos futuros ou mesmo à prática clínico-cirúrgica, de modo a comparar a evolução de pacientes com as curvas previamente aqui estabelecidas, sendo factível assim prever a cicatrização da ferida. Acreditamos, por meio deste estudo, que a análise termográfica da evolução de retalhos cutâneos pode ser usada como correspondente a perfusão tecidual, conforme indicado em literatura e ser usada como ferramenta de reconhecimento precoces de deiscência da ferida cirúrgica, conforme proposto por diversos autores (SALMI et al., 1995; EICHHORN et al., 2009; WEERD et al., 2009; WEERD et al., 2011).

Palavras-chave: mastocitoma canino, retalhos cutâneos pediculados, termografia, cirurgia oncológica, fatores prognósticos.

ABSTRACT

MELO, S.R. **Critical study of canine mast cell tumors and thermographic evaluation of reconstructive surgery** [Estudo crítico de mastocitomas caninos e avaliação termográfica de técnicas de anaplastia]. 2017. 100f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2017.

In most cases, proper surgical excision of mast cell tumors in dogs requires reconstructive techniques for the closure of the resulting wound, and it knowledge becomes essential for the surgeon. Achieving free margins has a significant influence on survival time, and should be the goal for most patients. The evaluation of the evolution of cutaneous flaps and the measurement of tissue adherence and vascularization at the intended site is extremely important for early diagnosis of defects in tissue implantation. There is no evidence in literature of studies related to evaluate tissue perfusion of skin flaps in companion animals, using thermography techniques. In this study, standard images and thermographic ones were obtained from 63 mast cell tumors from 60 dogs. The histological classification of the tumors in this study was significant in survival time ($p < 0.001$). The prognostic score (0-13) proposed here, adapted from Melo et al. (2015), had also strong association with survival time ($p < 0.001$). The presence of metastasis was observed in 17% of cases, and relapse in 14%. In both cases, 90% of the affected animals died. By means of statistical analyzes, we verified the association between these two factors (metastasis and relapse) in survival time (for both $p < 0.001$). Within our study it was observed that in tumors with the presence of AIM (independent mast cell groups) there is a mortality risk 8.57 times higher than animals with free or even compromised margins. This risk is even greater than the risk of death in animals with relapse (HR 5,13). Also, VEGF-A was shown to be statistically significant at survival time; confirming previous studys and leading us to suggets once again the inclusion of this marker in the prognostic profile of mast cell tumors. All the tumors presented in this study had a thermographic analysis completed and documented. It is noted that even when considered central point or tumor area, 65 and 67% respectively, of the mast cell tumors were warmer than the surrounding healthy tissue. The cause of these temperature changes is not fully understood, but it is suggested to be associated with neoangiogenesis and local inflammation (XIE et al., 2004). By means of the statistical analyzes it is possible to affirm that the tumoral and non-tumoral regions are significantly different, as well as in the evaluation of the central point (SpT and SPNT) and in the evaluation of the tumoral area (TA and ANT) im comparison with healthy surrounding skin ($p < 0.001$). Also through thermography, we could establish that skin flaps had a chance of dehiscence 5.57 times greater than the use of other techniques of reconstructive surgery. Finally, we were able to establish a thermal curve of evolution of the wounds of our study population, as well as to differentiate the thermal behavior when there is or not dehiscence. This may be useful for future studies or even clinical-surgical practice, in order to compare the evolution of

patients with the curves previously established here, and it is feasible to predict wound healing. We believe, by means of this study, that the thermographic analysis of the evolution of cutaneous flaps can be used as corresponding to tissue perfusion, as indicated in the literature and be used as an early recognition tool for surgical wound dehiscence, as proposed by several authors (SALMI et al., 1995; EICHHORN et al., 2009; WEERD et al., 2009; WEERD et al., 2011).

Keywords: canine mast cell tumor, skin flaps, thermography, oncologic surgery, prognostic factors.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AIM	Agrupamentos Independentes de Mastócitos
ANT	Área elipsoide de igual tamanho a AT em tecido sadio
AR	Área do retalho cutâneo
AT	Área elipsoide abrangendo a formação
DIRT	Termografia dinâmica infravermelha
DP	Desvio padrão
ESVONC	<i>European Society of Veterinary Oncologists</i> – Associação Europeia de Veterinários Oncologistas
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
HOVET	Hospital Veterinário
HR	Hazar ratio
IC	Intervalo de confiança
MCT	Mastocitoma Canino
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds ratio
SpNT	Temperatura em ponto distante da formação
SpT	Temperatura no ponto central da formação
TC	Tomografia Computadorizada
USP	Universidade de São Paulo
VCS	<i>Veterinary Cancer Society</i> – Associação Veterinária de Câncer
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
WHO	<i>World Health Association</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Mastocitomas caninos.....	17
2.2 Abordagem Cirúrgica do Mastocitoma	18
2.3 Termografia e Oncologia	21
2.4 Termografia e Anaplastia.....	24
2.5 Patogênese.....	25
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Principal	30
3.2 Objetivos Secundários	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Estudo clínico – cirúrgico.....	32
4.2. Estudo termográfico	35
4.3 Estudo Imunohistoquímico	36
4.4 Análise Estatística	38
5 RESULTADOS	41
5.1 Estudo Clínico	41
5.2 Análises termográficas dos mastocitomas.....	44
5.3 Análises Termográficas das Feridas Cirúrgicas	47
5.4 Análises Imunohistoquímicas	60
5.2 Análise Estatística	64
6 DISCUSSÃO	76
Conclusões.....	87
REFERÊNCIAS	89

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Mastocitomas são neoplasias malignas cutâneas de cães, que podem ser únicas ou múltiplas e envolver tecidos cutâneos e/ou subcutâneos, bem como órgãos abdominais (e.g. baço, fígado, intestinos). Dentre as neoplasias malignas de cães, o mastocitoma pode representar até 21% (ROTHWELL et al., 1987; STREFEZZI et al., 2003; WITHROW e MACEVEN, 2013). Por sua importância clínica, comportamento heterogêneo, e grande variabilidade prognóstica é um tumor bastante estudado e descrito em literatura. Em razão disso avanços importantes com relação a estadiamento, tratamento e fatores histológicos foram feitos nos últimos anos. Entretanto, muitas respostas ainda se fazem necessárias em termos de comportamento do mastocitoma canino. As atuais decisões de tratamento deste tipo de neoplasia são baseadas na apresentação clínica da doença, nas características do exame histopatológico, na presença ou ausência de fatores prognósticos negativos, bem como da avaliação de marcadores histológicos e imunohistoquímicos de proliferação.

A remoção cirúrgica quando o tumor está localizado em uma área passível de excisão ampla é o tratamento local mais indicado e eficaz para quase a totalidade dos cânceres malignos (WEISS e FRESE, 1984). Assim sendo, o tratamento recomendado para excisão de tumores cutâneos malignos, incluindo os mastocitomas caninos (MCT) é a remoção cirúrgica completa (SZENTIMREY, 1998; MONTEIRO et al., 2011; MATZ, 2015). Muitos estudos foram feitos em termos de caracterizar a extensão correta de margens cirúrgicas para este tumor, (SIMPSON et al, 2004; SCHULTHEISS et al, 2011; PRATSCHKE et al., 2013; DONNELLY et al., 2015) e a recomendação varia de acordo com a fonte. Frequentemente citada e bem fundamentada encontra-se a realização de amplas margens laterais (2 – 3 cm) e ao menos 1 plano fascial profundo – barreira mesenquimal (SZENTIMREY, 1998; WEISS et al., 2002).

Assim sendo, não raro a excisão cirúrgica apropriada de mastocitomas requer a realização de técnicas de reconstrução para o fechamento da ferida resultante, e o seu conhecimento se torna essencial para todo o cirurgião. Quando este se impõe limitações à remoção agressiva do tumor primário em virtude de preocupações de

fechamento do defeito resultante, a totalidade da ressecção e/ou a sobrevida do paciente podem ser prejudicadas. Alcançar margens livres tem uma influência significativa sobre o tempo de sobrevida, especialmente no caso dos mastocitomas caninos de alto grau (SEGUIN et al., 2006; PRATSCHKE et al., 2013), e deve ser o objetivo para a maioria dos pacientes. Dessa forma, o cirurgião deverá ser agressivo no momento da remoção dessas formações, e consequentemente usar de técnicas de anaplastia para fechar os defeitos produzidos (SZENTIMREY, 1998; MATZ, 2015).

A avaliação da evolução de retalhos cutâneos e a mensuração da aderência e neovascularização do tecido no local intencionado é extremamente importante para diagnóstico precoce de falhas na implantação do tecido. Estudos designaram várias técnicas de avaliação de retalhos e enxertos de pele em humanos, como a avaliação clínica e visual, e recentemente métodos de imagem como termografia (BULSTRODE & WILSON, 2002; EICHHORN et al, 2009, WEERD et al., 2006; WEERD et al., 2011; TENORIO et al., 2011).

Na Medicina Veterinária a termografia é bem pesquisada e documentada em estudos ortopédicos. Foi encontrado apenas um trabalho em literatura atual sobre o uso da termografia como método complementar no diagnóstico e/ou prognóstico no mastocitoma canino (MELO et al., 2015) mas nenhum sobre a evolução de retalhos cutâneos em cães para qualquer tipo de neoplasia. Dessa forma, justificamos nosso estudo com intenção de (1) avaliar clínica e termograficamente a evolução pós cirúrgica de mastocitomas caninos, em especial de retalhos cutâneos pediculados, de modo a estabelecer padrão térmico de evolução favorável e assegurar maior sucesso nas técnicas cirúrgicas; e (2) buscar a padronização termográfica do mastocitoma canino, com intenção de uso diagnóstico e estabelecer correlações com fatores prognósticos conhecidos.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastocitomas caninos

Atualmente, propõe-se o uso de duas classificações histopatológicas para identificar o grau de diferenciação dos mastocitomas caninos que podem ajudar a determinar o prognóstico (PATNAIK et al, 1984; KIUPELL et al., 2011). As classificações envolvem graduação de I, II e III segundo a proposta de Patnaik e colaboradores; e em Baixo Grau e Alto Grau segundo Kiupell e colaboradores. Ainda a graduação intermediária (grau II) é desafiadora clinicamente e de difícil predição prognóstica. Para tais, a investigação conjunta de fatores prognósticos negativos, índice mitótico, comprometimento de linfonodos regionais, por exemplo, tem sido auxiliares e de grande importância clínica.

Ainda à margem dessas classificações anteriores, podemos encontrar os chamados mastocitomas subcutâneos. Estes estão localizados no tecido subcutâneo, geralmente cercado por gordura, são desafiadores para graduar, em especial porque a classificação de Patnaik e colaboradores foi proposta para estes tumores. Por muito tempo estes eram classificados como grau II ou maior. Quando surgiram os primeiros estudos (NEWMAN et al., 2007 e THOMPSON et al., 2011) em que este tipo de tumor subcutâneo foi avaliado separadamente, começou-se a descrevê-lo como um tipo que não envolvia outra graduação. De acordo com a literatura, a variante subcutânea mastocitoma do canino é diferenciada e pode representar tempos de sobrevivência médios estendidos em relação aos graus intermediários, sugerindo um prognóstico em longo prazo um pouco melhor do que as variantes dérmicas de graus mais elevados (NEWMAN et al., 2007). Os estudos mais atuais disponíveis concordam que a maioria dos subcutâneos não se comporta agressivamente (NEWMAN et al., 2007; THOMPSON et al., 2011a; THOMPSON et al., 2011b; MATZ, 2015).

O estadiamento proposto pela WHO é frequentemente citado e usado em literatura para prognóstico de mastocitomas (GOVIER, 2003; MURPHY, 2006; MATZ et al., 2015; PIZZONI et al., 2016; KIUPELL et al., 2016). Todos os autores concordam que a diferenciação entre o estágio 1 e o estágio 2 é de grande importância clínica. Porém, alguns estudos (MURPHY, 2006; KIUPELL et al., 2016) também expressam o fato de que a classificação de estadiamento 3 é controversa, já que a presença de

múltiplos tumores pode não significar metástase cutânea, e sim o aparecimento de novas formações independentes, cuja graduação e estadiamento seriam também independentes. Estudos demonstram sobrevida maior de 5 anos para animais com estadiamento 3 pela WHO (MULLINS et al., 2006). De acordo com Kiupell e colaboradores (2016), um Consenso entre a ESVONC (European Society of Veterinary Oncologists – Associação Europeia de Veterinários Oncologistas) e a VCS (veterinary Cancer Society – Associação Veterinária de Cancer) recomendaram uma troca entre os critérios para estadiamento 2 e 3, visto que o acometimento de linfonodos traz prognóstico pior do que a presença de múltiplos tumores. De qualquer maneira, ainda não foi feita essa mudança e ainda é usada a classificação da WHO em todos os estudos pesquisados.

2.2 Abordagem Cirúrgica do Mastocitoma

O tratamento mais efetivo para mastocitomas solitários e sem metástase é a retirada cirúrgica (GOVIER, 2003). De acordo com Matz (2015) “Cirurgia representa a cura de mais mastocitomas do que qualquer outra modalidade, e a excisão cirúrgica deve ser considerada como o tratamento de escolha para a maior parte dos mastocitomas caninos”. Muitos estudos foram feitos em termos de caracterizar a extensão correta de margens cirúrgicas para este tumor, de modo a obter a completa excisão e a diretriz varia de acordo com a fonte. (SIMPSON et al, 2004; SCHULTHEISS et al, 2011; PRATSCHKE et al., 2013; DONNELLY et al., 2015). Estudos com mastocitomas demonstram a importância da completa excisão cirúrgica do tumor, e extensão da margem é o ponto onde há mais controvérsia. Um estudo proposto por Weisse et al. (2002) avaliou a excisão completa de mastocitomas grau II, com intenção de determinar os índices de recorrência e os locais de aparecimento do tumor. A excisão cirúrgica completa foi obtida em 89% dos casos, por meio do uso de amplas margens laterais e um plano fascial profundo. 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.

Simpson e colaboradores (2004) fizeram uma avaliação das margens cirúrgicas requeridas para a completa excisão de mastocitomas caninos cutâneos. Os resultados mostram que todos os tumores de grau I foram completamente excisados em todas as margens (de 1, 2 e 3cm). 75% dos tumores de grau II foram completamente

excisados a margem de 1cm, e 100% foram completamente excisados a 2cm de margem. Estes resultados sugerem que uma margem lateral mínima de 2cm e uma margem profunda de 1 plano muscular parece ser adequada para a completa excisão de graus I e II de mastocitomas caninos.

Schultheiss e colaboradores (2011) sugerem que mastocitomas de grau I e II podem ser completamente excisados com margens menores do que descrito em literatura. O estudo com 115 tumores mostrou que não houve recorrência em tumores excisados com margens laterais a partir de 1 cm e margens profundas a partir de 4 cm. Houveram ocorrências de metástases em 4 casos (graus II e III). Interessante notar que neste estudo também foi demonstrado que a extensão do edema decorrente da manipulação excessiva do tumor pode tornar difícil a palpação do cirurgião e determinação dos bordos do tumor. Outro estudo (DONNELLY et al, 2015) postula que tumores de alto grau são mais propensos a recidivar do que tumores de baixo grau (35,9% versus 3,9%), sem que haja correlação com margens cirúrgicas livres. Os autores descrevem que 29% dos tumores de baixo grau foram excisados com margens menores que 3 cm, e nenhum apresentou recorrência.

Alternativamente a busca por um tamanho de margem que se enquadre a uma abordagem geral, Pratschke e colaboradores (2013) sugerem um sistema de margens proporcionais ao tamanho do tumor, onde as margens cirúrgicas laterais correspondam ao diâmetro da formação. Foram mantidas as margens profundas como sendo de um plano fascial. Por meio desta abordagem 85% das formações foram excisadas com margens livres, e os autores consideram este um método viável, embora discutam que tumores muito grandes acabam representando margens igualmente amplas e de difícil reconstrução.

A técnica de Mohs, ou cirurgia micrográfica ou ainda, histopatologia transcirúrgica, é por definição uma cirurgia onde a margem de segurança é controlada e estabelecida por meio de microscopia. É um procedimento que se baseia em cortes por congelamento da margem tumoral excisada, com análise feita ainda dentro do tempo cirúrgico. Dessa forma, baseado na informação do patologista, o cirurgião toma a decisão de continuar ou interromper a exérese. Embora essa técnica também possa trazer falhas a obtenção de margens seguras (KOPKE, et; al, 2005); é mais eficiente

que a mensuração de margem em centímetros, uma vez que raramente se sabe o grau do tumor ao excisá-lo.

