



MARIA LUIZA DE CASTRO RAMOS VALLADÃO

**REMODELAMENTO DO TUMOR VENÉREO
TRANSMISSÍVEL CANINO DURANTE O TRATAMENTO
COM SULFATO DE VINCRISTINA**

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**REMODELAMENTO DO TUMOR VENÉREO
TRANSMISSÍVEL CANINO DURANTE O TRATAMENTO
COM SULFATO DE VINCRISTINA**

MARIA LUIZA DE CASTRO RAMOS VALLADÃO

Tese de doutorado apresentada a Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento. Sob orientação do Prof. Dr. Konradin Metze.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

V24r

Valladão, Maria Luiza de Castro Ramos, 1977 -
Remodelamento do tumor venéreo transmissível
canino durante o tratamento com sulfato de vincristina /
Maria Luiza de Castro Ramos Valladão. -- Campinas, SP
: [s.n.], 2012.

Orientador : Konradin Metze.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imuno-histoquímica. 2. Cromatina. 3.
Ultraestrutura. 4. Morfometria. 5. Dimensão fractal. I.
Metze, Konradin. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Remodeling of the canine transmissible venereal tumor during treatment with vincristine sulfate.

Palavra-chave em inglês:

Immunohistochemistry

Chromatin

Ultrastructure

Morphometry

Fractal dimension

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Konradin Metze [Orientador]

Maria Letícia Cintra

Maria Luiza Silveira Mello

Noeme Sousa Rocha

Marcelo Beletti

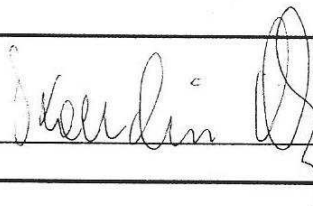
Data da defesa: 15-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Banca examinadora de Tese de Doutorado

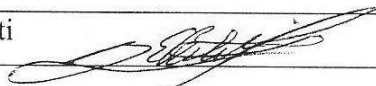
Maria Luiza de Castro Ramos Valladão

Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze

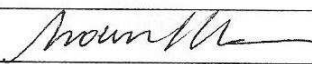


Membros:

Professor (a) Doutor (a) Marcelo Emilio Beletti



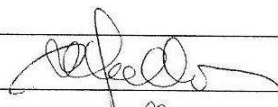
Professor (a) Doutor (a) Noeme Souza Rocha



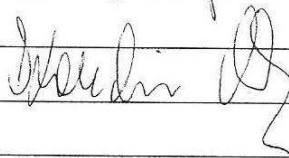
Professor (a) Doutor (a) Maria Leticia Cintra



Professor (a) Doutor (a) Maria Luiza Silveira Mello



Professor (a) Doutor (a) Konradin Metze



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/02/2012

***Aos meus amores
Valladão, Tusa e Alexandre.***

AGRADECIMENTOS

A Deus

Ao Prof. Dr. Konradin Metze

À Msc. Karime Cury Scarpelli

Ao Dr. Randall Luís Adam

À Dra. Ellen Pestilli,

À Profa. Dra. Irene Lorand-Metze

Ao Msc. Edson Scarpelli

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Aos componentes e participantes do Exame de Qualificação:

Prof. Dr. José Carvalheira

Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima

Profa. Dra. Maria Letícia Cintra

Aos componentes e participantes da Apresentação da Tese:

Prof. Dr. Marcelo Beletti

Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

Profa. Dra. Maria Letícia Cintra

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Aos professores suplentes:

Prof. Dr. José Guilherme Xavier

Prof. Dr. Hernandez F. Carvalho

Profa. Dra. Nicola Conran

AGRADECIMENTOS

Ao meu Salvador: Jesus.

À minha incansável mãe pelo amor, empenho e dedicação com o texto.

Às criaturas maravilhosas que são os animais.

A toda minha família pela educação, carinho e incentivo.

Aos meus melhores AM: Adnan e Maximilian.

A toda família Nuevo e Blanco pelo carinho com que me acolheram.

Ao pastor Ademir Rodrigues dos Santos.

Ao Dr. Waldir Renó e esposa América pela dedicação e cuidados.

Aos amigos: Maria Isabel Alegria, Andréia Barbieri, Marbele Guimarães, Mariane Flores, Kati e Juarez Pedra, Rita Ferreira, Lilian Elston, Josemara Cavalcanti, Jacira, Fernanda, Emília, Daniela Ferro, Gislaine, Rayana, Sueli Martins, Fábila Tuma, Sandra Erbolato, Chicão.

Aos amigos que estão distantes: Rita Dias, Kátia Souza, Sandra Santana, Daniela Cruz, Samira El Saif, Ana Maria, Hipólita Siqueira, Carlos Brandão, Júnior, Luciana, Anelyssa Abreu, Richelle, Aline.

Aos protetores dos animais: Marilza (ONG IVVA), Sonia Pequeno, Marta Pacheco, Marisa Galvão (ONG GAAR), Maria, Valdir, Fernando, Hélio.

Aos que me auxiliaram na pesquisa: Marcelo Levenhagen (UFU), Salete (Fisiopatologia Médica/UNICAMP), Mônica (Hemocentro/UNICAMP), Maria do Carmo, Beth, Sérgio, Adilson, Lucinha e Dona Geralda (Anatomia Patológica/UNICAMP).

Hospital AC Camargo

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Computação /Unicamp

FAPESP (temático 2007/52015-0) e CNPq pelo apoio financeiro.

“ Vinde a mim, todos os que estais cansados e
sobrecarregados, e eu vos aliviarei.

Tomai sobre vós o meu jugo, e aprendei de mim,
porque sou manso e humilde de coração; e encontrareis
descanso para as vossas almas.