Szentimrey (1998) descreve os princípios da cirurgia reconstrutora para pacientes oncológicos. O autor estipula que durante o procedimento cirúrgico, após a fase de ressecção ampla da formação, o cirurgião deve reavaliar o caso, verificar se acredita que removeu a totalidade da formação, atentar para o defeito resultante e buscar uma das seguintes opções: (1) fechamento primário – é o melhor se possível, (2) remoção de mais tecido e então fechamento com uso de técnicas de anaplastia ou (3) a cirurgia pode ter de ser convertida para uma forma mais radical (como a amputação), para obtenção de margens livres. Sendo assim, a fase de reconstrução da cirurgia requer flexibilidade intra-operatória, imaginação e habilidade cirúrgicas, combinado com um bom conhecimento da anatomia vascular regional. Ampla tricotomia e preparação cirúrgica de boa parte da região são recomendados para permitir várias opções de anaplastia, se isso for necessário.

Técnicas básicas de cirurgia de reconstrução oncológica podem ser encontrados em livros de oncologia e cirurgia veterinária (PAVLETIC, 1993; WHITROW e VAIL, 2013), e incluem efetiva assepsia, técnica atraumática e cuidados com sementeamento de células cancerosas (como troca de luvas e materiais para fechamento de feridas). De acordo com Sakuma e colaboradores (2003), “A falta de planejamento e uma técnica grosseira contribuem para a falha cirúrgica”. O planejamento cirúrgico no caso de neoplasias malignas depende do conhecimento do tipo do tumor, estágio da doença, grau e comportamento esperado (LIPTAK, 1997). No caso dos mastocitomas, seu comportamento biológico pode ser extremamente heterogêneo e a graduação do tumor dificilmente é conhecida antes do procedimento cirúrgico. Dessa forma, se considera sempre uma abordagem mais invasiva e ampla, sempre que possível (KANT, 2005). Técnicas como histopatologia transcirúrgica, ou biópsia por congelamento, que garantem uma margem mínima de segurança, devem ser consideradas (GILSON & STONE, 1990; KANT, 2005).

Uma vez realizada a excisão da massa tumoral, pode-se efetuar o fechamento da ferida cirúrgica resultante. Se o fechamento do defeito não for possível por meio de sutura simples, as feridas devem ser fechadas com o uso de técnicas reconstrutoras (LIPTAK, 1997). Dentre as técnicas usadas no caso de mastocitomas caninos temos

os retalhos de avanço e de transposição como sendo abordagens versáteis, de fácil execução, uma vez que o cirurgião está treinado, e de custo relativamente baixo (SAKUMA et al., 2003; PAVLETIC, 2010).

Um estudo com 25 cães (SAKUMA et al., 2003) avaliou o comportamento clínico dos retalhos de transposição, interpolação, H-plastia e W-plastia após a excisão de neoplasias cutâneas variadas. O tempo de cicatrização foi de 9-19 dias, e como principal complicação foi a deiscência dos pontos de sutura (40%) e necrose de 10 a 50% do retalho (24%). Estudos que avaliem a vascularização e evolução clínica do retalho, e sua correlação com prognóstico em mastocitomas caninos não foram encontrados em literatura atual.

É conhecido que muitos autores sugerem que após a excisão de mastocitomas devemos esperar uma cicatrização mais lenta (de 14 até 21 dias) e maiores índices de deiscência de feridas por conta dos mediadores das células mastocitárias, em especial histamina e heparina. A histamina inibe o crescimento de queratinócitos e a heparina tem efeito inibidor no crescimento destes em baixas concentrações. (DOBSON & SCASE, 2007; THAMM & VAIL, 2007; WELLE et al., 2008). Acredita-se portanto que mastocitomas cuja margem seja comprometida pode trazer mais complicações no pós-operatório em razão dessas substâncias. Killick e colaboradores (2011) publicaram a respeito da cicatrização de feridas em mastocitomas incompletamente excisados e compararam-na com a cicatrização de feridas após a excisão de histiocitomas. As complicações de cicatrização de ferida cirúrgica se mostraram presentes em 20% dos mastocitomas e em 21% dos histiocitomas, declarando inclusive que tumores maiores apresentaram maiores complicações após sua excisão. Este estudo conclui que não houveram complicações adicionais nas cicatrizações de feridas após excisão de mastocitomas com margem comprometida. O estudo no entanto não declara qual foi o período em que as deiscências ocorreram ou mesmo qual foi o tipo de técnica cirúrgica utilizada.

2.3 Termografia e Oncologia

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 das imagens infravermelhas 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. Sob um ambiente estável de condições térmicas entre 18°C a 25°C, o principal mecanismo para se conseguir o equilíbrio entre o corpo e o ambiente é de perda de calor por radiação a partir da pele para o ambiente. Essa radiação é então captada por meio de câmeras especiais, e produz imagens representativas da temperatura da superfície de um paciente com base na radiação infravermelha emitida a partir da pele (de WEERD et al., 2011).

A utilização desta técnica no campo da oncologia médica reside no fato de que os tumores geralmente têm um aumento na formação vascular, 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). E ainda, atualmente continua aceita a ideia já proposta por Lawson (1956) de que o processo de carcinogênese associada a neoangiogênese resulta em aumento da temperatura também ao redor da área da formação neoplásica (POLJAK-BLAZI et al., 2009).

Estudos termográficos clássicos sugerem 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) e elevação de 0,8 a 2°C na mama contralateral a afetada (LAWSON, 1956). 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).

A quase totalidade dos estudos atualmente publicados que associam termografia e oncologia humana tem sido representada 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). Os estudos mais recentes ainda concluem que esta é uma técnica de boa reprodutibilidade e concordância intra e inter observadores, além de ser não invasiva e fácil uso (GARDUÑO-RAMÓN et al., 2017). Este estudo com 454 mulheres mostrou bons resultados (sensibilidade de 86,84% e especificidade de 89,43%) e sugere que a termografia, embora não seja uma técnica para diagnóstico isolado, pode ser útil como suporte às demais ferramentas, em especial à análise clínica. Da mesma forma, Guirro e colaboradores (2017) também estudaram a técnica em mulheres com tumores de mama e descreveram que há diferença entre o tecido mamário saudável (contralateral) e o tecido comprometido por tumor (variação de 0,11 a 0,78°C), sendo a mama tumoral mais quente que a sadia. Ainda, destacam a baixa sensibilidade dessa modalidade diagnóstica para este uso, e concordam com o fato de que é uma boa técnica para triagem ou avaliação inicial do paciente; que deve ser encaminhado para mais exames e os dados correlacionados com outros achados clínicos.

A literatura específica para uso da termografia em oncologia veterinária até recentemente não trazia nenhum resultado. Redaelli e colaboradores (2014) analisaram por meio de câmera termográfica 110 animais, sem critério de seleção, que foram levados à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Milão. Os autores relatam que os resultados são diferentes dependendo do local e tamanho do tumor. Não foi descrito neste estudo nenhum caso de mastocitoma. Os autores ressaltam aqui uma alta sensibilidade (100%) e baixa especificidade (44%) da termografia para monitorar processos patológicos em pequenos animais, a facilidade e baixa invasividade do exame. Para os autores, esta investigação experimental abre caminhos para futuros estudos sobre o uso em cães e gatos. Declaram ainda que espera-se que esta técnica pode se tornar uma importante ferramenta de diagnóstico por meio de protocolos de trabalho validados e com alta reprodutibilidade.

O primeiro trabalho com o uso da análise das imagens termográficas em tumores de mama caninos foi publicado recentemente (PAVELSKI et al., 2015). Os autores descreveram um significativo aumento de temperatura nas glândulas

comprometidas por tumores malignos em relação às glândulas mamárias sadias, independente do tipo de tumor e da localização. Considerando todas as glândulas mamárias a temperatura média do grupo controle foi de 35,07°C versus 37,86°C do grupo afetado (diferença de 2,79°C). Em suma, consideram a técnica infravermelha de bom uso para neoplasias mamárias caninas, mas sugerem mais estudos buscando correlação entre características histopatológicas dos tumores com estas imagens.

Em 2015, Melo e colaboradores publicaram sobre termografia em mastocitomas canino. Foi encontrada diferença entre a região tumoral e não tumoral, porém não foram encontradas correlações significativas entre as imagens e os fatores prognósticos. Neste estudo, 53% dos tumores eram mais quentes que a pele sadia e 47% mais frios (com variações de -5,6 a +4,4°C). Em virtude do pequeno número de animais estudados (15) os autores sugerem mais estudos com maior número de animais de forma a poder caracterizar termograficamente o mastocitoma canino, mas ressaltam a facilidade, boa repetibilidade e não invasividade do método.

2.4 Termografia e Anaplastia

No uso de técnicas de anaplastia, um adequado planejamento pré-operatório, técnica cirúrgica meticulosa, e um profundo conhecimento da anatomia vascular são cruciais para o resultado pós-operatório bem sucedido. Perdas parciais e totais do retalho, devido à perfusão inadequada são complicações que podem ocorrer quando se usa esta técnica, especialmente pelo cirurgião inexperiente. O conhecimento da anatomia vascular preciso antes do delineamento do retalho pode ajudar a melhorar a segurança e eficácia do procedimento cirúrgico.

A maioria dos cirurgiões conta com a observação clínica da perfusão da pele usando sinais subjetivos, tais como cor da pele, temperatura da pele sentida pela palma da mão, e turgidez tecidual. A mensuração da temperatura de retalhos de pele durante a fase de pós-operatório é um dos mais antigos métodos de monitoramento de *flaps* e retalhos livres e é muitas vezes incluída nos protocolos de acompanhamento pós-operatório de retalhos e enxertos de pele em humanos.

Por causa da interferência a partir de padrões vasculares complexos, tem sido proposto o stress térmico para monitorar o processo de recuperação térmico após a exposição da área de interesse. Esta técnica é chamada termografia dinâmica infravermelha (DIRT). O stress térmico pode ser conseguido, por exemplo, com água

de imersão, ou por aplicação de objetos frios ou quentes na superfície da pele. A taxa padrão e em que a temperatura da pele recupera em direção ao seu equilíbrio é registrado com uma câmera infravermelha (WEERD et al., 2009; WEERD et al., 2011). Itoh e Arai (1993) ilustraram com dois casos clínicos que um *flap* axial pode ser baseado na localização da artéria principal identificada pela localização de um ponto quente na imagem térmica durante o reaquecimento da pele após um desafio frio.

A avaliação da evolução de enxertos livres trouxe algumas informações relevantes, como os retalhos têm um período de hiperemia durante os primeiros dias pós-operatórios (SALMI et al., 1995). Eichhorn et al. (2009) avaliaram a evolução de retalhos miocutâneos em porcos por meio da termografia. O interesse dos autores era a comparação de duas técnicas distintas, e a termografia foi usada e documentada para caracterização da evolução de cada uma delas.

Não há evidências em literatura de trabalhos relacionados a avaliação da perfusão tecidual de retalhos cutâneos em animais de companhia, com o uso desta técnica. Ainda, mesmo em trabalhos humanos não há padronização térmica da evolução favorável dos retalhos.

2.5 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. 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).

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 serão idênticas, elas se encontravam na mesma área aproximada do c-KIT.

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 esta 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 associados a dermatites crônicas,

cicatrizes ou agentes irritantes da pele (HOTTENDORF, NIELSEN, 1967; GOVIER, 2003).

O crescimento infiltrativo de tumores também depende da angiogênese. Os tumores podem produzir fatores de estimulação de crescimento de vasos como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, ou também chamado de VEGF-A). VEGF é o fator primário na regulação da angiogênese e um potencial fator de crescimento autócrino para células neoplásicas com diferentes graus de malignidade (GIANTIN et al., 2012). O aumento da expressão de VEGF é associado com progressão, metástase e em mau prognóstico, em diferentes tipos de tumores malignos (IAMAROON et al., 2003; KONDO et al., 2006; TUNA et al., 2006; CAPP et al., 2009; CIUREA et al., 2011; ZHAN et al., 2013).

Mederle e colaboradores (2010) demonstraram a expressão de VEGF em um mastocitoma canino usando imunoistoquímica. Células tumorais marcaram positivas para VEGF e inflamatórias não marcaram. Para os autores, marcações citoplasmáticas fortes a moderadas podem indicar fator prognóstico negativo nesses tumores.

Alguns estudos investigam a angiogênese intratumoral por meio da expressão de densidade de microvasos intratumorais. Preziosi e colaboradores (2004) identificaram que a angiogênese está relacionada a invasividade tumoral e índice mitótico; e indicam o uso dessa mensuração para determinação prognóstica (associado a graduação histológica) de cães após excisão de mastocitomas.

Um estudo mais recente demonstrou a expressão de VEGF-A em mastocitomas caninos (GIANTIN et al., 2012). Os autores demonstraram que células neoplásicas de mastocitomas expressam VEGF-A tanto em mRNA quanto por meio de expressão de proteína. Também foi observado um aumento da expressão de VEGF correlacionado com a graduação histológica. Neste estudo declara-se ter encontrado uma correlação e envolvimento do VEGF-A com a progressão e malignidade de mastocitomas caninos. Para grande parte dos tumores malignos humanos, é amplamente aceito que a angiogênese tem papel fundamental no crescimento tumoral, propagação e formação de metástase. E dentre vários fatores angiogênicos, o VEGF e seus receptores tem papel fundamental e são considerados os maiores indutores de angiogênese. Dessa forma, tem sido estudadas medicações anti-VEGF para uso em humanos com o objetivo de inibir essa importante via de ativação tumoral (PRAGER et al. 2012). Dessa

forma, Giantin e colaboradores (2012) já sinalizam a potencialidade no uso de drogas anti-VEGF para mastocitomas caninos, embora mais estudos sejam necessários.

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Análise termográfica de retalhos cutâneos pediculado durante o período de pós-operatório de cães submetidos a excisão de mastocitomas, com o intuito de estabelecer o padrão térmico de *flaps*.

3.2 Objetivos Secundários

1. determinar as características clínicas do paciente e do mastocitoma;
2. determinar o estadiamento clínico de cada paciente;
3. determinar o grau histopatológico dos mastocitomas segundo Patnaik (1984) e Kiupell (2011);
4. capturar e analisar imagens infravermelhas dos mastocitomas por meio de câmera termográfica;
5. capturar e analisar imagens infravermelhas da evolução pós operatória das feridas cirúrgicas e dos retalhos realizados para fechamento de defeitos após excisão ampla de mastocitomas em cães;
6. buscar a padronização termográfica do mastocitoma canino, com intenção de uso diagnóstico e estabelecer correlações com fatores prognósticos conhecidos.

4 Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estudo clínico – cirúrgico

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o número de protocolo 3074/2013. Foram incluídos neste estudo animais atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais – Departamento de Cirurgia junto ao HOVET – FMVZ/USP durante o período de agosto/2013 a agosto/2016, com diagnóstico citológico aspirativo por agulha fina de mastocitoma, que tenham se adequado aos critérios de inclusão e não se enquadrado em nenhum critério de exclusão.

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
Cães com diagnóstico citológico de mastocitoma, sendo formação única ou múltipla, passível de excisão cirúrgica da formação.	Formações que não sejam cirurgicamente excisáveis (por tamanho ou localização).
	Formações que sejam cirurgicamente excisáveis, mas que não necessitem de técnica de reconstrução por retalho cutâneo ou de alguma técnica de anaplastia.
	Presença de metástases distantes (verificadas por exame de ultrassonografia abdominal completa e radiografias de tórax em três projeções).
Cães com confirmação do diagnóstico por meio de exame de histopatológico após a excisão cirúrgica.	Animais que tenham recebido tratamento quimioterápico com intervalo de tempo menor que 4 semanas do procedimento cirúrgico.
	Presença de alterações em exames de triagem do animal (hemograma, perfil renal, perfil hepático) que impediriam o procedimento cirúrgico.

Foi feito o uso da Tomografia Computadorizada (TC) quando possível, para pesquisa de metástase local, avaliação e planejamento cirúrgico. Assim sendo, animais que possuíam tumores de grande tamanho e cuja palpação sugeria alto grau de invasividade, foram submetidos a TC para melhor planejamento cirúrgico.

Os dados de cada animal foram coletados no momento do atendimento inicial e incluirão: sexo, idade, raça, peso corpóreo, evolução, localização, tamanho e características visuais da formação, estadiamento seguindo os parâmetros para estadiamento clínico do mastocitoma pela World Health Organization – WHO (IN: WELLE et al., 2008), determinação de fatores prognósticos negativos que foram estabelecidos em MELO et al. (2010) de acordo com a revisão de literatura (SIMOES et al., 1994; GOVIER., 2003; KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2007; GIANTIN et al., 2012) e adaptada neste estudo após nova revisão (PIZZONI et al., 2017; SLEDGE et al., 2016) E cada animal recebeu pontuação (0 – 13) para a presença destes fatores. O Quadro 1 descreve os fatores prognósticos que foram avaliados.