Pois o meu jugo é suave e o meu fardo é leve”

Mateus 11, 28-30

SUMÁRIO

	<i>Pág.</i>
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1- INTRODUÇÃO	20
1.1- Tumor Venéreo Transmissível Canino	20
1.2- Análise de imagens	28
1.3- Ferramentas morfométricas na Patologia	35
2- OBJETIVOS	37
2.2- Objetivos Específicos	37
3- MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1- Preparação das amostras	40
3.2- Análise dos dados	44
3.3- Análise Morfométrica	47
3.4- Análises Estatísticas	47
4- RESULTADOS	49
4.1- Alterações Nucleares	49
4.2- Alterações Citoplasmáticas	56
4.3- Alterações Estruturais	60
4.4- Linfócitos infiltrantes	61
4.5- Panorama Geral do Remodelamento	62
5- DISCUSSÃO	64
5.1- Volume da massa tumoral	64
5.2- Análise Sintática Estrutural	64

5.3- Células linfocitárias, Mitoses e PCNA	65
5.4- Alterações Nucleares	67
5.5- Alterações Citoplasmáticas	70
5.6- Perspectivas Futuras	73
6- CONCLUSÃO	76
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
8- ANEXOS	96
8.1- Anexo 1 - Escala de Desempenho Karnofsky adaptada para caninos	97
8.2- Anexo 2 – Reações Imuno-histoquímicas	98

LISTA DE ABREVIATURAS

TVTC	Tumor Venéreo Transmissível Canino
DNA	Ácido desoxirribonucléico
HE	Eosina e hematoxilina
ACM1	marcador de macrófagos
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
MHC	Antígeno de Histocompatibilidade
PCNA	Antígeno de Proliferação Celular
Fase S	Fase de síntese
CKS	Escala de Desempenho Karnofsky adaptada aos caninos
R ²	“Goodness of fit” da dimensão fractal
MST	“Minimum Spanning Tree” ou Árvore Geradora Mínima
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
MLV	Maria Luiza de Castro Ramos Valladão
KCS	Karime Cury Scarpelli
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
ML	Marcelo Levenhagen
IC	Instituto de Computação
Coleta A	Coleta pré tratamento quimioterápico
Coleta B	Coleta pós tratamento quimioterápico

N Comp	Número de Componentes
G	Componentes Grandes
IOD	Densidade Óptica Integrada

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1 Exemplo de imagem e seus “pixels”	28
Figura 2 Matriz de Co-ocorrência construída	28
Figura 3 Exemplo de Fractal	30
Figura 4 Exemplo de construção de polígonos de Voronoi	31
Figura 5 Diagrama de Voronoi e triângulação de Delaunay	31
Figura 6 Demonstração de “Minimum Spanning Tree”	32
Figura 7 Citologia, HE, TVTC pré tratamento	47
Figura 8 Citologia, HE, TVTC pós tratamento	47
Figura 9 Núcleos de diferentes casos de TVTC segmentados	47
Figura 10 TVTC, ultraestrutura de transmissão, 3000X	50
Figura 11 TVTC, ultraestrutura de transmissão, 7000X	51
Figura 12 Área nuclear selecionada	51
Figura 13 TVTC, pré quimioterapia, ultraestrutura de transmissão	52
Figura 14 TVTC, pós quimioterapia, ultraestrutura de transmissão	52
Figura 15 Imuno-histoquímica TVTC, anticorpo anti-PCNA	53
Figura 16 Figura mitótica, HE, aumento.	53
Figura 17 Imuno-histoquímica marcação Tubulina	54
Figura 18 Imagem transformada em graus de cinza	54
Figura 19 Imuno-histoquímica Tubulina pré quimioterapia	55
Figura 20 Imuno-histoquímica Tubulina pós quimioterapia TVTC	55
Figura 21 Linfócitos infiltrantes, HE, 1000X	59