Quadro 1: Treze itens que serão considerados no estudo para classificação dos cães quanto a presença de fatores prognósticos negativos. Modificado de MELO et al. (2010)

Quadro para Índice de Fatores Prognósticos Negativos
<ul style="list-style-type: none"> ❑ Grau histológico: fator preditivo negativo (Patnaik III; Kiupel alto grau) ❑ Estagio clínico (De acordo com OMS: estágios IIa, IIb, IIIa, IIIb, IVa, IVb) ❑ Localização: prepúcio/ escroto/ vulva/ subungueal/ oral/ face/ aural/ junções mucocutâneas/ visceral/ envolvimento da medula óssea ❑ Tamanho do tumor primário (> 3 cm) ❑ Presença de ulceração ❑ Edema/ eritema/ aumento de temperatura local ❑ Rapidez de crescimento geral e rápido crescimento recente ❑ Grau de infiltração nos tecidos periféricos (comprometimento de mais de 1 plano profundo) ❑ Presença de metástases, regionais ou distantes ❑ Recidiva local após tratamento adequado ❑ Desenvolvimento de um novo tumor primário em localização diferente ❑ Presença de síndromes paraneoplásicas ❑ Raças: braquicefálicos melhor prognóstico; Shar pei, Golden Retriever, Labrador Retriever prognóstico ruim

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, e a técnica de reconstrução por retalho pediculado foi realizada quando necessário para finalização do procedimento cirúrgico. Os pacientes que necessitaram de terapias complementares, como quimioterapia adjuvante, ou nova intervenção cirúrgica para ampliação de margens foram acompanhados e submetidos ao tratamento necessário. Os cães foram acompanhados durante todo o período de pós-cirúrgico ou pós-quimioterapia adjuvante a cada mês nos primeiros três meses e após esse período a cada três meses, em consultas de *follow-up*, por um período mínimo de doze meses. Em casos de recidiva ou surgimento de nova formação o animal foi reavaliado antes do prazo previsto.

4.2. Estudo termográfico

Para a obtenção das imagens infravermelhas foi utilizada a câmera FLIR T650sc (câmera termográfica *wi-fi*, com resolução de 307,000 pixels, sensibilidade de 30mK). Foram realizadas imagens da formação antes do procedimento de excisão, bem como da ferida no pós operatório imediato, e em diferentes fases da recuperação. Todas as imagens foram obtidas a mesma distância do animal (0,5m), e em dois ambientes, com temperatura e umidade controlada, de acordo com a fase de pós operatório:

Ambiente 1 - Centro cirúrgico

- Imagem da formação isolada antes da excisão
- Imagem da ferida cirúrgica e retalho cutâneo resultante logo após a finalização da reconstrução Tempo 0

Ambiente 2 - Sala de atendimento

- Imagem da ferida cirúrgica e retalho cutâneo resultante em Tempo 1 (2^o-3^o dia); Tempo 2 (5^o-9^o dia), Tempo 3 (15^o-19^o) e quando possível Tempo Tardio (30-60 dias de evolução pós operatória)

Ambos os ambientes de captação de imagens eram fechados, sem janelas, e sem a presença de correntes de ar; com a temperatura controlada por meio de ar-condicionado e não variando mais de 1°C durante obtenção das imagens. A temperatura e umidade relativa foram mensuradas por meio de termo-higrômetro digital, e depois inseridas em Software¹ para homogeneização das variações de temperatura e umidade e posterior para análise de cada imagem. Os animais foram submetidos a tricotomia da área de interesse e as primeiras imagens infravermelhas foram obtidas 15 minutos após este procedimento.

As imagens obtidas da formação form posteriormente analisadas por meio de computador², e Software específico¹, com mensuração dos seguintes parâmetros:

¹ Software FLIR ResarchIR ®

² Computador HP® e Software FLIR ResarchIR®

- Temperatura no ponto central da formação (SpT);
- Temperatura em ponto distante da formação – maior que 3 cm de distância (SpNT);
- Área elipsoide abrangendo a formação (AT);
- Área elipsoide de igual tamanho a AT, no ponto mais distante da formação – área além da margem cirúrgica de segurança (ANT).
- Área do retalho cutâneo AR – temperatura máxima, mínima e média da área de interesse durante o trans e pós-operatório imediato (T0); e nos tempos T1, T2, T3 de pós operatório e Tempo Tardio.
- Linha de sutura – Curva térmica, Temperatura máxima, mínima e média ao longo da linha de sutura durante o trans e pós-operatório imediato (T0); e nos tempos T1, T2 e T3 de pós operatório e Tempo Tardio.
- Área de deiscência - Temperatura máxima, mínima e média da área de deiscência da ferida cirúrgica, nos momentos em que esta estiver presente.

Dados histológicos de cada tumor também foram registrados após exame histopatológico: graduação da formação segundo Patnaik (1984) e Kiupell (2011), bem como avaliação de margens cirúrgicas laterais e profundas.

O acompanhamento dos animais foi de ao menos 6 meses após excisão cirúrgica, e dados como sobrevivência do retalho cutâneo, intervalo livre de doença, tempo para a recorrência, tempo de sobrevida, e causa de óbito (quando ocorrido) foram obtidos neste período. Recorrência é estabelecida como qualquer caso de surgimento de novo nódulo local, ou distante. Metástase foi estabelecida como qualquer caso de comprometimento de linfonodos regionais ou distantes, ou surgimento da doença em órgãos distantes (baço, fígado, medula óssea, pele de maneira ampla e generalizada caracterizando mastocitose cutânea).

4.3 Estudo Imunohistoquímico

Para animais do estudo foi possível a realização de análises imunohistoquímicas. Foram analisados os marcadores VEGF-A, KIT e Ki67. Para realização das lâminas, cortes de tecido de 5 µm de espessura foram colocados em

lâminas silanizadas, desparafinados e rehidratados. A recuperação dos antígenos VEGF-A e KIT foi realizada por aquecimento dos cortes histológicos em solução tampão de citrato a 1%, pH 6,0, por 5 minutos em panela de pressão e tampão EDTA, já para o Ki-67 realizada por 20 minutos. Após o resfriamento as lâminas foram tratadas para bloqueio de peroxidase endógena, por 30 minutos, em solução de peróxido de hidrogênio a 6%, realizou-se as lavagens das lâminas em água corrente por 10 minutos e água destilada por 5 minutos, foram realizados 5 banhos de PBS de 5 minutos cada. Os cortes histológicos foram submetidos a incubação com anticorpos primários anti-KIT (Dako 1:100), anti VEGF-A (Santa Cruz SC-152, 1:100) e anti Ki-67 (Dako, 1:200) diluídos em tampão PBS (phosphate buffer saline sem tween) contendo albumina bovina 1%(BSA; Sigma A9647) e azida sódica 0,1% (NaN₃) por 30 minutos a 37°C em estufa, seguidos de 18 horas a 4°C em câmara úmida (*over night*), na sequência foram realizadas lavagens com PBS e incubação com polímero Super Picture SuperPicture Poly HRP conjugate durante 30 minutos em estufa à 37°C. A revelação dos antígenos foi realizada através de solução contendo diaminobenzina . A contra coloração foi realizada a desidratação em banhos de álcool graduado (70%, 95% e álcool absoluto duas vezes, com 5 minutos cada), seguida pela diafanização com solução de álcool misturado a xilol e dois banhos de xilol com 10 minutos e montagem em resina sintética e lamínula.

Expressão do VEGF-A

A mensuração da marcação para o VEGF-A foi feita de maneira quantitativa; por meio de marcação de cruces fraca (+), moderada (++) e intensa (+++). As células cujo citoplasma foi corado eram consideradas positivas e através da análise da maior parte da lâmina foi efetuada a análise.

Expressão do Ki-67

Para análise da expressão do Ki67 a contagem foi feita com auxílio do Software Image Pro-plus 6.0, por meio de contagem de 10 campos em objetiva de 40x; contando-se a quantidade de nucléolos marcados. Por meio da contagem em 10 campos os animais foram classificados como marcação >23 (onde mais de 23 nucléolos foram positivos) e < 23 (onde menos de 23 nucléolos foram positivos).

Expressão do KIT

A classificação da expressão do KIT foi mensurada de acordo com Webster e colaboradores (2014); evidenciando a localização predominante da marcação nas células neoplásicas mastocitárias. Dessa forma, 1 dos 3 padrões de marcação da proteína KIT foram designados: KIT-I para um padrão membranoso, onde há evidente marcação na membrana celular e mínima marcação citoplasmática; KIT-II para padrão citoplasmático focal, com perda da marcação membranosa; e KIT-III para padrão citoplasmático difuso, onde a intensidade da marcação obscurece outras características citoplasmáticas. As padronizações foram feitas por meio da análise predominante em ao menos 10% da população de células neoplásicas, em objetiva de 40x.

4.4 Análise Estatística

As características quantitativas dos tumores foram descritas com uso medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) (Kirkwood e Sterne, 2006) e as características qualitativas dos tumores foram descritas com uso de frequências absolutas e relativas (Kirkwood e Sterne, 2006).

Foram estimados os tempos médios de sobrevida dos animais segundo as características tumorais avaliadas com os respectivos intervalos com 95% de confiança, não sendo estimados os tempos medianos devido ao baixo número de óbitos com uso da função Kaplan-Meier (Kleinbaum, 1996) e comparados os 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 bivariado (Kleinbaum, 1996). Para as variáveis que apresentaram influência na sobrevida nas análises bivariadas foram testadas conjuntamente no modelo de regressão de Cox múltipla (Kleinbaum, 1996) para verificar a influência conjunta dessas variáveis na sobrevida dos animais.

Foram descritas as características tumorais segundo ocorrência de deiscência do tumor com uso de frequências absolutas e relativas e verificada a associação com uso de testes qui-quadrado, testes exatos de Fisher ou testes da razão de verossimilhanças e estimados os odds ratio (OR) com os respectivos intervalos com

95% de confiança com uso de regressões logísticas bivariadas (Hosmer e Lemeshow, 2000).

Os valores de temperatura no retalho e bordos foram descritos segundo os tempos de avaliação e comparados entre locais de avaliação e tempos com uso de equações de estimação generalizadas (EEG) com distribuição marginal normal e função de ligação identidade (McCullagh e Nelder, 1989) com matriz de correlações auto-regressiva de 1ª ordem entre os tempos e locais de avaliação. A mesma análise foi implementada para comparar as temperaturas em cada local de avaliação segundo ocorrência de deiscência do tumor e tempos de avaliação. As análises foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni (Neter, et. al., 1996) para verificar onde ocorreram as diferenças.

Os resultados foram ilustrados com uso de gráficos de perfis médios com os respectivos erros padrões. As análises foram realizadas com uso do *software* IBM-SPSS *for Windows* versão 20.0 e tabulados com uso do *software* Microsoft-Excel 2003 e os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Foram obtidas imagens, do tipo padrão e do tipo termográficas, de 63 mastocitomas, provenientes de 60 cães. Destes animais, 48 tiveram sua evolução pós operatória acompanhadas por meio de termografia. Quanto ao fechamento da ferida cirúrgica, em 37 animais foram necessários retalhos cutâneos pediculados para fechamento do defeito criado; nos demais 30 cães este procedimento foi feito por meio de deslizamento de pele e uso técnicas de aproximação cutânea como a *walking sutures*. Independente da técnica de anaplastia utilizada para o fechamento da ferida cirúrgica, todos os animais tiveram o acompanhamento termográfico desta, uma vez que ocorrem mudanças importantes na vascularização, havendo possibilidade de deiscência. No caso dos animais com fechamento por técnica de deslizamento, foi tomada a área de aproximação de pele como equivalência a área do retalho.

5.1 Estudo Clínico

Dos mastocitomas avaliados, 53% foram provenientes de machos (32/60) e 47% de fêmeas (28/60). Quanto à localização, 28% das formações se encontravam em tronco e abdômen, 22% em membros pélvicos, 17% em região genital (vulva, escroto, períneo, prepúcio), 14% em cabeça e pescoço, 11% em lateral de tórax, 5% em membros torácicos, e 3% em cauda. Quanto à classificação histopatológica dos tumores apresentados, usamos a classificação de Patnaik (Patnaik et al, 1984) associada a classificação de Kiupell (Kiupell et al., 2011). A maior parte das formações apresentou uma graduação intermediária: 67% como Grau II/Baixo Grau. Em segundo lugar na representatividade encontramos os mastocitomas classificados como subcutâneos infiltrativos, em 15% dos casos, subcutâneos circunscritos 6% das formações, subcutâneos mistos 6%, e o Grau III/Alto Grau foram representados por 5% dos casos.

Em todos os pacientes a formação foi excisada com mínimo de 3cm de margens laterais e um plano profundo. Quando detectado um mastocitoma de grande tamanho por meio de observação clínica e depois na Tomografia Computadorizada um volume ainda maior e/ou com envolvimento de estruturas mais profundas, foi realizada a técnica de histopatologia trasncirúrgica / Técnica de Mohs, como método de cirurgia microscopicamente controlada (KOPKE et al., 2005), para buscar a obtenção de margens livres sem que houvesse a excisão de tecidos excessivos. A

avaliação das margens cirúrgicas foi feita para todos os tumores e, em 80% dos casos foram obtidas margens livres. Em 8 animais (16%) em que obtivemos margens livres foi possível a observação de agrupamentos independentes de mastócitos, que embora não possuam relação com o tumor original, estes sugerem a formação de novos focos ao redor do tumor original. Em 20% dos casos ao menos uma das margens cirúrgicas foi considerada comprometida. Quanto à terapia adicional a excisão cirúrgica, em 78% dos animais foi utilizada alguma modalidade de quimioterapia. Em 34% dos casos foi realizada quimioterapia adjuvante, em 27% terapia neoadjuvante combinada com adjuvante e em 17% terapia neoadjuvante apenas. Em 22% dos casos não foi utilizada nenhuma modalidade de quimioterapia.

Em relação ao estadiamento dos animais no momento em que foram excisadas as formações, a maior parte, 58% correspondeu ao estadiamento I-a. A segunda maior porcentagem foi encontrada para o estadiamento III-a, abrangendo a 28% dos casos. Estadiamento II-a correspondeu a 8% dos casos, e III-b com 3% dos casos. Os estadiamentos II-b e IV-a tiveram a mesma porcentagem de apresentação, cada um com 1% dos casos. Quanto a presença de fatores prognósticos negativos, 17% dos animais tiveram 0 dos 13 fatores (Score zero) aqui considerados. 47% exibiram de 1 a 3 fatores (Score baixo); outros 35% mostraram de 4 a 8 fatores (Score médio); e 1% apresentaram de 9 a 13 fatores (score alto). Dos animais aqui representados, apenas 14% manifestaram recidiva da formação inicialmente excisada, e 17% tiveram metástase regional e óbito por conta do mastocitoma.

A seguir a tabela 1 representa todas as características clínico-cirúrgicas de cada animal e sua (s) respectiva (s) formação (ções).

Tabela 1: FOLHA A3

5.2 Análises termográficas dos mastocitomas

Todos os 63 mastocitomas do estudo foram submetidos a análise termográfica, tendo sido mensuradas a temperatura do ponto central do tumor (SpT), temperatura de ponto distante da margem cirúrgica (SpNT), temperatura máxima, mínima e média de área tumoral (AT) e área correspondente não tumoral (ANT). A Figura 1 ilustra algumas dessas imagens e da análise feita em computador.

Figura 1: Imagens termográficas (A, C, E, G) e Imagens padrão (B, D, F, H) de mastocitomas do estudo. **(A) e (B)** Cão Nº 54 - mastocitoma grau II / baixo grau em membro pélvico; (A) marcações de SpT (Sp1), SpNT (Sp2), AT (E1), ANT (E2); **(C) e (D)** : Cão Nº 8 – mastocitoma subcutâneo combinado em tronco; **(E) e (F)** Cão Nº 50 – mastocitoma grau II / baixo grau em tronco; **(G) e (H)** Cão Nº 14 – mastocitoma subcutâneo infiltrativo em tronco.

Na Figura 1 pode-se notar um pouco da heterogeneidade dos mastocitomas à termografia. Alguns se apresentam mais quentes (1E, 1G) , outros mais frios (1A, 1C) que a pele ao redor. Ainda, na Figura 1E e 1G exemplificamos a presença de “borrões” de temperatura semelhante ao tumor, que se estendiam por parte da pele sadia. A presença dessa característica chamamos de “*Tumor Tails*” (ou cauda de tumor) e foi encontrada em 19% dos mastocitomas do estudo (12/63).

Mensurações das temperaturas obtidas da análise das imagens termográficas são mostradas na Tabela 2. Foram calculadas as diferenças absolutas para as temperaturas nos pontos e áreas tumorais, em comparação com os pontos e áreas não-tumorais. Diferenças positivas indicam tumor mais quente que pele sadia. Diferenças negativas indicam tumor mais frio que pele sadia. A média de variação térmica absoluta entre o ponto central da formação (SpT) e um ponto distante da margem cirúrgica (SpNT) foi de 1,23°C (DP 0,97). A variação média entre a área do tumor (AT) e da pele sadia (ANT) foi de 1,11°C (DP 0,77). 65% dos mastocitomas analisados foi considerado mais **quente** que a pele sadia, por apresentar variação térmica positiva. Os demais 35% apresentaram variação térmica negativa, sendo mais **frios** que a pele sadia.

Tabela 2: Análises termográficas dos mastocitomas deste estudo. SpT = Ponto central do tumor; SpTN = Ponto em pele sadia; AT = área elipsóide da formação tumoral; ANT = Área elipsóide de pele sadia. Diferenças positivas coloridas em verde, negativas em vermelho.

Cão N°	Tumor N°	SpT	SpNT	Diferença	AT	ANT	Diferença
1	1	37,2125	36,5358	0,676696777	37,40651	36,57572	0,830789241
2	2	33,39625	34,55701	-1,160758972	33,82113	34,53055	-0,709419719
3	3	38,24459	38,43293	-0,188339233	38,11892	38,50428	-0,385363557
4	4	36,36292	36,23928	0,123641968	36,47047	36,03178	0,438690928
5	5	33,06605	36,05976	-2,993713379	33,67344	36,20394	-2,530498957
6	6	37,2309	37,10817	0,12272644	37,27449	37,14066	0,13383064
7	7	36,12788	34,958	1,169887543	35,89389	34,8282	1,065692067
7	8	36,83772	35,05803	1,779697418	36,85269	35,19758	1,655116358
8	9	31,27765	32,98971	-1,712062836	31,56364	32,89895	-1,335302522
9	10	33,44696	33,82029	-0,373325348	33,61994	33,78432	-0,164381694
10	11	34,21128	34,0979	0,113372803	34,44532	34,10359	0,341735657
11	12	37,04676	36,3691	0,67766571	36,78319	36,35144	0,431753274
12	13	38,24459	37,20636	1,038227081	38,23876	37,38453	0,854225338
13	14	34,61975	32,97062	1,649139404	34,3255	33,04501	1,280487764
14	15	36,07834	33,44062	2,637718201	35,88549	33,27107	2,614417223
15	16	35,40744	36,20216	-0,794715881	35,47439	36,23456	-0,760167796
16	17	34,73888	32,84325	1,895629883	34,21555	32,69641	1,519146951
17	18	32,17221	30,88927	1,282934189	32,47292	30,93666	1,536263052
18	19	36,3382	35,67503	0,66317749	36,11667	35,61953	0,497135755
19	20	34,56956	34,92672	-0,357162476	34,69151	34,92424	-0,232733433
20	21	37,04676	35,82411	1,22265625	36,72431	35,91899	0,805320129
21	22	37,97675	37,5188	0,457954407	37,97719	37,49145	0,48573363
22	23	34,71381	35,89857	-1,184764862	37,81737	36,21235	1,605020992
23	24	33,59897	34,29309	-0,6941185	33,17286	34,05945	-0,886589296
24	25	37,79989	37,378	0,421890259	37,48192	37,35294	0,128982647
25	26	36,48643	36,6468	-0,160369873	36,53451	36,72482	-0,190312354
26	27	37,0099	35,43859	1,571311951	36,96172	35,38665	1,575063357
27	28	35,39498	34,75141	0,643569946	35,35502	34,79513	0,559891147
28	29	36,91154	35,9544	0,957149506	36,9457	35,5754	1,370300796
29	30	36,76385	37,4576	-0,693748474	36,28205	37,39202	-1,10996533
30	31	36,92999	36,12169	0,808300018	36,9776	36,17635	0,801252797
31	32	37,26769	37,44536	-0,17766571	37,47415	37,41004	0,064107551
32	33	30,94762	26,37527	4,572345734	30,16339	26,69445	3,468941775
32	34	35,77444	35,32642	0,448013306	35,76795	35,375	0,392947589
33	35	36,01638	35,43236	0,584022522	35,84255	35,39855	0,443998704
34	36	32,73488	33,71284	-0,977966309	32,85787	33,76045	-0,902576596
35	37	33,53566	35,62529	-2,089630127	33,74852	35,80795	-2,059429082
36	38	38,32361	36,79464	1,528968811	38,22529	36,66879	1,556501601
37	39	37,03448	34,51934	2,515136719	36,76244	34,60645	2,155993655
38	40	36,56048	36,45557	0,104911804	36,37988	36,43954	-0,059658997
39	41	33,52933	31,74191	1,787418365	33,28985	31,64882	1,641026206
39	42	31,79338	33,26936	-1,475988388	31,88988	33,2851	-1,39521058
40	43	36,17741	36,60365	-0,426242828	36,46544	36,49848	-0,033045233
41	44	34,34969	33,46598	0,883716583	34,43854	33,50355	0,934994862
42	45	38,54215	36,65913	1,883022308	38,24229	36,741	1,501295801
43	46	34,58838	35,5382	-0,949817657	34,64735	35,47934	-0,831982589
44	47	35,40121	34,88918	0,51203537	35,43752	34,48148	0,956040657
45	48	37,46372	34,98301	2,480709076	37,32797	35,0839	2,244062579
46	49	34,33083	36,19597	-1,865139008	34,52018	35,9499	-1,429726423
47	50	35,17045	36,20216	-1,031707764	33,90673	35,97561	-2,068885791
48	51	36,65913	34,78273	1,876396179	36,38625	35,2031	1,183149854
49	52	35,7061	33,89607	1,810031891	35,12471	33,90106	1,223653557
50	53	35,10176	33,68122	1,420536041	34,77903	33,72476	1,054266384
51	54	36,50495	35,31395	1,190994263	36,32765	35,30262	1,025024736
52	55	33,7571	33,26936	0,487735748	32,67785	33,41347	-0,735619142
53	56	35,97919	36,08454	-0,105342865	36,08409	35,95516	0,128929481
54	57	32,83051	36,8008	-3,970291138	34,64122	36,56898	-1,92775888
55	58	34,28051	33,61163	0,668876648	35,12789	33,8101	1,317789169
56	59	35,10176	32,40273	2,699028015	34,76634	32,39621	2,370129617
57	60	34,93923	35,76201	-0,822780609	35,14532	35,80111	-0,655796468
58	61	37,04062	36,07215	0,968471527	36,90104	35,71155	1,189484517
59	62	37,79379	33,93394	3,859844208	37,44739	34,31517	3,132220356
60	63	35,30148	36,21453	-0,913051605	35,32717	36,18506	-0,857885707
Diferença Média				0,429791405	Diferença Média		0,433401103
Desvio padrão				1,512001036	Desvio padrão		1,283178283
Diferença Absoluta				1,227210573	Diferença Absoluta		1,107582834
Desvio padrão				0,971344581	Desvio padrão		0,76822656

O Gráfico 1 a seguir mostra a variação de temperatura dos tumores entre a pele sadia; de acordo com um ponto central, e de acordo com a média da temperatura da área tumoral.

Gráfico 1: Variação de temperatura entre mastocitomas e pele sadia, de acordo com a avaliação de Ponto central (SpT x SPNT) e Área Tumoral (AT x ANT).

5.3 Análises Termográficas das Feridas Cirúrgicas

Dos 63 mastocitomas do estudo que foram avaliados termograficamente, em 48 deles foi também acompanhada por meio da termografia a evolução da ferida após excisão cirúrgica. Os demais 15 animais não foram trazidos nos dias corretos para avaliação da ferida e mensuração termográfica em mais de 2 eventos e por isso foram excluídos dessa avaliação. Assim, por meio da análise das imagens de cada um dos 48 animais ao longo do tempo, após a cirurgia de excisão do mastocitoma, foram obtidos os valores máximos, mínimos e médios de temperatura em cada área de interesse (retalho, linha de sutura – bordos da ferida - e área de deiscência, quando presente). As **tabelas 3 a 5** descrevem os valores médios de temperatura para cada ferida cirúrgica.

Dos 48 animais cuja evolução cirúrgica foi estudada por meio de termografia, 21(43%) deles apresentou alguma área de deiscência durante o tempo de estudo. A maior parte (57%) das deiscências das feridas cirúrgicas ocorreram a partir do T3 do estudo (entre 15 a 19 dias de pós operatório). Cerca de 33% ocorreu no Tempo T2 (5 a 9 dias) e apenas 9% no T1 (2 a 3 dias). Grande parte das deiscências iniciais acredita-se que ocorreram por conta de falhas na aderência do retalho, deiscência de

pontos por tensão ou por falha na revascularização. As deiscências mais tardias (T3) em sua maioria aconteceram por falhas no manejo do animal ou da ferida cirúrgica. Dentre essas falhas podemos citar: lambedura da ferida por conta de mau uso do colar protetor e consequente infecção secundária; falha nas trocas de curativo nos dias indicados – como não comparecimento do proprietário quando solicitado; contaminação da ferida cirúrgica por terra, urina e/ou fezes.

Tabela 3: Temperaturas médias em °C das áreas de retalho para cada tumor excisado nos tempos do estudo.

VARIAÇÃO DE TEMPERATURA MÉDIA DAS ÁREAS DOS RETALHOS					
TUMOR	T0	T1	T2	T3	Tardio
1	34,07068	36,17134	37,66692	37,42863	-
3	29,46232	36,90294	36,83561	39,08779	39,58167
4	33,79518	33,79518	34,01671	36,49736	-
5	31,63141	35,51571	37,16615	35,40271	37,07398
6	34,67678	33,97436	31,9212	31,9211	36,16042
7	30,68516	18,84258	34,08323	35,00112	35,58043
8	30,65488	34,14501	34,49892	36,16993	36,97688
9	30,06765	35,14848	33,61044	36,83301	36,37721
10	34,61662	35,71452	33,73193	33,7653	35,33626
11	32,43936	36,21646	35,66094	36,39306	37,14393
12	29,42847	33,52247	35,37542	35,58499	37,62366
13	31,70006	38,22413	37,13078	39,08953	37,99143
14	30,87508	32,74458	34,04136	35,21083	34,24387
15	31,70769	33,75661	33,54066	36,28805	35,92404
16	29,20602	33,95597	30,16841	34,77066	-
19	28,58713	35,03018	-	34,33306	35,13044
21	33,1381	36,48554	38,72359	36,7991	30,70109
23	37,14988	35,72881	37,1701	37,2021	36,90426
24	31,59649	35,66655	36,49902	37,25149	-
25	33,08541	35,29864	35,93365	37,48049	36,89999
26	31,68741	34,98785	37,05845	36,5239	35,58836
27	30,99193	36,39372	36,81268	36,50465	34,04627
29	31,17106	35,96568	33,21157	37,49028	35,18133
30	31,84047	35,73574	35,38971	33,18021	-
32	32,23946	37,37806	38,92074	36,69554	-
34	31,79414	34,31153	34,86964	33,52893	33,32151
35	30,94074	34,62992	34,67052	36,14344	34,61284
37	31,23617	34,24561	35,03953	35,09366	32,01959
39	31,76538	36,5627	36,82599	36,86419	37,94269
40	32,51702	34,83487	36,22684	36,62706	29,84005
41	31,67549	35,14261	33,46526	33,74396	34,77296
42	30,32238	34,86931	35,39505	34,18353	36,01015
44	37,44219	37,21265	36,9957	36,77607	36,02269
45	33,18985	36,87975	37,22431	38,11786	33,11711
46	30,11183	36,10841	36,55538	37,19527	-
47	28,9633	29,66534	37,45101	37,76626	33,50028
48	32,96513	35,04444	33,01899	33,73666	-
49	32,51081	35,71279	35,09743	35,99163	31,48511
50	28,22884	34,33709	34,85357	38,58746	35,924
51	33,26015	34,14373	37,1898	36,4337	-
52	31,77247	34,76533	35,85067	35,14862	-
53	33,16654	36,49033	37,67094	38,24108	37,30269
56	32,57878	36,06566	37,3597	36,83774	36,41331
58	33,3106	36,15312	34,90813	-	37,62696
59	30,75324	33,31226	35,77205	34,08938	35,29573
60	33,10548	35,66339	35,55195	35,57585	37,26853
61	32,29393	34,02226	34,0916	36,31966	38,13509
63	29,65075	37,17073	36,33166	36,50748	35,38865
MÉDIA	31,87624813	34,88843625	35,56561511	36,09392298	35,53856474

Números em vermelho indicam feridas cirúrgicas onde houve deiscência. Dados faltantes apresentados como (-) em razão do não comparecimento do proprietário com o animal na data necessária.

Tabela 4: Temperaturas médias em °C ao longo da linha de sutura para cada tumor excisado nos tempos do estudo.

VARIAÇÃO DE TEMPERATURA MÉDIA DOS BORDOS					
TUMOR	T0	T1	T2	T3	Tardio
1	32,70786	34,81739	36,76864	36,75179	-
3	26,63819	36,25741	36,1171	38,56873	39,50385
4	30,93044	35,47863	30,84453	36,44322	-
5	32,7342	35,51571	36,83849	35,90427	36,82721
6	33,8018	33,13361	32,24507	32,51331	35,97296
7	27,55232	30,69902	33,22928	34,50697	35,68776
8	29,77877	32,7306	34,71547	34,96488	37,24022
9	27,31713	33,60201	32,17066	35,28452	35,69009
10	30,77033	33,94429	31,94441	32,76761	34,42547
11	30,85542	34,5817	34,75213	35,38388	37,20165
12	28,76365	31,7744	33,85578	34,87378	37,48285
13	28,83746	36,87131	37,17505	38,30095	37,31846
14	28,67754	31,76813	33,85069	35,28676	34,06593
15	29,7552	32,07366	33,10662	35,30433	35,51786
16	29,17199	34,09508	31,58577	33,84483	-
19	28,22726	32,11748	34,21241	33,16557	35,14633
21	29,86497	35,36024	37,69695	36,35408	32,6796
23	35,25049	34,5976	36,44038	36,7527	36,99103
24	30,08456	34,89615	35,69923	36,93027	-
25	32,45237	34,34457	35,51575	37,27087	35,99953
26	28,11078	31,29551	34,53696	35,60602	33,53741
27	27,52301	34,0365	36,13874	35,38234	34,51354
29	29,9236	34,34666	32,69467	37,57736	35,57318
30	30,29492	35,3491	35,43405	32,23232	-
32	28,10178	36,49836	38,28169	36,38339	-
34	28,93962	32,11832	34,62463	33,75208	34,6825
35	27,3998	33,69853	33,68713	34,78629	34,5625
37	28,22627	32,61739	34,16649	34,7323	32,70163
39	30,15704	33,53935	34,35387	34,40484	36,79611
40	29,68986	34,01435	33,02172	38,18542	34,24597
41	29,69715	33,9208	33,65953	33,869	34,61931
42	28,1579	33,0182	33,69585	32,2272	34,99342
44	35,66129	35,91363	36,14638	36,08244	35,57206
45	30,01741	36,55643	35,87799	35,26723	31,53333
46	27,52046	34,92108	36,6041	36,93811	-
47	27,66587	27,69288	34,89518	37,22791	35,26567
48	30,00325	35,1644	33,07616	33,4459	27,77316
49	29,46799	34,18262	33,93996	33,45592	32,4807
50	28,86103	36,39069	33,55572	36,42874	35,97097
51	30,22698	31,50587	35,1109	36,84304	-
52	29,70644	33,91474	35,53873	34,87584	-
53	30,49534	35,17283	35,97493	36,54703	37,31976
56	29,24097	33,90326	35,31323	34,70111	35,58188
58	29,88695	34,59308	32,5575	35,3175	36,86242
59	28,50478	32,17373	34,23378	32,53476	34,39133
60	29,78882	33,37839	30,97393	32,12986	35,60288
61	26,92134	33,23127	32,19785	33,75078	34,91421
63	28,92857	35,77912	35,61657	35,87327	34,98159
MÉDIA	29,65189938	33,90804333	34,47234688	35,2444025	35,18529051

Números em vermelho indicam feridas cirúrgicas onde houve deiscência. Dados faltantes apresentados como (-) em razão do não comparecimento do proprietário com o animal na data necessária.

Tabela 6: Temperaturas médias em °C das áreas de deiscência nos tempos e em que elas ocorreram.