LISTA DE TABELAS

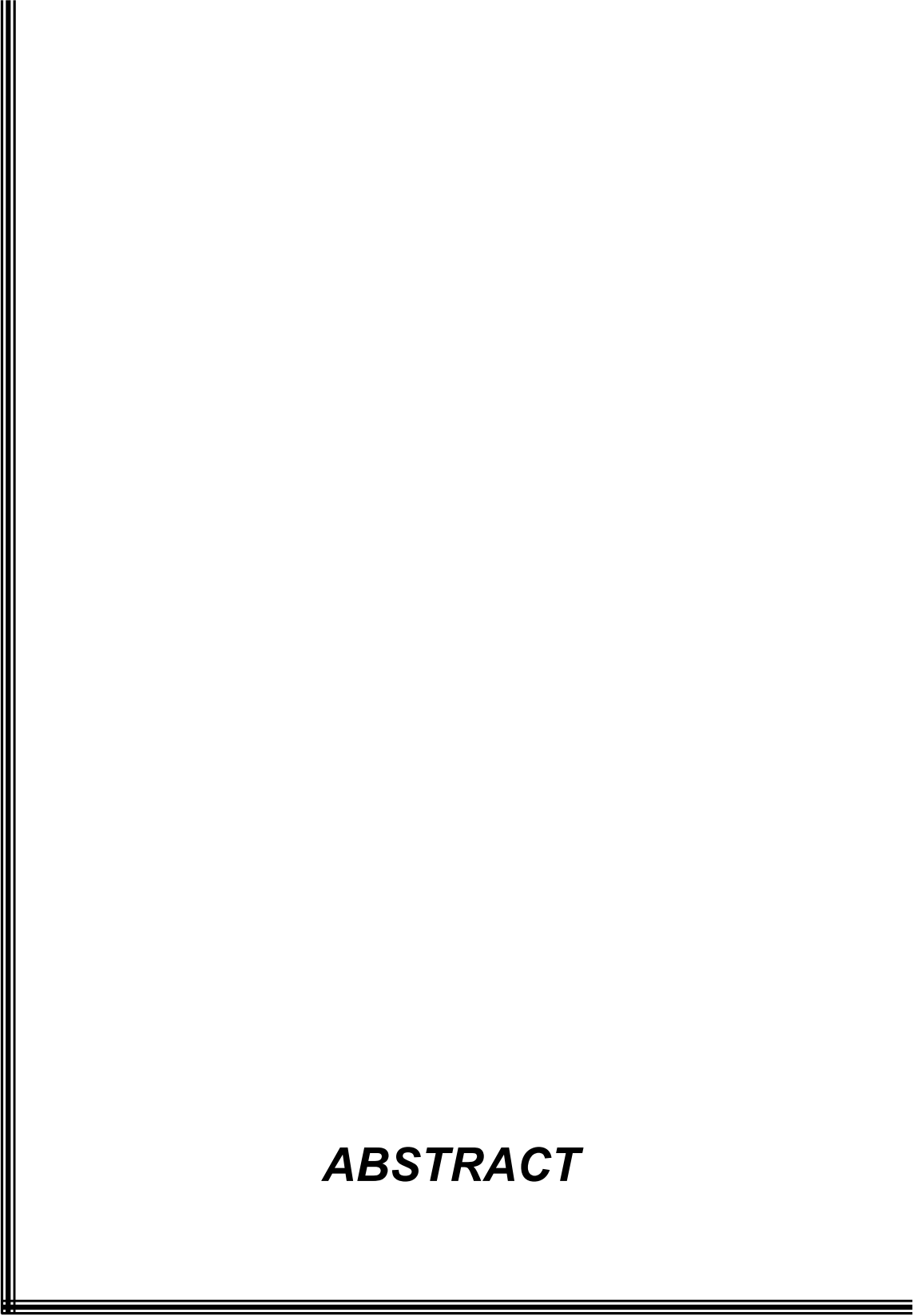
	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Citologia nuclear, Teste T dependente, variáveis significantes	48
Tabela 2 Ultraestrutura nuclear, Teste T dependente, variáveis significantes	50
Tabela 3 Imuno-histoquímica para Tubulina, Teste T dependente, variáveis significantes	56
Tabela 4 Imuno-histoquímica para Tubulina, Teste Wilcoxon, variáveis significantes	57
Tabela 5 Análise Sintática Estrutural, Teste T dependente, variáveis significantes	58
Tabela 6 Análise Sintática Estrutural, Teste Wilcoxon, variáveis significantes	59
Tabela 7 Panorama das Alterações Celulares pós tratamento	60
Tabela 8 Panorama das Alterações Teciduais pós tratamento	60
Tabela 9 Marcadores Imuno-histoquímicos	99

LISTA DE ANEXOS

	<i>Pág.</i>
Anexo 1	94
Escala de Desempenho Karnofsky Adaptada para caninos	
Anexo 2	95
Reação Imuno-histoquímica, método HRP polimérico livre de biotina	

RESUMO

O tumor venéreo transmissível canino (TVTC) é transmitido por meio da transplantação de células neoplásicas. O sulfato de vincristina é o agente quimioterápico mais utilizado no tratamento do TVTC. O objetivo deste estudo foi comparar as alterações morfológicas antes da quimioterapia e após uma semana da aplicação de uma injeção intravenosa de sulfato de vincristina. Neste estudo prospectivo, 100 massas tumorais do TVTC de ocorrência natural foram incluídos. Lâminas citológicas coradas com HE, cortes parafinados corados com tubulina e PCNA, cortes para microscopia eletrônica foram preparados pré e pós tratamento. Realizou-se a contagem da taxa de mitoses, da porcentagem de linfócitos e da marcação do PCNA. Também foi feita a análise de imagem computacional da textura nuclear e a análise sintática estrutural do tecido tumoral. A morfometria demonstrou que, após a terapia, houve a diminuição da área, do perímetro, do diâmetro, da densidade óptica integrada e da tonalidade dos agrupamentos nucleares; enquanto houve aumento do "goodness of fit" da dimensão fractal nuclear. Na análise sintática estrutural, observou-se o aumento da distância entre os núcleos. A contagem de mitoses e o índice PCNA não mostraram diferença entre a primeira e a segunda biópsia. Os agrupamentos citoplasmáticos grandes que foram corados com tubulina diminuíram de tamanho após o tratamento e essa alteração talvez se deva à ruptura induzida pela vincristina nos microtúbulos. Em resumo, a quimioterapia com vincristina promoveu profundas alterações no núcleo, no citoplasma e na reorganização estrutural sintática do tumor.



ABSTRACT

The canine transmissible venereal tumor (CTVT) is transmitted by transplantation of neoplastic cells. Vincristine sulfate is the most widely used chemotherapeutic agent for the treatment of CTVT. The aim of this study was to compare the tumor morphology before chemotherapy and one week after application of a single intravenous injection of vincristine sulphate. In this prospective study 100 animals with spontaneously occurring CTVT were included. HE-stained cytological imprints, paraffin sections stained by tubulin and PCNA and sections for electron microscopy were prepared from the tumor before and after treatment. Mitotic rate, percentage of lymphocytes and PCNA stained tumor cells were counted. Computerized image analysis of the nuclear texture and syntactic structure analysis were applied. After therapy nuclear morphometry showed decreased area, perimeter and diameter values, diminished integrated optical density and cluster shade of nuclear texture, as well as increased values of "goodness of fit" of the fractal dimension. The nuclei were more distant. Mitotic counting and PCNA index did not differ between the first and second biopsy. Cytoplasmic large tubulin clusters diminished their size during treatment. This finding may be due to the vincristine-induced rupture of microtubules. In summary, chemotherapy with vincristine provides profound changes in the nuclear, cytoplasmic and syntactic structural organization of the tumor.

1- INTRODUÇÃO

1.0 Introdução

1.1 Tumor Venéreo Transmissível Canino

O Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC) é uma neoplasia transmitida entre os cães, durante o coito ou por meio de lambedura, mordedura e até via aspiração de células tumorais (1,2). O local de crescimento tumoral mais comum é a genitália externa dos caninos (3). Contudo, tumores primários, envolvendo olhos, espaço orbital, vias nasais e pele também já foram descritos na literatura (4,5).

O TVTC foi reconhecido como transmissível em 1876, quando o Médico Veterinário Novinsky transplantou células do tumor experimentalmente (5). Sticker referiu-se ao TVTC como um linfoma contagioso (1905-1906) e realizou diversos trabalhos sobre esse tumor, o qual veio a ser chamado, também, de Sarcoma de Sticker (1).

Embora alterações genéticas, nas células, provocadas por agentes virais, estejam associadas a tumores transmissíveis, não foram identificados agentes virais no TVTC (5,6). Além disso, o TVTC contém células que são geneticamente diferentes do DNA do seu hospedeiro (7,8) e somente células vivas de TVTC são transmitidas experimentalmente (5,9).

Esse tumor possui uma alteração gênica característica que é o rearranjo do proto-oncogene c-MYC, resultante da inserção do elemento de transposição LINE-1, encontrado em amostras coletadas em diferentes países (4,10-12).

A análise filogenética realizada por Murgia et al. (11), sugeriu que, o TVTC tenha surgido, inicialmente, em um lobo ou cão de raça antiga da Ásia Oriental. Murgia et al. (11) mostraram que, provavelmente, tumores coletados de cães de diferentes continentes, sejam derivados de um clone neoplásico que se dividiu em 2 subclasses.

Após realizar a análise de divergência de microsatélites, Murgia et al. (11) encontraram dados que sugeriram ter o tumor surgido entre 200 a 2.500 anos atrás. No entanto, Rebbeck et al (13) não concordaram com essa teoria e postulam que o tumor surgiu de um único lobo, entre 7.800 a 78.000 anos atrás.

1.1.1 Aspectos macroscópicos

O aspecto macroscópico do TVTC é variável. As massas tumorais podem ser únicas ou múltiplas, nodulares, pedunculadas, multilobulares, firmes ou friáveis (14). Segundo Withrow e Mac-Ewen (15), o diâmetro da massa tumoral do TVTC mostra variação entre 0,5 e 10 cm.

Clinicamente, a massa tumoral apresenta secreção sero-sanguinolenta e áreas de necrose são frequentes. Pode haver também infecção bacteriana na massa tumoral (15).

1.1.2 Aspectos microscópicos

O TVTC é descrito, histologicamente, em cortes corados com eosina e hematoxilina (HE), como uma neoplasia que apresenta células redondas, ovais ou poliédricas. O núcleo é centralizado, grande, oval, contém cromatina, exibindo granulação grosseira, além de nucléolo proeminente, localizado excentricamente.

O citoplasma das células do TVTC é finamente granular, pálido, abundante e, quase sempre, contém vacúolos. Figuras mitóticas também podem ser observadas (1-3).

As células do TVTC são classificadas por alguns autores, de acordo com sua morfologia celular, em tipo linfocitóide, plasmocitóide ou misto (16-18). São considerados, como do tipo linfocitóide, os tumores nos quais há predominância de células típicas de TVTC (morfologia arredondada, citoplasma escasso e vacúolos periféricos); e, como do tipo plasmocitóide, quando há predomínio de células que apresentem morfologia ovóide, menor relação núcleo-citoplasma e núcleo localizado excentricamente (19).

1.1.3 Aspectos ultraestruturais

Ao exame ultraestrutural, as células viáveis do TVTC apresentam núcleo redondo à oval, cromatina dispersa e nucléolo com nucleolema evidente. O citoplasma possui mitocôndrias com poucas e irregulares cristas, retículo endoplasmático rugoso abundante, poliribossomos, complexo de Golgi e algumas gotículas lipídicas. Ocasionalmente, são observadas microvilosidades em áreas onde as células estão menos coesas. Células chamadas em “degeneração” têm citoplasma mais escuro, mitocôndrias, retículos endoplasmáticos edemaciados e espaço perinuclear ampliado (20).

1.1.4 Aspectos imuno-histoquímicos

Marchal et al (21) e Mozos et al (22) encontraram, no TVTC, marcação positiva para os anticorpos vimentina (marcador de células de origem mesenquimal), lisozina, ACM1 (marcador de macrófagos) e alfa-1-antitripsina (marcadores para células de origem histiocitária); enquanto as células do TVTC, não foram marcadas com os anticorpos para queratina, desmina, α actina para músculo liso, CD3 (marcador de linfócitos T), IgG e IgM, λ cadeia leve e κ cadeia leve.

1.1.5 Comportamento

Experimentalmente, o TVTC cresce com rapidez (3) e pode causar metástases, especialmente, em caninos neonatos e imunossuprimidos (5).

Regressões espontâneas foram relatadas, experimentalmente, em TVTCs transplantados. Higgins (23) descreveu a regressão espontânea em tumores de ocorrência natural. No entanto, Gaspar (24) relata que seu grupo de pesquisadores não identificou casos de regressão espontânea em tumores de ocorrência natural, nos pacientes do Hospital Veterinário de Botucatu-UNESP, SP e nos, do Hospital da Universidade Federal de Pelotas, RS.

Segundo Liao et al. (25), o TVTC é um bom modelo para investigação da interação entre o sistema imune do hospedeiro e o crescimento tumoral. O TVTC não é reconhecido, inicialmente, pelo sistema imunológico do hospedeiro. A expressão dos antígenos de histocompatibilidade (MHC) classes I e II aumenta,

somente, por volta de 12 semanas, após a transplantação das células tumorais (26).