TEMPERATURA MÉDIA DAS ÁREAS DE DEISCÊNCIA				
Tumor	T1	T2	T3	Tardio 1
7	-	-	32,47605	34,02228
8	-	34,71863	34,9633	34,22141
9	-	-	37,77464	34,21389
11	-	-	33,10957	37,33748
12	-	35,8549	36,42159	37,05905
13	-	-	38,00888	37,99143
14	31,34113	32,19535	33,24036	32,23135
15	-	-	35,6067	32,94468
19	-	-	31,78016	34,19647
23	-	35,69408	36,10819	35,94225
29	-	-	36,41373	35,77421
30	-	34,26546	30,58822	-
34	-	-	-	36,12692
39	34,21634	-	34,01652	36,02113
40	-	-	38,00964	29,84005
47	-	-	36,57476	36,46051
45		38,93154	37,26924	36,29911
49		34,26615	33,36626	32,94208
56	-	-	35,75582	36,41331
59	-	-	33,8012	35,29573
60	-	-	32,59086	33,78928
Média	32,778735	35,13230143	34,8937845	34,956131

Células marcadas com (-) indicam que não houve deiscência neste momento.

De acordo com as temperaturas médias anteriormente descritas, realizamos a confecção de gráficos que representem as curvas térmicas representativas de cada local (retalho, bordos), de acordo com os tempos do estudo (T0, T1, T2, T3 e TT). Ainda, buscamos analisar as diferenças entre o grupo de animais que evoluiu satisfatoriamente (sem deiscência) e os que evoluíram de maneira não ideal (com deiscência). Assim, serão apresentados nos gráficos a seguir as curvas térmicas geradas.

Gráfico 2: Curva térmica das temperaturas dos retalhos e dos bordos das feridas cirúrgicas, de todos os animais do estudo cuja evolução foi avaliada por meio de termografia.

Por meio do Gráfico 2 podemos identificar uma curva térmica geral, com a evolução das feridas cirúrgicas dos 48 animais. Como esperado, a temperatura média dos bordos das feridas evolui mais baixa que do centro dos retalhos, e com o passar do tempo ambas as temperaturas médias vão quase se aproximando, conforme há a cicatrização completa das feridas. Podemos observar que há um grande aumento na temperatura entre os tempos T0 e T1 (do pós operatório imediato até os dias 2-3). Em seguida as temperaturas vão subindo suavemente conforme ocorre a evolução da ferida e da cicatrização atingindo um pico térmico em T3 (15 a 19 dias). Quando realizada nova avaliação da ferida no período tardio, com a cicatrização finalizada, a temperatura dos bordos e dos retalhos se mostraram próximas e ambas caem um pouco.

Gráfico 3: Curva térmica das temperaturas dos RETALHOS, avaliadas por meio de termografia, comparando-se os que houveram deiscência com os que não houveram.

Gráfico 4: Curva térmica das temperaturas dos BORDOS, avaliadas por meio de termografia, comparando-se os que houveram deiscência com os que não houveram.

Por meio dos gráficos 3 e 4 podemos avaliar comparativamente a evolução das feridas cirúrgicas onde houve ou não, a deiscência e consequente cicatrização parcial por segunda intenção. Em ambos os casos, retalho e bordos, pode-se notar que a

curva térmica das lesões em que não houve deiscência é quase sempre mais alta; portanto com valores de temperatura maiores, do que onde houve deiscência. O ponto em que há maior distanciamento das temperaturas entre as curvas térmicas com e sem deiscência é, tanto para os retalhos quanto para os bordos, em T1. Em todas as curvas podemos identificar padrão térmico semelhante com o descrito no gráfico 1: aumento importante de temperatura entre T0 e T1, pico térmico em T3 e diminuição discreta de temperatura em TT. Na curva térmica dos bordos das feridas cirúrgicas em que houve deiscência (gráfico 3) o pico térmico se encontra em TT.

As figuras 2 a 6 a seguir ilustram as análises de 5 cães do estudo com o acompanhamento da evolução do retalho nos tempos determinados, de forma a ilustrar as diferentes situações observadas.

Figura 2 : Imagens da evolução de retalho resultante de excisão do tumor n° 27 – Mastocitoma Grau II / Baixo grau. Análises termográficas de evolução pós operatória de retalho cutâneo pediculado por avanço. Imagens termográficas à direita e imagens padrão à esquerda. Tempos T0, T1, T2, T3 e TT. Escala de temperatura à direita de imagens termográficas, expressas em °Celsius.

Figura 3: Imagens da evolução do retalho com deiscência a partir de T3 - resultante de excisão do tumor nº 09 – Mastocitoma Subcutâneo combinado. Análises termográficas de evolução pós operatória de retalho cutâneo pediculado por avanço. Imagens termográficas à direita e imagens padrão à esquerda. Tempos T0, T1, T2, T3 e TT. Escala de temperatura à direita de imagens termográficas, expressas em °Celsius.

Figura 4: Imagens de evolução de retalho resultante de excisão do tumor nº 42 – Mastocitoma Grau II / Baixo grau. Análises termográficas de evolução pós operatória de retalhos cutâneos pediculados por avanço. Imagens termográficas à direita e imagens padrão à esquerda. Tempos T0, T1, T2, T3 e TT. Escala de temperatura à direita de imagens termográficas, expressas em °Celsius.

Figura 5: Imagens de evolução de retalho, com área de deiscência partir de T3 - resultante de excisão do tumor nº 15 – Mastocitoma Subcutâneo infiltrativo. Análises termográficas de evolução pós operatória de retalhos cutâneos pediculados por avanço. Imagens termográficas à direita e imagens padrão à esquerda. Tempos T0, T1, T2, T3 e TT. Escala de temperatura à direita de imagens termográficas, expressas em °Celsius.

Figura 6: Imagens de evolução de retalho, resultante de excisão do tumor nº 52 – Mastocitoma subcutâneo combinado - Análises termográficas de evolução pós operatória de retalho cutâneo pediculado por avanço. Imagens termográficas à direita e imagens padrão à esquerda. Tempos T0, T1, T2, T3 e TT. Escala de temperatura à direita de imagens termográficas, expressas em °Celsius.

5.4 Análises Imunohistoquímicas

Dos 63 animais do estudo a imuno-histoquímica foi realizada em: 33 para c-Kit, 29 para Ki67 e 19 para VEGF. A tabela 7 a seguir ilustra as referidas marcações.

Tabela 7: Marcações imuno-histoquímicas realizadas nos respectivos tumores do estudo.

Tumor	VEGF	Ki67	C KIT
3	(++)	>23	II
4	-	-	III
7	(++)	> 23	II
8	(+)	< 23	II
11		< 23	II
13	(++)	-	-
15	-	> 23	I
16	(+)	-	III
17	(++)	< 23	I
18	-	< 23	-
20	-	< 23	III
21	-	>23	II
24	(++)	>23	III
25	-	>23	III
26	-	-	II
27	-	>23	I
28	(+)	<23	-
29	-	-	II
30	-	<23	II
32	(++)	-	-
33	-	>23	-
34	-	-	III
38	-	-	II
40	-	<23	II
42	-	-	II
43	-	>23	II
44	-	-	II
45	(+++)	<23	II
46	(+)	>23	II
47	-	>23	II
48	(+)	<23	III
49	(++)	>23	II
50	(++)	>23	III
51	-	<23	II
52	(+)	<23	II
54	-	>23	II
55	(+++)	-	-
57	-	>23	I
58	(++)	>23	II
60	(++)	-	-
62	(+)	-	-
63	-	<23	-

VEGF marcação Fraca (+), Intermediária (++) , forte (+++) e ausente (-); Ki67: número de núcleos marcados em 10 campos >27, <27 e (-) não houve marcação; c-KIT: padrão I – marcação membranosa, padrão II – citoplasmático focal, padrão III – citoplasmático difuso.

Dos animais cuja marcação de VEGF foi estabelecida, 53% obteve marcação intermediária, 10% marcação fraca e 37% mostrou marcação forte (gráfico 5). Dos animais cuja marcação com Ki67 foi observada, 55% teve >23 núcleos marcados em 10 campos, e 45% < 23 (gráfico 6). Quanto a marcação para o padrão KIT, 64% teve marcação padrão II, 12% padrão I e 24% exibiu marcação III (gráfico 7).

Gráfico 5: Marcação para VEGF (+) fraca, (++) intermediária, (+++) forte.

Gráfico 6: Marcação para ki67 > que 23 núcleos marcados em 10 campos e < 23 núcleos marcados em 10 campos.

Figura 7: Marcações imuno-histoquímicas para c-KIT, em aumento de 40x, barra de 50µm. (A) KIT I - Cão N°16, mastocitoma grau II, baixo grau; (B) KIT II - Cão N°42, mastocitoma subcutâneo infiltrativo; (C) KIT III - Cão N°23, mastocitoma grau II/baixo grau.

Gráfico 7: Marcação para padrão c-KIT, de I a III, nos animais do estudo.

Figura 8: Marcações imuno-histoquímicas para ki67, em aumento de 40x, barra de 50 µm. (A) Marcação < 23: Cão N°51, mastocitoma grau II/baixo grau; (B) marcação > 23: Cão N°48, mastocitoma grau II/baixo grau.

Figura 9: Marcações imuno-histoquímicas para VEGF-A, em aumento de 40x, barra de 50µm. (A) VEGF +: Cão N°7, mastocitoma grau II/baixo grau; (B) VEGF ++: Cão N°23, mastocitoma grau II/baixo grau; (C) VEGF +++: Cão N°52, mastocitoma grau II/baixo grau.

5.2 Análise Estatística

Para realização deste estudo foram observados 60 cães com mastocitoma graus I, II ou III, sendo estudados 63 tumores e avaliados os fatores prognósticos, estadiamento, marcadores e termografia da área do tumor e fora do tumor, tanto no ponto central como com relação à área tumoral. Os animais foram acompanhados desde a primeira consulta até o óbito, ou por um período mínimo de 12 meses.

Na tabela 8 abaixo é possível identificar as variáveis de temperatura em relação aos locais mensurados nos mastocitomas (ponto, área) e nas áreas sadias (ponto, área).

Tabela 8: Medianas e intervalos de confiança de 95% encontrados para as variáveis do estudo.

	IC (95%)		
	Mediana	Limite inferior	Limite superior
SpT	35,7061	34,86238	35,88062
SpNT	35,43236	34,3248	35,43905
AT	35,76795	34,84993	35,87496
ANT	35,38665	34,32659	35,42916

SpT (centro da formação), SpNT (ponto em pele sadia). AT(área da formação), ANT (área de pele saída).

Por meio do teste de Wilcoxon feito com as variáveis acima (tabela 8), é possível afirmar que as regiões tumoral e não tumoral são significativamente diferentes, tanto na avaliação de ponto central (SpT e SPNT) como na avaliação da área (AT e ANT) do tumor e pele circundante sadia ($p < 0,001$). Isso confirma que a termografia na região tumoral apresenta temperatura diferente da região não tumoral. Ainda, as análises indentificam que a região tumoral mensurada por ponto (SpT) é estatisticamente igual a região mensurada por área (AT); assim como a região não tumoral mensurada por ponto (SpNT) é estatisticamente igual a mesma região mensurada por área (ANT).

As análises termográficas dos mastocitomas do estudo foram também correlacionadas com sobrevida, assim como outras variáveis do estudo, como pode ser observado na tabela 9.

Tabela 9: Estimativa dos tempos médios de sobrevida dos animais segundo características tumorais e resultados dos testes comparativos de sobrevida.

Variável	Tempo médio estimado	Erro padrão	IC (95%)		HR	IC (95%)		Óbitos pelo tumor	Total N	%	p
			Inferior	Superior		Inferior	Superior				
Estadiamento											0,689
I e II	1040,23	69,06	904,88	1175,58	1,00			10	45	22,2	
III e IV	910,28	83,68	746,26	1074,30	0,77	0,21	2,80	3	18	16,7	
Fatores Prognósticos											<0,001
≤ 2	1254,42	33,06	1189,62	1319,23	1,00			1	33	3,0	
> 2	735,64	86,18	566,73	904,56	16,86	2,19	129,98	12	30	40,0	
Patnaik/Kiupell											<0,001
II-baixo	980,50	50,91	880,71	1080,29	1,00			6	42	14,3	
III-alto	270,75	80,77	112,45	429,05	10,36	2,89	37,19	4	4	100,0	
Subcutâneo infiltrativo/ combinado	1040,86	126,65	792,62	1289,10	1,68	0,42	6,73	3	14	21,4	
Subcutâneo circunscrito	1122,00	0,00	1122,00	1122,00	&				3	0,0	
Margens											0,223
Livres	1048,27	70,94	909,24	1187,30	1,00			9	43	20,9	
Comprometidas	969,67	62,55	847,07	1092,27	0,35	0,04	2,76	1	12	8,3	
Focos de infiltrado independentes	718,50	160,17	404,57	1032,43	2,10	0,57	7,77	3	8	37,5	
Sutura											0,695
Sutura	862,10	74,33	716,42	1007,79	1,00			6	26	23,1	
Retalho	1075,99	72,22	934,45	1217,54	0,80	0,27	2,40	7	37	18,9	
Quimioterapia											<0,001
Nenhuma	1122,00	0,00	1122,00	1122,00	&				14	0,0	
Neoadjuvante	1187,27	96,04	999,04	1375,51	1,00			1	11	9,1	
Adjuvante	860,49	58,34	746,15	974,84	1,67	0,17	16,07	3	21	14,3	
Neoadjuvante e adjuvante	614,46	115,00	389,05	839,86	8,15	1,03	64,56	9	17	52,9	
Metástase											<0,001
Não	1223,34	36,25	1152,29	1294,40	1,00			3	52	5,8	
Sim	210,27	35,73	140,25	280,29	31,20	8,33	116,89	10	11	90,9	
Recidiva											<0,001
Não	1181,89	45,23	1093,24	1270,54	1,00			5	54	9,3	
Sim	247,56	44,22	160,88	334,23	16,04	5,06	50,87	8	9	88,9	
Ponto											0,418
Tumor + quente	1091,78	67,45	959,58	1223,97	1,00			7	40	17,5	
Tumor + frio	866,33	87,04	695,73	1036,93	1,56	0,53	4,65	6	23	26,1	
Área											0,114
Tumor + quente	1121,85	62,72	998,93	1244,78	1,00			6	41	14,6	
Tumor + frio	812,84	93,94	628,72	996,97	2,35	0,79	6,99	7	22	31,8	
Deiscência											0,444
Não	1025,10	72,60	882,81	1167,39	1,00			10	42	23,8	
Sim	980,14	75,97	831,24	1129,05	0,61	0,17	2,21	3	21	14,3	
VEGF											0,039
(+)	556,00	103,46	353,21	758,79	1,00			2	7	28,6	
(++)	421,53	47,12	329,17	513,88	1,30	0,24	7,14	4	10	40,0	
(+++)	170,50	80,50	12,72	328,28	7,99	1,03	62,31	2	2	100,0	
Ki67											0,231
< 23	820,00	86,51	650,44	989,56	1,00			2	13	15,4	
> 23	770,14	113,16	548,34	991,94	2,58	0,52	12,83	6	16	37,5	
Ki67											0,635
< 6%	756,24	86,12	587,44	925,04	1,00			4	17	23,5	
> 6%	809,75	125,63	563,52	1055,98	1,40	0,35	5,61	4	12	33,3	
C KIT											0,995
I	680,75	146,58	393,46	968,04	1,00			1	4	25,0	
II	885,34	92,46	704,13	1066,56	1,09	0,13	9,29	5	21	23,8	
III	862,71	126,17	615,42	1110,00	1,02	0,09	11,22	2	8	25,0	
Total	1056,49	57,24	944,30	1168,69				13	63	20,6	

Função Kaplan-Meier e teste log-rank; IC (95%) por regressão de Cox bivariada; & Não é possível estimar

Como pode ser visto acima, as variáveis que apresentaram correlação estatística com sobrevida foram: **Fatores prognósticos** ($p<0,001$), **Classificação histológica** ($p<0,001$), **Uso de quimioterapia** ($p<0,001$), **presença de metástase** ($p<0,001$), **presença de recidiva** ($p<0,001$). Com relação aos marcadores imunohistoquímicos, o único que apresentou correlação estatística foi o **VEGF** ($p=0,039$), com intervalo de confiança de 95%. Assim, essas variáveis apresentaram

influência na sobrevida dos animais quando avaliados isoladamente ($p < 0,05$). Não foi encontrada correlação estatística entre a temperatura tumoral e a sobrevida.