As células do estroma e componentes da matriz extracelular variam nas diferentes etapas de crescimento do TVTC, e foi levantada a hipótese de que isso possa influenciar a progressão ou regressão do tumor (25,27).

Tumores em fase regressiva são infiltrados por macrófagos e plasmócitos (1,3). Mukaratirwa et al. (28) constataram haver um aumento significativo da população de linfócitos, infiltrando o tumor na fase regressiva; sabendo-se que a infiltração de linfócitos T citotóxicos pode resultar na morte de células tumorais (28,29).

1.1.6 Marcadores da Proliferação Celular

Vários métodos foram desenvolvidos, para detectar células em proliferação, nas diferentes fases do ciclo celular (30).

A contagem das mitoses por campo de maior aumento ou o cálculo do índice de mitoses são as maneiras mais simples de avaliar a proliferação das neoplasias (30).

O antígeno de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear não histona, de 36 kDa, presente em todas as fases do ciclo celular das células eucarióticas. O PCNA apresenta aumento da concentração durante a fase de síntese (fase S) e devido a essa característica, a marcação imuno-histoquímica realça núcleos, predominantemente, na fase S (30).

Chu et al. (4) avaliaram as características proliferativas do TVTC transplantado experimentalmente e relataram que, na fase progressiva desse

tumor, as figuras mitóticas, a taxa de células PCNA positivas e a área foram muito superiores as da fase regressiva.

1.1.6 Tratamento

O TVTC responde a diversas formas de terapia (1, 29, 32-34, 37, 39-45). A remoção cirúrgica do tumor pode ser curativa, no entanto a recorrência desse é relatada em 40% dos casos (1).

A radioterapia é efetiva e pode ser utilizada como única forma de tratamento, ou associada a agentes quimioterápicos (35). Thrall (36) utilizou a dose 10 Gy (1000 rad) para o tratamento do TVTC e observou que foram necessárias de 1 a 3 doses para indução da remissão completa da massa tumoral.

A imunoterapia com interleucinas vem sendo estudada, amplamente, como terapia alternativa (29,32-34).

A quimioterapia é outra forma de tratamento. Ela tem a vantagem de baixo custo e fácil aplicação, não necessitando de equipamentos sofisticados, como no caso da radioterapia. Diversos agentes quimioterápicos podem ser empregados no tratamento do TVTC como agentes únicos ou combinados, incluindo vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida e metotrexate. A maioria dos protocolos quimioterápicos resulta entre 90 a 95 % de cura (37-39).

O protocolo quimioterápico mais empregado para o tratamento do TVTC é a aplicação do sulfato de vincristina 0,5 mg/m², via endovenosa, semanalmente, até remissão clínica completa (1,2,40-42). A grande maioria dos autores recomenda aplicações semanais até a remissão completa, com doses de 0,025 mg/Kg (equivalente a aproximadamente 0,5 mg/m²) de sulfato de vincristina

(1,2, 40-42). Calvert et al. (43) utilizaram essa dose em 39 cães com TVTC e a remissão completa das massas tumorais ocorreu após a média de 3 doses de tratamento. Camacho e Laus (40) trataram 20 cães com sulfato de vincristina (0,025 mg/Kg), durante 4 semanas e obtiveram remissão completa da massa tumoral em 95% dos casos.

Marino et al. (44) utilizaram a dose 0,025 mg/Kg de sulfato de vincristina em 2 grupos de cães com TVTC. E tanto o grupo tratado semanalmente como o grupo tratado quinzenalmente apresentaram remissão completa após média de 2,2 e 3,6 aplicações, respectivamente. Esses pesquisadores consideram o regime quinzenal uma alternativa de tratamento, nos casos em que é impraticável a aplicação semanal do quimioterápico.

Em nossa dissertação de Mestrado, estudamos, prospectivamente, os fatores prognósticos e preditivos em 100 cães com TVTC, tratados com vincristina (0,025 mg/Kg, semanalmente) (45). Um dos fatores prognósticos relacionado à sobrevida do animal, durante ou imediatamente após a terapia, foi o escore que avaliou a qualidade de vida por meio da escala Karnofsky, modificada para cães (CKS) (anexo 1) (46). Em relação ao tempo necessário para a remissão completa, os fatores preditivos independentes foram o tamanho da massa tumoral pré tratamento, a idade do canino e a época do ano em que se iniciou o tratamento. A resposta terapêutica foi mais demorada quando terapia se iniciou nos meses quentes e úmidos (47).

Gonzalez et al. (48) avaliaram 5 amostras de TVTC pré e pós 1 dose de quimioterapia com vincristina (dose 0,7 mg/m²). Eles descreveram que à microscopia óptica, as células apresentaram degeneração do citoplasma,

citoplasma de tamanho maior, vacuolizado e com bordas pouco nítidas entre as células.

As alterações citológicas provocadas pela quimioterapia também foram pesquisadas por Nak et al. (42) a partir do “swab” (coloração Hemacolor) de 38 TVTCs, tratados com vincristina na dose 0,025 mg/Kg (0,05 mg/m²). Após 2 semanas do tratamento, Nak et al. (42) observaram, nos esfregaços citológicos, diminuição do número de células tumorais, aumento de células que apresentam núcleos com cromatina agregada e distorcida, células com bordos pouco nítidos, e aumento do número de vacúolos citoplasmáticos.

1.1.7 Tubulina

O sulfato de vincristina é um dos fármacos anticancerígenos que atua nos microtúbulos (49).

As Tubulinas (α -e β -tubulina) são proteínas globulares que compõem os microtúbulos. Os microtúbulos desempenham um papel crucial em um grande número de funções das células (50). Eles mantêm a forma celular, sua polaridade e motilidade, além de fornecerem suporte ao transporte de proteínas celulares e organelas, importantes para a mitose (49).

O equilíbrio contínuo entre montagem (crescimento) e desmontagem (encurtamento) dos dímeros dessas proteínas dos microtúbulos, também, desempenha papel importante nas células (50). Sabe-se que os agentes quimioterápicos que inibem a proliferação celular desorganizam os microtúbulos do aparelho mitótico resultando em dispersão dos cromossomos e formação de agrupamentos incomuns no citoplasma. Outras funções celulares como a

fagocitose e o transporte axonal de organelas subcelulares, também, podem ser atingidas e comprometidas (37-39, 51).

Segundo Molinredo e Gajate (50), a resposta apoptótica induzida pelos agentes que interferem nos microtúbulos parece estar vinculada à modificação das vias de sinalização e às mudanças no suporte fornecido pelos microtúbulos. Como os microtúbulos servem de suporte às moléculas sinalizadoras que regulam a apoptose (“Bim” e Survivina), a liberação dessas, a partir dos microtúbulos, afeta suas atividades reguladoras. Além disso, a inibição da dinâmica dos microtúbulos induz a modificações nas vias de sinalização de controle da ativação do fuso mitótico, da fosforilação do Bcl-2 e da ativação da proteína quinase alfa e gama, ativadora de stress, conhecida, como c-Jun NH2-terminal quinase. Tais modificações culminam na apoptose das células por meio do acúmulo de sinais para atingir o limiar do acontecimento da apoptose ou mesmo na diminuição deste limiar na célula, o que leva à morte celular (50).

1.2 Análise de Imagens

Devido à subjetividade na interpretação das características das imagens de equivalência, são relatados altos graus de discordância entre os laudos diagnósticos dos especialistas em patologia (52-55).

Os seres humanos são aptos a identificar objetos conforme a sua forma. No entanto, a análise de imagem computacional pode quantificar a forma, utilizando a geometria euclidiana; fornecendo dados precisos da medida da área, do diâmetro, do perímetro, do fator de forma, entre outros (56). Esses sistemas

especializados quantitativos têm sido utilizados com o propósito de tornar objetivas tais interpretações da imagem.

Com o auxílio desses equipamentos, podemos atribuir valores numéricos quanto à morfologia das células e ou de seus componentes (45, 57-60). Podemos, também, quantificar os arranjos arquiteturais das células nos tecidos (61-66).

1.2.1 Características das imagens - Textura

A textura é uma das características da imagem, constituindo-se um elemento importante para a visão humana porque fornece pistas da profundidade da cena e orientação da superfície.

Ela é, intuitivamente, descrita conforme as suas propriedades de suavidade, aspereza e regularidade (67); porém não há um consenso quanto ao seu conceito (68-70).

Os pesquisadores, no entanto, concordam que não existe homogeneidade quando há variação significativa entre os níveis de intensidade dos pigmentos na imagem (71). E que a textura é uma propriedade homogênea, em alguma escala espacial maior que a resolução de dada imagem (71).

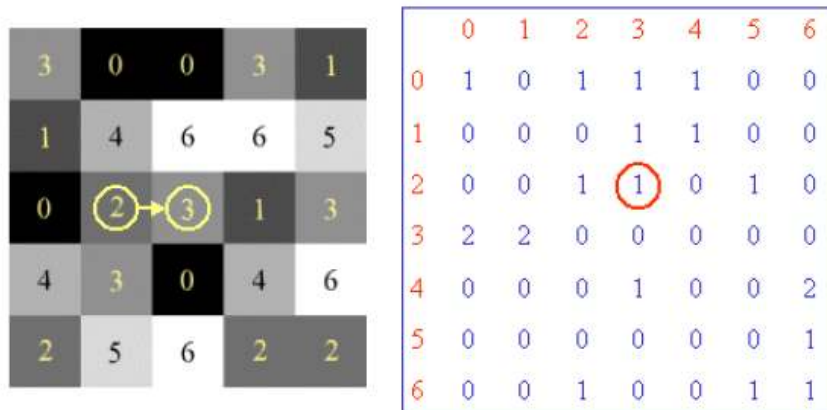
1.2.2 Matriz de co-ocorrência

A matriz de co-ocorrência é um método estatístico capaz de descrever a textura. Após a transformação de dada imagem em níveis de cinza, a matriz de co-ocorrência pode ser usada para análise da textura.

Ela se baseia na idéia de que a textura pode ser caracterizada pelo padrão da distribuição de “pixels” de níveis de cinza da imagem (71,72).

O principal elemento da matriz de co-ocorrência são pares de “pixels” vizinhos (Figura 1). Cada elemento na posição “x y” indica o número de vezes que um “pixel” com nível de cinza “x” tem, como vizinho, um pixel com nível de cinza “y” (Figuras 1 e 2).

A matriz de co-ocorrência é simétrica em relação a sua diagonal principal. Imagens suaves, com textura suave e mudanças sutis de luminância, geram matrizes de co-ocorrência onde os dados se concentram em torno da diagonal principal. Por outro lado, imagens com alto contraste, equivalentes a contornos nítidos, distanciam os valores da diagonal principal (72).



Figuras 1 e 2 – Exemplo de imagem e seus “pixels” transformados em 7 níveis de cinza (1) e matriz de co-ocorrência construída (2) (72).

Diversos parâmetros descritivos da textura são obtidos da matriz de co-ocorrência. Tais parâmetros também são chamados por alguns autores de características de Markov e foram, originalmente, criados por Haralick (69). Esses

parâmetros da textura descrevem, objetivamente, a homogeneidade dos níveis de cinza na imagem (Homogeneidade e Segundo Momento Angular), a quantidade de variação local dos níveis de cinza (Contraste), o grau de dispersão das ocorrências entre os níveis de cinza (Entropia) e a concentração das ocorrências de níveis de cinza quanto à distância desses da diagonal da matriz de co-ocorrência (Momento Inverso da Diferença) (71) entre outras características das imagens.