Por meio da regressão múltipla de Cox foram avaliadas individualmente as variáveis de margens livres; comprometidas; com focos de infiltrado independentes; presença de metástase e recidiva, e esta análise está sendo apresentada na tabela 10. A tabela mostra que animais com a presença de focos de infiltrado independentes de mastócitos apresentaram risco de mortalidade 8,57 vezes o risco de animais com tumores com margens livres, a presença de metástase ou de recidivas tumorais. A presença desses focos de infiltrado também aumenta o risco de mortalidade dos animais independente das demais características avaliadas ($HR = 22,07$ e $HR = 5,13$ respectivamente).

Tabela 10: Regressão de Cox múltipla para margens, metástase e recidiva.

Variável	HR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Margens				
Livres	1,00			
Comprometidas	0,37	0,05	3,02	0,355
Focos de infiltrado independentes	8,57	1,61	45,68	0,012
Metástase	22,07	4,61	105,59	<0,001
Recidiva	5,13	1,29	20,43	0,020

A seguir apresentamos as curvas de Kaplan-Meier com estimativas da sobrevida dos animais de acordo com os fatores que mais influenciaram na sobrevida de acordo com o estudo; Margens, presença de metástase e de recidiva.

Gráfico 8. Estimativa da função de sobrevida dos animais segundo margens tumorais.

Gráfico 9. Estimativa da função de sobrevida dos animais segundo metástase.

Gráfico 10. Estimativa da função de sobrevivência dos animais segundo recidiva.

Os Gráficos de 8 a 10 ilustram os resultados obtidos pelo modelo final de regressão de Cox múltipla, evidenciando o maior risco de mortalidade nos cães com tumores com focos de infiltrado independentes, presença de metástase ou de recidivas.

Com relação ao estudo termográfico das feridas cirúrgicas, avaliamos a correlação entre os animais que apresentaram deiscência e as variáveis expressas na tabela 11.

Tabela 11: Descrição das características tumorais segundo deiscência do tumor e resultado dos testes de associação.

Variável	Deiscência		OR	IC (95%)		p
	Não (N = 42)	Sim (N = 21)		Inferior	Superior	
Estadiamento, n (%)						0,554
I e II	31 (73,8)	14 (66,7)	1,00			
III e IV	11 (26,2)	7 (33,3)	1,41	0,45	4,40	
Fatores Prognósticos, n (%)						0,285
≤ 2	24 (57,1)	9 (42,9)	1,00			
> 2	18 (42,9)	12 (57,1)	1,78	0,62	5,12	
Patnaik/Kiupell, n (%)						0,072#
II-baixo	30 (71,4)	12 (57,1)	1,00			
III-alto	4 (9,5)	0 (0)	&			
Subcutâneo infiltrativo/combinação	6 (14,3)	8 (38,1)	3,33	0,95	11,66	
Subcutâneo circunscrito	2 (4,8)	1 (4,8)	1,25	0,10	15,11	
Margens, n (%)						0,964#
Livres	29 (69)	14 (66,7)	1,00			
Comprometidas	8 (19)	4 (19)	1,04	0,27	4,03	
Focos de infiltrado independentes	5 (11,9)	3 (14,3)	1,24	0,26	5,96	
Sutura, n (%)						0,011
Sutura	22 (52,4)	4 (19)	1,00			
Retalho	20 (47,6)	17 (81)	4,68	1,35	16,26	
Quimioterapia, n (%)						0,524#
Nenhuma	9 (21,4)	5 (23,8)	1,00			
Neoadjuvante	9 (21,4)	2 (9,5)	0,40	0,06	2,63	
Adjuvante	12 (28,6)	9 (42,9)	1,35	0,34	5,44	
Neoadjuvante e adjuvante	12 (28,6)	5 (23,8)	0,75	0,17	3,40	
Metástase, n (%)						0,738*
Não	34 (81)	18 (85,7)	1,00			
Sim	8 (19)	3 (14,3)	0,71	0,17	3,00	
Recidiva, n (%)						>0,999*
Não	36 (85,7)	18 (85,7)	1,00			
Sim	6 (14,3)	3 (14,3)	1,00	0,22	4,47	

Teste qui-quadrado; * Teste exato de Fisher; # Teste da razão de verossimilhanças; & Não é possível estimar

Dessa forma, notamos que o tipo de técnica utilizada para o fechamento do defeito tem correlação estatística com a presença de deiscência ($p=0,014$), sendo que os retalhos pediculados apresentaram uma chance de deiscência 5,57 vezes maior em relação ao uso da técnica de deslizamento. Já a presença de margens comprometidas, fatores prognósticos e histológicos, realização de quimioterapia, presença de metástase ou recidiva não mostraram correlação com a presença de deiscência nos animais do estudo.

As temperaturas médias e medianas nos retalhos e nos respectivos bordos foram mensuradas ao longo do tempo, de modo a avaliar se há diferença estatística entre os tempos analisados. Pela tabela 12 abaixo tem-se que as temperaturas do

retalho e dos bordos apresentaram comportamentos médios ao longo dos tempos de avaliação estatisticamente diferentes ($p_{\text{Interação}} < 0,001$).

Tabela 12: Correlação entre as temperaturas mensuradas nos tempos do estudo e locais das feridas cirúrgicas para todos os animais avaliados neste estudo.

Variável/Local	T0	T1	T2	T3	Tardio	p Local	p Tempo	p Interação
Temperatura								
Retalho								
média ± DP	31,9 ± 1,9	34,9 ± 2,8	35,6 ± 1,8	36,1 ± 1,6	35,5 ± 2,1			
mediana (mín.; máx.)	31,7 (28,2; 37,4)	35,2 (18,8; 38,2)	35,7 (30,2; 38,9)	36,4 (31,9; 39,1)	35,9 (29,8; 39,6)			
Bordos								
média ± DP	29,7 ± 2	33,9 ± 1,8	34,5 ± 1,8	35,2 ± 1,7	35,2 ± 2			
mediana (mín.; máx.)	29,7 (26,6; 35,7)	34 (27,7; 36,9)	34,4 (30,8; 38,3)	35,3 (32,1; 38,6)	35,5 (27,8; 39,5)			
						<0,001	<0,001	<0,001

EEG com distribuição normal e função de ligação identidade

A seguir, detectamos que houve alteração média das temperaturas estatisticamente significativas ao longo dos tempos de avaliação ($p < 0,001$) em ambos os locais avaliados.

Tabela 13: Correlação estatística das análises termográficas no retalho e nos bordos, entre o grupo de animais com e sem deiscência

Variável	T0	T1	T2	T3	Tardio	p Tempo
Retalho (°C)						<0,001
Sem deiscência						
média ± DP	32,1 ± 2	35,4 ± 1,1	35,6 ± 2	36,1 ± 1,7	35,7 ± 2,1	
mediana (mín.; máx.)	31,8 (28,2; 37,4)	35,3 (33,8; 37,4)	35,9 (30,2; 38,9)	36,5 (31,9; 39,1)	36 (30,7; 39,6)	
Com deiscência						
média ± DP	31,6 ± 1,8	34,2 ± 3,9	35,5 ± 1,4	36,1 ± 1,5	35,4 ± 2,2	
mediana (mín.; máx.)	31,7 (28,6; 37,1)	35,1 (18,8; 38,2)	35,5 (33,2; 37,5)	36,3 (33,2; 39,1)	35,8 (29,8; 38)	
Bordos (°C)						<0,001
Sem deiscência						
média ± DP	29,8 ± 2,2	34,4 ± 1,4	34,7 ± 2	35,4 ± 1,6	34,9 ± 2,4	
mediana (mín.; máx.)	29,7 (26,6; 35,7)	34,6 (31,3; 36,5)	35,1 (30,8; 38,3)	35,9 (32,2; 38,6)	35 (27,8; 39,5)	
Com deiscência						
média ± DP	29,5 ± 1,6	33,2 ± 2	34,2 ± 1,4	35 ± 1,8	35,4 ± 1,6	
Mediana (mín.; máx.)	29,5 (27,3; 35,3)	33,5 (27,7; 36,9)	34,2 (31; 37,2)	35 (32,1; 38,3)	35,6 (31,5; 37,5)	

Foram comparadas as temperaturas mensuradas dos animais que tiveram evolução favorável do retalho com os que apresentaram deiscência. Embora possa ser notado sempre temperaturas mais baixas nos retalhos dos animais com deiscência (gráfico 11) por meio das análises estatísticas foi possível encontrar diferença significativa entre esses grupos nos tempos T1 ($p < 0,05$) e em T3 ($p < 0,05$) (Tabela 14 e Gráfico 11).

Gráfico 11 – Comparação da temperatura média em °C dos animais cujo retalho evoluiu com e sem deiscência, nos referidos tempos.

Tabela 14. Teste T comparativo entre os animais cuja evolução do retalho foi ocorreu com e sem deiscência.

Grupo	Tempo	N	média	DP	p
Retalho	T1	27	35,43	1,11	0,004
Deiscência		2	32,78	2,03	
Retalho	T2	27	35,61	2,04	0,585
Deiscência		7	35,13	2,06	
Retalho	T3	26	36,09	1,67	0,043
Deiscência		20	34,89	2,21	
Retalho	T4	18	35,73	2,09	0,249
Deiscência		20	34,96	1,99	

Já a tabela 15 abaixo mostra que as temperaturas, tanto do retalho como dos bordos apresentaram diferença estatística, principalmente em relação à T0 ($p < 0,001$), sendo que de T0 a T3 a temperatura no retalho foi em média maior que nos bordos ($p < 0,05$).

Tabela 15. Resultado das comparações múltiplas das temperaturas entre locais e tempos de avaliação.

Local/ Tempo	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
Retalho	T0 - T1	-3,01	0,35	1	<0,001	-4,14	-1,88
	T0 - T2	-3,67	0,39	1	<0,001	-4,94	-2,40
	T0 - T3	-4,20	0,40	1	<0,001	-5,50	-2,90
	T0 - Tardio	-3,62	0,42	1	<0,001	-4,98	-2,26
	T1 - T2	-0,66	0,35	1	>0,999	-1,80	0,48
	T1 - T3	-1,19	0,39	1	0,099	-2,46	0,08
	T1 - Tardio	-0,61	0,42	1	>0,999	-1,96	0,75
	T2 - T3	-0,53	0,35	1	>0,999	-1,67	0,61
	T2 - Tardio	0,05	0,41	1	>0,999	-1,28	1,38
	T3 - Tardio	0,58	0,37	1	>0,999	-0,62	1,79
Bordos	T0 - T1	-4,26	0,35	1	<0,001	-5,39	-3,12
	T0 - T2	-4,82	0,39	1	<0,001	-6,08	-3,56
	T0 - T3	-5,59	0,40	1	<0,001	-6,89	-4,30
	T0 - Tardio	-5,56	0,42	1	<0,001	-6,93	-4,19
	T1 - T2	-0,56	0,35	1	>0,999	-1,70	0,57
	T1 - T3	-1,34	0,39	1	0,025	-2,60	-0,07
	T1 - Tardio	-1,30	0,42	1	0,082	-2,67	0,06
	T2 - T3	-0,77	0,35	1	>0,999	-1,90	0,36
	T2 - Tardio	-0,74	0,41	1	>0,999	-2,07	0,60
	T3 - Tardio	0,03	0,37	1	>0,999	-1,18	1,24
T0	Retalho - Bordos	2,22	0,28	1	<0,001	1,30	3,15
T1	Retalho - Bordos	0,98	0,28	1	0,025	0,05	1,91
T2	Retalho - Bordos	1,08	0,29	1	0,008	0,14	2,01
T3	Retalho - Bordos	0,83	0,29	1	0,160	-0,10	1,77
Tardio	Retalho - Bordos	0,28	0,32	1	>0,999	-0,75	1,31

Comparações múltiplas de Bonferroni

Em seguida, a Tabela 16 descreve que, houve aumento estatisticamente significativo das temperaturas de T0 para os demais tempos avaliados ($p < 0,001$). Ainda, em T3 houve aumento significativo em relação a T1 ($p < 0,05$).

Tabela 16. Resultado das comparações múltiplas das temperaturas nos locais avaliados entre os e tempos de avaliação.

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
Retalho	T0 - T1	-2,97	0,36	1	<0,001	-3,97	-1,97
	T0 - T2	-3,71	0,41	1	<0,001	-4,86	-2,56
	T0 - T3	-4,26	0,42	1	<0,001	-5,44	-3,07
	T0 - Tardio	-3,68	0,45	1	<0,001	-4,94	-2,42
	T1 - T2	-0,74	0,36	1	0,395	-1,75	0,27
	T1 - T3	-1,29	0,41	1	0,016	-2,44	-0,14
	T1 - Tardio	-0,72	0,44	1	>0,999	-1,97	0,53
	T2 - T3	-0,55	0,36	1	>0,999	-1,56	0,46
	T2 - Tardio	0,02	0,43	1	>0,999	-1,19	1,24
	T3 - Tardio	0,57	0,39	1	>0,999	-0,51	1,66
Bordos	T0 - T1	-4,20	0,30	1	<0,001	-5,06	-3,35
	T0 - T2	-4,81	0,35	1	<0,001	-5,80	-3,82
	T0 - T3	-5,59	0,37	1	<0,001	-6,62	-4,56
	T0 - Tardio	-5,57	0,39	1	<0,001	-6,67	-4,48
	T1 - T2	-0,61	0,30	1	0,447	-1,47	0,24
	T1 - T3	-1,38	0,35	1	0,001	-2,37	-0,39
	T1 - Tardio	-1,37	0,39	1	0,004	-2,45	-0,29
	T2 - T3	-0,77	0,30	1	0,112	-1,63	0,08
	T2 - Tardio	-0,76	0,37	1	0,405	-1,80	0,28
	T3 - Tardio	0,01	0,33	1	>0,999	-0,90	0,93

Comparações múltiplas de Bonferroni

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Com base nos critérios descritos, foram incluídos neste estudo 67 mastocitomas provenientes de 60 cães. Nossos resultados clínicos são compatíveis com dados de literatura; não houve predileção sexual: dos mastocitomas avaliados neste estudo, 53% foram provenientes de machos e 47% de fêmeas, como indicado por muitos estudos, incluindo estudos locais (WELLE et al., 2008; LONDON; SEGUIN, 2003; COSTA-CASAGRANDE, 2008). Ainda, a maior parte das formações (28%) foi encontrada em tronco e abdômen, e a segunda maior porcentagem (22%) foi encontrada em membros pélvicos. Isso se equivale ao encontrado em estudos anteriores com amostra proveniente da mesma Instituição (COSTA-CASAGRANDE, 2010; MELO, 2013).

O sexo, a raça, a idade ou mesmo a localização do tumor não tiveram significância estatística perante sobrevida. Entretanto, cabe ressaltar que dos casos em que houve evolução clínica não favorável (metástase, recidiva e óbito), em 37% a localização da formação foi na região cervical. Ainda, dos animais que tinham essa localização do tumor 80% (4/5) vieram a óbito. Acreditamos que em virtude do pequeno número de animais com essa localização não foi possível enxergar nenhuma associação direta com prognóstico, mas clinicamente evidenciamos uma evolução desfavorável destes paciente apesar do uso de quimioterapia e mesmo com a obtenção de margens livres. Correlacionamos este fato com a rica drenagem linfática da região, bem como a presença de grandes vasos, propiciando a disseminação do tumor. Dessa forma, sugere-se a inserção dessa localização dentre os fatores prognósticos negativos, visto que ainda não foi descrita em literatura.

Quanto à classificação histopatológica dos tumores estudados a maior parte das formações apresentou uma graduação intermediária: 67% como Grau II/Baixo Grau. Isso também está compatível com o descrito em literatura, onde a maior parte dos mastocitomas estudados é caracterizado com esta graduação – Grau II segundo a classificação de Patnaik (ZEMNKE et al., 2002; STREFEZZI et al., 2003; WEBSTER et al., 2008; COSTA-CASAGRANDE, 2008; MELO, 2013). Entretanto, podemos ressaltar uma surpreendente representatividade de classificações como mastocitomas subcutâneos (27% no total), sendo estes subcutâneos infiltrativos em 15% dos casos, subcutâneos circunscritos em 6% e subcutâneos mistos em 6%.

Acreditamos que a nova classificação de mastocitomas subcutâneos descrita por Thompson e colaboradores (2011) vem sendo usada com mais frequência nesses últimos anos, e portanto a representatividade desses tumores aqui encontrada, não se assemelha à literatura.

A classificação histológica determinada neste estudo foi significativa na influência à sobrevida ($p < 0,001$). Assim, dos animais com mastocitomas subcutâneos infiltrativos e combinados, 21% vieram a óbito por conta do tumor. Essa porcentagem foi menor apenas que a dos mastocitomas grau III/alto grau, onde 100% deles vieram a óbito. Dos animais com mastocitomas subcutâneos circunscritos, nenhum veio a óbito, e dos que tiveram mastocitomas classificados como grau II, baixo grau, 14% vieram. A alta mortalidade associada a mastocitomas de grau III, alto grau, é bem conhecida e descrita pois mastocitomas de alto grau são associados a pior prognóstico (PATNAIK et al, 1984, WEBSTER et al., 2007; WEBSTER et al., 2008; Kiupel et al., 2011). Já a observação de mastocitomas subcutâneos infiltrativos e combinados com frequência de 21% de óbito vem ao contrário do que a literatura descreve (NEWMAN et al., 2007; THOMPSON et al., 2011a; THOMPSON et al., 2011b). Os mastocitomas subcutâneos circunscritos nesse estudo tem comportamento compatível com literatura, o que pode reafirmar que os mastocitomas subcutâneos, desde que circunscritos, possam ter mesmo a boa evolução clínica sugerida pelos autores (NEWMAN et al., 2007; THOMPSON et al., 2011a; THOMPSON et al., 2011b). Entretanto, os infiltrativos e circunscritos devem ser tratados com cautela e podem indicar a necessidade de quimioterapia adjuvante sempre que possível. Dessa forma, achamos importante ressaltar a necessidade de constar em laudos histopatológicos a diferenciação entre os subcutâneos infiltrativos e circunscritos; que têm uma grande diferença prognóstica como vista neste estudo, e em trabalhos anteriores (MELO, 2013; MATZ, 2015) que levantam o mesmo questionamento em relação a esta classificação. Ainda em relação a graduação histológica, o fato de que 14% dos portadores de mastocitomas grau II/baixo grau vieram a óbito, o que reforça a necessidade de mais estudos em relação à essa classificação intermediária (Patnaik, 1984) pois ela é bastante expressiva na maior parte dos estudos. Ressaltamos assim o fato de que, embora a classificação histológica seja extremamente importante e tenha correlação com sobrevida, como novamente demonstrado nesse estudo, a avaliação de fatores prognósticos (clínicos,

como aqui propostos) e imunohistoquímicos para decisão da terapia complementar a ser instituída tem grande importância, em especial nas gradações cujo comportamento é heterogêneo e ainda difícil de prever.

A pontuação prognóstica (0-13) aqui proposta, adaptada de Melo e colaboradores (2015) teve forte associação com sobrevida ($p < 0,001$). Isso traz a possibilidade de classificar o animal e trazer informações relevantes para decisões de tratamentos neoadjuvantes. Ainda, essa classificação deve ser posteriormente somada a histopatológica propondo um melhor perfil prognóstico e ajudando em escolhas de tratamentos e abordagens após o procedimento cirúrgico.

A maioria dos animais (58%) recebeu o estadiamento I-a, segundo a classificação da WHO. A segunda maior representação, 28% foi do estágio III-a. Este estadiamento já vem sendo questionado por alguns autores (MULLINS et al., 2006; MURPHY, 2006; KIUPEL et al., 2016) e também não foi significativo em relação à sobrevida neste estudo. Esse achado reforça a recomendação destes autores de que a classificação precisa ser ajustada e adaptada, visto que o acometimento de linfonodos traz prognóstico pior do que a presença de múltiplos tumores. Em nosso estudo, a presença de metástase foi observada em 17% dos casos, e de recidiva em 14%. Em ambas as ocorrências 90% dos animais acometidos vieram a óbito. Por meio de análises estatísticas comprovamos a associação entre esses dois fatores (metástase e recidiva) com o tempo de sobrevida (em ambas $p < 0,001$). Essa associação é bem conhecida e estudada em literatura, mesmo as mais recentes (PIZZONI et al, 2016; KIUPELL et al., 2016) e corrobora com a sugestão de troca entre as descrições dos estágios da WHO.

Em todos os casos deste estudo a formação foi excisada com mínimo de 3 cm de margens laterais e um plano profundo, como sugere a literatura (SZENTIMREY, 1998; WEISSE et al., 2002; SIMPSON et al., 2004; DOBSON et al., 2007). Na maior parte dos casos, 80% foram obtidas margens cirúrgicas livres, o que está de acordo com os índices encontrados por outros autores (WEISSE et. al, 2002; SIMPSON et. al, 2004, PRATSCHKE et al., 2013; MATZ, 2015). Em 20% dos casos ao menos uma das margens cirúrgicas foi considerada comprometida. Dos animais com margens livres, em 16% dos casos foi possível a observação da formação de agrupamentos independentes de mastócitos (AIM), que embora não possuam relação com o tumor

original, sua presença pode sugerir a formação de novos focos de tumor ao redor – nódulos satélites. A presença desses agrupamentos independentes de mastócitos é pouco citada em literatura. Kiupel e colaboradores (2016) descrevem o quanto a análise de comprometimento de margem pode ser difícil, em especial por conta da presença de focos de células neoplásicas estarem presentes em mastocitomas muito inflamados. Este estudo de 2016 cita a presença dos chamados “*clusters*” ou nódulos “satélites” (o que foi chamado aqui de presença de agrupamentos independentes de mastócitos - AIM), e descrevem que estes devem ser considerados focos neoplásicos, enquanto a presença de células isoladas devem ser consideradas apenas inflamatórias. Nenhum trabalho entretanto separa a presença desses focos em suas análises, e portanto a sua relevância até o momento era desconhecida. Dentro do nosso estudo foi observado que, embora a presença de margens comprometidas, livres ou com AIM não tenha sido correlacionada diretamente com sobrevida; a tabela 10 mostra que animais onde foi observada a presença desses AIM há um risco de mortalidade 8,57 vezes maior do que animais com margens livres ou mesmo comprometidas. Esse risco é inclusive maior do que o risco de óbito em animais com recidiva (HR 5,13). Acreditamos estar estabelecida portanto, a importância desses “*clusters*” ou agrupamentos de mastócitos.

A realização de quimioterapia apresentou correlação com a sobrevida ($p < 0,001$). Os fatores principais para decisão de introduzir ou não quimioterapia se basearam em duas análises principais: a pontuação de fatores prognósticos negativos atribuída ao animal no primeiro atendimento, e à classificação histológica. Assim sendo, acabamos selecionando pacientes para realização de quimioterapia que receberam maiores pontuações prognósticas negativas, e que portanto tinham mais risco, sendo que alguns acabaram vindo a óbito. Ainda, vale pontuar que nenhum dos animais em que a quimioterapia não foi instituída vieram a óbito. Acreditamos dessa forma que as escolhas foram corretas ao introduzir ou não quimioterapia, por melhor do uso da pontuação dos fatores prognósticos associada a classificação histológica, e que a associação da quimioterapia com a sobrevida tem relação com o fato de termos selecionado animais com maior risco.

Outro interesse neste estudo clínico era a avaliação imuno-histoquímica das amostras de mastocitomas. Em especial, havia interesse no VEGF-A; que embora não conste como marcação para perfil prognóstico do mastocitoma canino (Consenso

MELO S.R.

Clinico, Cirurgico e Patológico sobre Mastocitomas Canino. 2012), estudos anteriores (MELO, 2013) indicam sua significância prognóstica. Não pudemos obter a marcação imuno-histoquímica de todos os animais do estudo; mas analisamos estatisticamente todos que tiveram sua marcação obtida. Ki67 e KIT não foram considerados significativos à sobrevida, talvez pelo baixo número de animais. O que nos surpreendeu foi que de fato, o VEGF-A se mostrou de significância estatística perante sobrevida; confirmando estudo anteriores e sugerido mais uma vez a inclusão desse marcador no perfil prognóstico dos mastocitomas.

Todas as formações apresentadas neste estudo tiveram análise termográfica concluída e documentada. Nota-se que mesmo quando considerado ponto central ou quando considerada toda área tumoral, 65 e 67% respectivamente, dos mastocitomas eram mais quentes que a pele sadia circundante. A causa destas mudanças de temperatura não é totalmente compreendida, mas sugere-se que esteja associada a neoangiogênese e inflamação local (XIE et al., 2004). De qualquer maneira, uma porcentagem de 35% dos tumores deste estudo são mais frios que a pele ao redor, contraditoriamente ao fato de que, na literatura médica existente, a utilização da termografia no campo da oncologia resida na busca pelos chamados “*hot spots*” (ARORA et al., 2008). Isso porque se descreve que os tumores – em geral carcinomas mamários - têm um aumento 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 (LAWSON, 1956; GAUTHERIE et al., 1980; XIE et al., 2004; SONG et al., 2007; POLJAK-BLAZI et al., 2009). Estudos anteriores com termografia de mastocitomas com uma amostra menor (MELO et al, 2015) sugerem uma porcentagem de 53% de tumores mais quentes e 47% de tumores mais frios.

Embora 70% das formações identificadas como mais frias foram classificadas como Grau II/baixo grau; a existência de formações invasivas, como de Grau III e subcutâneo infiltrativo, mesmo nessa porção mais fria destes tumores não foi possível encontrar associação da variação térmica com a graduação histológica. Dessa forma, após as análises estatísticas, não foram possíveis comparações significativas entre a temperatura do tumor e outras características do estudo. Ainda dentro de nossas expectativas também não foi possível estabelecer causas ou correlações para as chamadas “*tumor tails*”, e sugere-se futuros estudos para elucidar esses aspectos da termografia no mastocitoma.

Por meio das análises estatísticas é possível afirmar que as regiões tumoral e não tumoral são significativamente diferentes, tanto na avaliação de ponto central (SpT e SPNT) como na avaliação da área (AT e ANT) do tumor e pele circundante sadia ($p < 0,001$). Isso confirma que a termografia da região tumoral apresenta temperatura diferente da região não tumoral, e pode ser um método de diagnóstico considerado de alta sensibilidade, conforme descrito em outros estudos na área de termografia oncológica veterinária. Redaelli e colaboradores (2014), por exemplo ressaltam alta sensibilidade (100%) da termografia para monitorar processos patológicos em pequenos animais, a facilidade e baixa invasividade do exame. Assim sendo, independente da variação de temperatura ser positiva ou negativa a termografia na região tumoral apresenta temperaturas diferentes da região não tumoral, conforme descrito em estudo anterior (MELO et al, 2015). Ainda, as análises confirmam que a região tumoral mensurada por ponto (SpT) é significativamente igual a região mensurada por área (AT); assim como a região não tumoral mensurada por ponto (SpNT) é estatisticamente igual a mesma região mensurada por área (ANT). Dessa forma, futuras análises poderão ser feitas com uma ou outra mensuração, já que não há diferença significativa entre elas. Sugerimos, no entanto, que estudos futuros mensurem apenas a área tumoral, e não o ponto central; que embora sejam regiões similares, a mensuração de área abrange maior variabilidade de temperatura.

Com relação a evolução das feridas cirúrgicas, para avaliar se de fato faz-se necessária a mensuração de duas regiões nos estudos futuros, foram comparadas estatisticamente as variações de temperatura do retalho e da linha de sutura de cada animal num mesmo período de tempo. As análises das imagens termográficas dos retalhos e bordos cirúrgicos indicam que essas regiões têm comportamentos térmicos ao longo dos tempos de avaliação estatisticamente diferentes ($p_{\text{Interação}} < 0,001$). De fato, ao longo do estudo verificamos que a região dos bordos da ferida, os locais onde são colocadas as suturas de ponto simples separado, se mantém visivelmente diferentes nas imagens termográficas e sempre mais frias que as demais porções da ferida, mesmo do retalho quando este evolui de forma satisfatória. Isto porque realmente os pontos de colocação de sutura ficam com sua vascularização comprometida por mais tempo, em razão da isquemia inevitavelmente causada. E esse achado condiz com a literatura cirúrgica atual, que sempre coloca a área de sutura como uma região de isquemia, ainda que temporária. Dessa forma, estudos

futuros que tenham interesse em acompanhamento de evolução de feridas cirúrgicas, devem mensurar a região de retalho e de linha de sutura; que embora sejam diferentes entre si devem apresentar linha de evolução térmica semelhantes (gráfico 2).

Por se tratar do primeiro estudo a respeito de termografia de retalhos cutâneos em cães, não há padrão quanto ao método de análise das imagens. Dessa forma, buscamos extrair a maior quantidade de dados das imagens obtidas, e de maneiras diferentes, para que pudéssemos reconhecer algum padrão. Assim, a confirmação gráfica de que a mensuração da temperatura da área do retalho se assemelha ao padrão térmico da mensuração da linha de sutura, bem como as análises acima descritas nos mostra que **estamos obtendo dados de regiões significativas e representativas da imagem**. A análise gráfica e numérica das temperaturas médias do retalho e da linha de sutura indicam um interessante padrão na evolução da temperatura, e correspondente a perfusão cutânea, das feridas cirúrgicas. Saindo de temperaturas médias gerais baixas no tempo 0 (logo após a finalização do tempo cirúrgico), as temperaturas atingem rapidamente um pico no tempo 1 (entre 2 e 3 dias). Passados 15 a 19 dias, observamos nova crescente de temperatura e finalmente, no que chamamos aqui de tempo tardio (30-60 dias de pós-operatório) nota-se que a temperatura média das áreas de retalho e sutura praticamente se iguala e se estabiliza, conforme a ferida cirúrgica atinge sua completa cicatrização. O pico de hiperemia observado no tempo 1 foi descrito por outros autores (SALMI et al., 1995; EICHHORN et al., 2009), e que pode ser associado a rápida reperusão tecidual e neovascularização, e alta concentração de componentes inflamatórios.

Resultados de estudo recente (WEERD et al., 2011) mostram que a perfusão de um retalho cutâneo é um processo dinâmico, com uma progressão gradual principalmente durante a primeira semana de pós operatório, em que os autores relatam o aumento progressivo das áreas chamadas de *“hot spots”*. A observação das imagens obtidas por meio deste estudo, aqui exemplificadas nas Figuras, é clara quanto a esse aumento progressivo das “áreas mais quentes” na primeira semana, até o tempo 2. Pode-se então observar com o passar das semanas um padrão térmico mais homogêneo nas imagens, até que a determinação da área do retalho torne-se mais custosa por conta da similaridade térmica com a pele ao redor.

Com relação a cicatrização cirúrgica específica após a excisão de mastocitomas; muitos autores sugerem que após a excisão devemos esperar uma cicatrização mais lenta (de 14 até 21 dias) e maiores índices de deiscência de feridas por conta dos mediadores das células mastocitárias, em especial histamina e heparina. Estes sugerem que a histamina inibe o crescimento de queratinócitos e a heparina tem efeito inibidor no crescimento destes em baixas concentrações. (DOBSON & SCASE, 2007; THAMM & VAIL, 2007; WELLE et al., 2008). Acreditava-se portanto que mastocitomas cuja margem seja comprometida pode trazer mais complicações no pós-operatório em razão dessas substâncias. Killick e colaboradores (2011) publicaram a respeito da cicatrização de feridas em mastocitomas incompletamente excisados e compararam-na com a cicatrização de feridas após a excisão de histiocitomas. As complicações de cicatrização de ferida cirúrgica se mostraram presentes em 20% dos mastocitomas e em 21% dos histiocitomas, declarando inclusive que tumores maiores apresentaram maiores complicações após sua excisão. Os autores no entanto não declaram qual foi o período em que as deiscências ocorreram ou mesmo qual foi o tipo de técnica cirúrgica utilizada. Nosso estudo concluiu que, da mesma forma como citado por Killick e colaboradores (2011), não houveram complicações adicionais nas cicatrizações de feridas após excisão de mastocitomas com margem comprometida.

Em nossa revisão de literatura, não foi encontrado nenhum trabalho que indique tempo de deiscência em retalhos cutâneo pediculados em cães após excisão de outros tipos de tumores. O estudo que mais se assemelha a este (SAKUMA et al., 2003) indica apenas uma porcentagem de 40% de deiscência, sem indicar em que tempos ou em que tumores ela aconteceu. Ainda, embora seja bastante citada a dificuldade de cicatrização dos mastocitomas (DOBSON & SCASE, 2007; THAMM & VAIL, 2007; WELLE et al., 2008) por conta dos mediadores inflamatórios secretados pelas células mastocitárias; não encontramos nenhum estudo que avalie a porcentagem e tempo das possíveis complicações pós operatórias em retalhos cutâneos em cães. Killick e colaboradores (2011) descrevem que as complicações de cicatrização de ferida cirúrgica se mostraram presentes em 20% dos mastocitomas que tiveram margens cirúrgicas consideradas comprometidas. Este estudo porém não descreve qual foi o período em que as deiscências ocorreram ou mesmo qual foi a técnica cirúrgica utilizada.