Essas características tornam possível a avaliação do padrão da cromatina ou das áreas citoplasmáticas selecionadas e fornecem informações quantitativas úteis para o diagnóstico ou prognóstico (58,59, 73-82).

1.2.3 Geometria Fractal

Um fractal é um objeto geométrico que pode ser subdividido em partes, as quais se assemelham ao todo em alguma escala (Figura 3) (74). Para Losa (74), a maioria das estruturas biológicas exibe características fractais.

Recentemente, a fractalidade da cromatina de diversos tumores demonstrou ser fator prognóstico da sobrevida (45,58,59,82,83).

Quando temos uma estrutura que não pode ser descrita, adequadamente, pela Geometria Euclidiana, podemos estimá-la por meio da determinação de sua dimensão fractal (80,81,82).

A dimensão fractal representa o nível de irregularidade de um fractal; assim quanto maior a irregularidade de forma, maior é a dimensão fractal (83).

Outro parâmetro da dimensão fractal, o “goodness of fit” ou R^2 vem sendo utilizado para avaliar a cromatina nuclear e tem demonstrando utilidade prognóstica e diagnóstica entre tumores (45,58,59,82,83).

Para o cálculo do “goodness of fit”, a área fractal é estimada pelo volume/ $2e$ (“e” = o raio, variando entre 1 e 30 “pixels” do elemento de estruturação, não plana, em forma de uma bola; em seguida, é calculada a regressão linear em um gráfico log-log da área fractal contra “e”, com cada parcela experimental de 30 pontos. O ponto de distribuição é rotacionado de modo que o declive seja de 45 graus. Então, o coeficiente da regressão entre os valores reais e os valores estimados é calculado (82). Este valor de R^2 (“goodness of fit”) caracteriza o ajuste da linha de regressão e é, portanto, uma estimativa da qualidade da fractalidade. Um fractal ideal tem um $R^2 = 1$. Os fractais reais têm valores de $R^2 < 1$ (82).

1.2.4 Análise Sintática Estrutural

A Análise Sintática Estrutural, também chamada “Sociologia Celular”, quantifica, de modo objetivo, a organização das células e das demais estruturas no tecido (61,62,89,90)

Três modelos geométricos são utilizados, para realizar a medição e avaliar a distribuição espacial, o Diagrama de Voronoi, o Diagrama de Delaunay e o “Minimum Spanning Tree” (MST) (64,65).

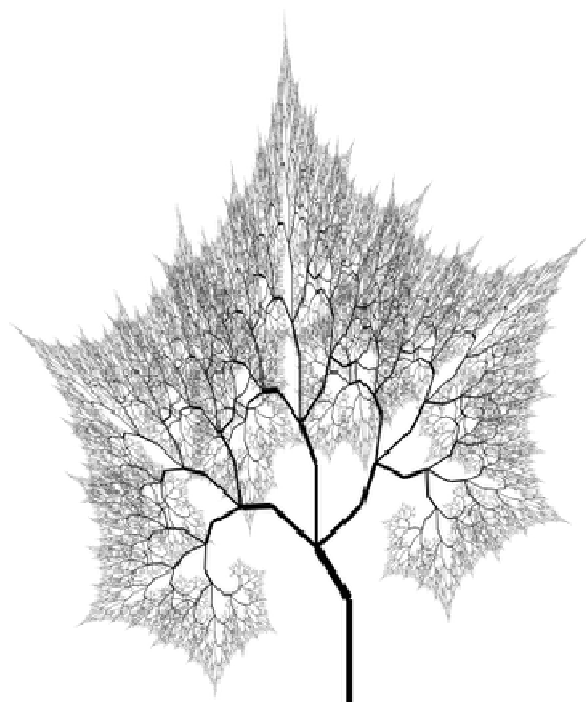


Figura 3 – Exemplo de fractal (88).

O diagrama de Voronoi (Figura 4) é composto por um mosaico de polígonos. Quando a distribuição dos elementos é regular, as áreas dos polígonos não variam muito; mas, quando há formação de grupos variações grandes são encontradas entre os tamanhos dos polígonos (64,91).

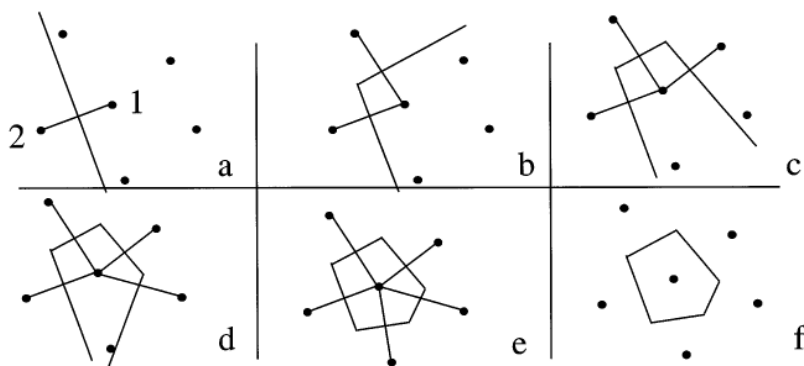


Figura 4 – Exemplo da construção de polígonos de Voronoi a partir de pontos selecionados (91).

A triangulação de Delaunay e o “Minimum Spanning Tree” são derivados do diagrama de Voronoi (90). A triangulação de Delaunay é obtida, formando-se triângulos entre os vizinhos mais próximos; sendo que os vértices dos triângulos são os pontos e, nenhum outro ponto deve estar contido no círculo traçado entre os três vértices de cada triângulo (Figura 5) (92).