Dessa forma, embora tenha ocorrido em apenas uma porcentagem dos animais (21/63; 33%); a ocorrência da deiscência foi cuidadosamente avaliada. A maior parte, 57% das deiscências das feridas cirúrgicas ocorreram a partir do T3 do estudo (entre 15 a 19 dias de pós operatório). Cerca de 33% ocorreu a partir do Tempo T2 (5 a 9 dias) e apenas 9% do T1 (2 a 3 dias). Um parte das deiscências acreditamos que ocorreram devido a falhas de manejo do animal ou da ferida cirúrgica em ambientes externos ao hospitalar, em diferentes períodos de tempo. Dentre essas falhas podemos citar: lambedura da ferida por conta de mau uso do colar protetor e consequente infecção secundária; falha nas trocas de curativo nos dias indicados – não comparecimento do proprietário quando solicitado; contaminação da ferida cirúrgica por terra, urina e/ou fezes. Sabemos que estas complicações fazem parte das limitações do estudo clínico; onde não podemos manter os animais sob as mesmas condições ambientais como se faria em estudos experimentais. Ainda assim, buscamos estabelecer correlação entre a ocorrência das deiscências e outras variáveis do estudo. Encontramos que a realização de técnicas de anaplastia por meio de deslizamento e uso de *walking sutures*, teve correlação estatística negativa com a presença de deiscência ($p < 0,05$). Assim, pudemos estabelecer que retalhos cutâneos pediculados apresentaram chance de deiscência 5,57 vezes maior do que o uso de outras técnicas de anaplastia e aproximação de tecidos. Concordando com a literatura, foi estabelecido nesta pesquisa que a presença de margens comprometidas, fatores prognósticos e histológicos, realização de quimioterapia, presença de metástase ou recidiva não apresentaram correlação com a presença de deiscência.

Ainda em relação a evolução das feridas, foram comparadas as temperaturas mensuradas dos animais que tiveram evolução favorável do retalho e daqueles que apresentaram deiscência. Embora durante o estudo tenhamos notado termograficamente temperaturas sempre mais baixas nos retalhos dos animais com deiscência (gráfico 11); por meio das análises estatísticas foi possível encontrar diferença significativa entre esses grupos nos tempos T1 (2-3 dias de pós operatório) ($p < 0,05$) e em T3 (15-19 dias de pós operatório) ($p < 0,05$). Acreditamos que a diferença significativa no tempo T1 se deva a falha na vascularização do retalho, visto que apenas 9% dos animais tiveram deiscência nesse período, e clinicamente não pudemos atribuir falhas de manejo a nenhum desses animais. A segunda diferença

significativa entre as termografias de feridas com boa evolução e daquelas com deiscência se dá em T3; tempo em que de fato tivemos a maior parte das deiscências do estudo. Essas deiscências nesse período podemos atribuir a falhas no manejo clínico e também a dificuldade de cicatrização de feridas após excisão de mastocitomas proposta por vários autores; que sugerem inclusive períodos de cicatrização mais longos, entre 14 e 21 dias (DOBSON & SCASE, 2007; THAMM & VAIL, 2007; WELLE et al., 2008).

Assim, sugerimos que feridas cirúrgicas resultantes da excisão de mastocitomas em que sejam necessárias o uso de técnicas de retalho cutâneo pediculado; elas devam ser especialmente avaliadas por termografia nos dias 2 - 3 do pós operatório; e com 15-19 dias, de modo a poder nesses períodos evidenciar possíveis mudanças de temperatura e consequentemente prever dificuldades na evolução da ferida. Dessa forma, podemos mediante avaliação termográfica buscar intervir no manejo, como trocas mais constantes de curativo, medicações orais ou nova intervenção cirúrgica. Acreditamos, por meio deste estudo, que a análise termográfica da evolução de retalhos cutâneos pode ser usada como correspondente a perfusão tecidual, conforme indicado em literatura (AWWAD et al., 1983; FRANCIS et al, 1979) e ser usada como ferramenta de reconhecimento precoce de deiscência da ferida cirúrgica, conforme proposto por diversos autores (SALMI et al., 1995; EICHHORN et al., 2009; WEERD et al., 2009; WEERD et al., 2011).

As análises mostram que as temperaturas, tanto do retalho como dos bordos aumentaram em média estatisticamente, nos tempos avaliados, principalmente em relação à T0 ($p < 0,001$). Isso porque T0 é o momento de pós operatório imediato, e a pele acabou de ser movida e suturada; ou seja em T0 é compatível que tenhamos a temperatura mais baixa do estudo, para retalho e para os bordos. As temperaturas devem então ir subindo gradualmente, como vimos no estudo.

Ainda, analisando as temperaturas em cada local (bordos e retalho) separadamente, da mesma forma, houve aumento médio estatisticamente significativo das temperaturas do T0 para os demais tempos avaliados ($p < 0,001$); tanto no retalho como nos bordos em T3 houve aumento significativo em relação ao T1 ($p < 0,05$) e apenas nos bordos a temperatura no Tempo Tardio foi em média estatisticamente maior que em T1 ($p = 0,004$). Dessa forma, podemos concluir que

T0, T1, T3 e TT neste estudo tiveram importância significativa para avaliação das feridas cirúrgicas ao longo do tempo. T2 no entanto não teve variação significativa e futuros estudos podem avaliar o interesse em manter essa mensuração.

Por fim, conseguimos estabelecer uma curva térmica de evolução das feridas da nossa população do estudo, bem como diferenciar o comportamento térmico quando há ou não deiscência. Isso pode ser útil a estudos futuros ou mesmo à prática clínico-cirúrgica, de modo a comparar a evolução de pacientes com as curvas previamente aqui estabelecidas, sendo factível assim prever a cicatrização da ferida.

Conclusões

Ao finalizar esta pesquisa, chegamos as seguintes conclusões:

- A classificação histológica, os fatores prognósticos negativos, a presença de metástase, e de recidiva e a marcação para VEGF foram determinantes na expectativa de vida dos animais deste estudo.
- A marcação para VEGF-A deve ser considerada fator de prognóstico para o mastocitoma canino.
- A termografia permite a diferenciação entre a área tumoral e sadia para os mastocitomas.
- A análise termográfica auxilia na avaliação da perfusão tecidual de retalhos cutâneos e da sua evolução cicatricial.

Referências

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.
- 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.
- AWWAD A.M., White R.J., Webster M.H., et al. The effect of temperature on blood flow in island and free skin flaps: an experimental study. **Brazilian Journal of Plastic Surgery**, 36:373–82, 1983.
- 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.
- 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.
- BRODEY, R. S. Canine and feline neoplasia. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 14, p. 309–354, 1970.
- BULSTRODE, N. W.; WILSON, G.R.; INGLIS, M.S. No touch free-flap temperature monitoring. **British Journal of Plastic Surgery**, v.55, n.2, p.174, 2002.
- CAPP C, ZENNIG N, WAJNER S, MAIA AL. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireoide. **HCPA**. 2009; 29(1).
- 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**, 52(4):1227-1232, 2011.
- MELO S.R.

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.

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

DE WEERD, L.; MERCER, J. B.; SETSÅ, L. B. Intraoperative Dynamic Infrared Thermography and Free-Flap Surgery. **Annals of Plastic Surgery**, v. 57, n. 3, p. 279-284, 2006

DE WEERD L.; MILAND, A.; MERCER, J.B. Perfusion dynamics of free DIEP and SIEA flaps during the first postoperative week monitored with dynamic infrared thermography (DIRT). **Annals of Plastic Surgery**, v.62, p.40–47, 2009.

DE WEERD, L.; MERCER, J.B.; WEUM, S. Dynamic Infrared Thermography, in: M.Y. Nahabedian (Ed.), Toolbox for autologous breast reconstruction. **Clinical and Plastic Surgery**, v. 38, p. 277–292, 2011.

DE WEERD, L.; WEUM, S.; MERCER, J.B. Locating Perforator Vessels Using Dynamic Infrared Thermography. **Annals of Plastic Surgery**. Dec 13, 2012.

DOBSON, J.M.; SCASE, T.J. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, p. 424–431, 2007.

DONNELLY, L.; MULLIN, C.; BALKO, M.; GOLDSCHIMIDT, E.; KRICK, E.; HUME, C.; BRONW, D.C.; SORENMO, K. Evaluation of histological grade and histologically tumor

free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumors. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 13(1), p. 70-76, 2015.

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.

EICHHORN, W.; BLAKE, F. A. S.; POHLENZ, P.; GEHRKE, G.; SCHMELZLE, R.; HEILAND, M.. Conditioning of myocutaneous flaps. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v.37, p.196-200, 2009.

FRANCIS J.E., ROGGLI R., LOVE T.J., et al. Thermography as a means of blood perfusion measurements. **Journal of Biomedichical Engenniering**,101:246–9, 1979.

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

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, tissueinhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, n. 4, p. 419-429, 2012

GILSON, S.D.; STONE, E.A. Principles of oncologic surgery. **Compendium of Continated Education of Practice Veterinary**, v.12(827), 1990.

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

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

MELO S.R.

HOSMER, D. W. e LEMESHOW, S. Applied Logistic Regression. 2a. ed. New York: **Wiley**. 320p, 2000.

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

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 Medicine**, 2003;32:195-199.

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.

ITOH, Y.; ARAI, K. The deep inferior epigastric artery free skin flap: anatomic study and clinical application. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 91, p. 853–63, 1993.

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.

KILLICK, D.R.; ROWLANDS, A.M.; BURROW, R.D.; CRIPPS, P.; MILLER, J.; GRAHAM, P.; BLACKWOOD, L. Mast cell tumors and cutaneous histiocytoma excision wound healing in general practice. **Journal of Small Animal Practice**, v. 52, p. 469-475, 2011.

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

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.

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.

KLEINBAUM, D. G. Survival analysis: a self-learning text. 1^a. ed. New York: **Springer**. 324p., 1996.

KONDO K, MURAMATSU M, OKAMOTO Y, JIN D, TAKAI S, TANIGAWA N, MIYAZAKI M. Expression of chimase-positive cells in gastric cancer and its correlation with the angiogenesis. **Journal of Surgical Oncology**, 93:36-420, 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.

LANGFORD, L. A.; COOKSLEY, C. S.; DEMONTE, F. Comparasion of MIB-1 (Ki-67) antigen and bromodeoxyuridine proliferation indices in meningiomas. **Human Pathology**, v. 27, n. 4, p. 350-354, 1996.

LAWSON, R.N. Implications of surface temperatures in the diagnosis of breast cancer. **Cancer Medical Association Journal**, 1956; 75:309–11, 1956.

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.

LIPTAK, J.L. The principles of surgical oncology. **Australian Veterinary Practitioners**, v 27, p. 114—121, 1997.

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

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.

MATZ, B.M. Current concepts in oncology surgery in small animals. ***Veterinary Clinic of Samll Animals***, v. 45, p. 437-499, 2015.

MARINO, D. J.; LOUGHIN, C. A. Diagnostic imaging of the canine stifle: a review. ***Veterinary Surgery***, v. 39, n. 3, p. 284-295, 2010.

MAGLENNON, G. A.; MURHY, S.; ADAMS, V.; MILLER, J.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; SCASE, T. J. Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. ***Veterinary and Comparative Oncology***, v. 6, n. 4, p. 268–274, 2008.

McCULLAGH, P. and NELDER, J. A.. Generalized linear models. 2nd ed. **Chapman and Hall**: New York, USA. p.511, 1989.

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.

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

MELO S.R.

2013. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MELO, S. R.; MACEDO, T. R.; COCLIGATI, B; FERRIGNO, C. R. A.; MATERA, J.M. Thermographic Assessment of canine mast cell tumors. **Indian Journal of Applied Research**, v. 5, i. 3, p. 539-543, 2015.

MEDERLE O, MEDERLE N, BOCAN EV, CEAUS UR, RAICA M. VEGF expression in dog mastocytoma. **Medical-Surgical Journal of Iasi, Romania**. 2010;114:185-188.

MICHELS, G.M.; KNAPP, D.W.; DENICOLA, D.B.; GLICKMAN, N.; BONNEY, P. Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumors with histopathologically tumor-free versus nontumor-free margins: A retrospective study of 31 cases. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.38, p. 458–466, 2002.

MIKULSKA, D. Contemporary applications of infrared imaging in medical diagnostics. **Annales Academiae Medicae Stetinensis**, v. 52, n. 1, p. 35-39, 2006.

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.

MONTEIRO, B.; BOSTON, S.; MONTEITH, G. Factors influencing complete tumor excision of mast cell tumors and soft tissue sarcomas: A retrospective study in 100 dogs. **Canadian Journal of Veterinary**, v. 52, n. 11, p. 209–1214, 2011.

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** , 76: 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, A. H. SPARKES, A. S. BLUNDEN, M. J. BREARLEY, K. C. SMITH. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. **Surgery Veterinary Records**, v. 158, p. 287-291, 2006.

NETER, J., KUTNER, M. H., NACHTSHEIM, C. J. And WASSERMAN, W. Applied Linear Statistical Models. 4. ed. Illinois: Richard D. Irwing. 1408p, 1996.

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

NOWAKOWSKI, A. “Advances of quantitative ir-thermal medical diagnostics”.In: **International Conference On Quantitative Infrared Thermography**, p. 143–145, 2006.

PATNAIK, A. K.; EHLER, 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.

PAVELSKI, M; SILVA, D.M.; LEITE, N.C.; JUNIOR, D.A.; de Sousa, R.S.; GUÉRIOS, S.D.; DORNBUSH, P.T. Infrared Thermography in dogs with mammary tumors and healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 29: 1579-1583, 2015.

PAVLETIC, M.M. Skin flaps in reconstructive surgery. **Veterinary Clinics of North America**. v. 20(1), p. 81-103, 1990.

PAVLETIC, M.M. Atlas of Small Animal Wound Management and reconstructive surgery. 3 ed. Ames: **Wiley-Blackwell**, 2010.

PIZZONI, S.; SABATTINI, S; STEFANELLO, D; DENTINI, A.; FERRARI, R.; DACASTO, M.; GIANTIN, M.; LAGANGA, P; AMATI, M. TORTORELLA, G.; MARCONTATO, L. Features and prognostic impact of distant metastases in 45 dogs

with de novo stage IV cutaneous mast cell tumors: a prospective study. **Veterinary and comparative oncology**, Fev 23, p. 1-9, 2017.

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

PRATSCHKE, K.M., ATHERTON, M.J.; SILLITO, J.A.; LAMM, C.G. Evaluation of a modified proporcional margins approach for surgical resection of mast cell tumors in dogs: 40 cases (2008-2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 243 (10), p. 1436-1441, 2013.

REBUZZI L, WILLMANN M, SONNECK K, GLEIXNER KV, FLORIAN S. 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, 2003.

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

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.

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.

SALMI, A.M.; TUKIAINEN, E.; ASKO-SELJAVAARA, S. Thermographic mapping of perforators and skin blood flow in the free transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. **Annals of Plastic Surgery**, v.35, p.159–164, 1995.

MELO S.R.

SAKUMA, C.H.; VALENTE, N. S.; MATERA, J.M. Clinical study of skin flap apppication during oncologic surgery in dog. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 32-37, 2003.

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.

SCHULTHEISS, P.C.; GARDINER, D.W.; RAO, S.; OLEA-POPELKA, F.; TUOHY, J.L. Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 238 (11), 2011.

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.

SÉGUIN, B.; BESANCON, M.F.; McCALLAN, J.L.; DEWE, L.L.; TENWOLDE, M.C.; WONG, E.K.; KENT, M.S. Recurrence Rate, Clinical Outcome, and Cellular Proliferation Indices as Prognostic Indicators after Incomplete Surgical Excision of Cutaneous Grade II Mast Cell Tumors: 28 Dogs (1994–2002). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 933-940, 2006.

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.

SLEDGE, D.G.; WEBSTER, J.; KIUPEL, M. Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. **The Veterinary Journal**, v. 215, p. 43-54, 2016.

MELO S.R.

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.

SONG, C.; APPELYARD, 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.

SZENTIMREY, D. Reconstructive surgery for the tumor patient. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.13, n.1, p. 70-76, 1998.

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, p. 402–424, 2007.

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.

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

WEBSTER, J. D.; YUZBASİYAN-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.; YUZHANSKYAN-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.
- WEISS, E.; FRESE, K. Tumors of the skin. **World Health Organization**, v.50, p.79–100, 1974.
- WEISSE, C.; SHOFER, F.S.; SORENMO, K. Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.38, n.1, p.71-73, 2002.
- 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.; IDDES, 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
- WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5a. ed., Saunders, **Elsevier**; 2013.
- 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.
- YAMAZAKI, M.; SATO, S.; SAITOH, D.; OKADA, Y.; ASHIDA, H.; OBARA, M. Photoacoustic Monitoring of Neovascularities in Grafted Skin. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.38, p.235–239, 2006.
- ZHAN P, QIAN Q, YU LK. Serum VEGF level is associated with the outcome of patients with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. **Hepatobiliary Surgery Nutrition**; 2(4):209-215, 2013.