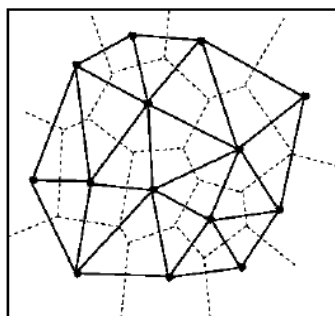


Figura 5 - Diagrama de Voronoi (linha tracejada) sobreposto à triangulação de Delaunay (linha cheia). (93)

E o “Minimum Spanning Tree” (MST), árvore geradora mínima (Figura 6), conecta todos os objetos (pontos) de forma que a soma do comprimento de todas as linhas seja a menor possível (94,95).

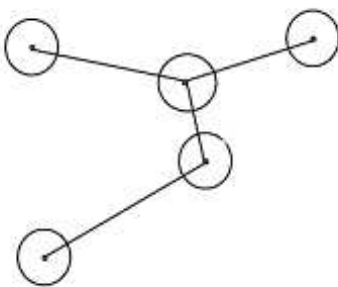


Figura 6 – Demonstração do “MST” de um conjunto de pontos (92)

Para a aplicação desses 3 métodos, as imagens do tecido tumoral são sobrepostas por figuras gráficas; tendo, como base, a prévia marcação do posicionamento dos diferentes tipos celulares, dos núcleos e ou das estruturas. A medição com o auxílio dessa sobreposição é que fornece os dados sobre os padrões de distribuição celular e são ferramentas importantes para o diagnóstico e a observação do comportamento biológico do tumor (61,63,91).

1.3 Ferramentas Morfométricas na Patologia

A tecnologia de imagem digital tornou-se fundamental para o estudo das patologias (96). A aquisição de imagens de alta qualidade, obtidas com o uso da câmera digital acoplada aos microscópios, e a posterior análise dessas imagens, com a ajuda de programas computacionais, otimiza a padronização e minimiza a perda de informações contidas nas células e tecidos (78,92, 97-99).

O papel diagnóstico e prognóstico da morfometria tem sido investigado, principalmente, no que diz respeito à sua aplicação em imagens citológicas e histológicas (19,55,57,58,72,75,76,77,80,100,101).

Na nossa investigação anterior, com o auxílio de programas computacionais, parâmetros da textura da cromatina mostraram prever, independentemente, o tempo de tratamento com sulfato de vincristina necessário para a remissão completa do TVTC (45). Na dissertação de Scarpelli (64), a variável “menor ângulo”, obtida a partir do cálculo da triangulação de Delaunay também foi significativa em prever o tempo de cura do TVTC.

2- OBJETIVOS

2.0 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Embora o sulfato de vincristina seja um agente quimioterápico que esteja em uso na medicina humana e veterinária há várias décadas, na literatura consultada, não foram encontrados trabalhos contendo avaliações quantitativas que demonstrem o remodelamento sofrido pelos núcleos das células do TVTC no âmbito citológico e ultraestrutural, nem encontramos avaliações morfométricas que demonstrem as alterações ocorridas na tubulina presente no citoplasma dessas células tumorais, após o uso desse agente quimioterápico.

Considerando o potencial da análise de imagens em descrever as modificações nos padrões estruturais e arquiteturais das células e tecidos, o objetivo do presente estudo foi avaliar, com o auxílio da morfometria computacional, o remodelamento promovido nas células do TVTC, após tratamento com sulfato de vincristina.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Relacionar parâmetros citológicos das biópsias pré e pós 1 semana de tratamento com sulfato de vincristina;
- 2) Avaliar o padrão ultraestrutural em biópsias do tumor pré e pós 1 semana de tratamento com sulfato de vincristina;

- 3) Avaliar a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos tubulina e PCNA no TVTC nas amostras do tumor pré e pós 1 semana de tratamento com sulfato de vincristina;
- 4) Relacionar parâmetros citológicos com parâmetros ultraestruturais e marcadores imuno-histoquímicos da neoplasia.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.0 Material e Métodos

O protocolo da pesquisa está de acordo com as normas de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (1988) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo nº. 1118-1 e nº 729-2).

O material para o estudo foi recolhido de julho de 2003 até junho de 2006. Cem (100) casos de TVTC naturalmente ocorridos em caninos do município de Taubaté, estado de São Paulo, foram incluídos no estudo.

Oitenta e cinco (85) fêmeas e 15 machos compuseram o estudo dos quais 88 cães sem raça definida e 12 cães de raças variadas. Em 98 casos, a massa tumoral estava localizada na genitália e 2 casos eram extragenitais.

O volume da massa tumoral variou de 0,02 cm³ e 122 cm³, e a média foi de 24,15 cm³ (desvio padrão: 26,7).

Os caninos recolhidos e tratados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Taubaté os quais, em exame clínico realizado por duas médicas veterinárias independentes, apresentaram diagnóstico clínico de Tumor Venéreo Transmissível Canino, tiveram sua massa tumoral biopsiada em 2 momentos. As biópsias foram realizadas com auxílio de “punch” nº 5 (punção sem aspiração) e todos os animais foram previamente sedados com xilasina e ketamina. A primeira biópsia ocorreu previamente à quimioterapia (coleta A) e a segunda biópsia foi realizada 7 dias após a dose inicial do quimioterápico (coleta B).

A partir desses fragmentos biopsiados, foram realizados “imprints” em lâminas para citologia que foram conservadas em álcool a 70 %. Os fragmentos

para a avaliação histológica foram armazenados em formalina tamponada a 10 %, para posterior coloração e confirmação do diagnóstico clínico. Nos 30 últimos casos de TVTC, as amostras coletadas dos caninos foram também armazenadas em solução Karnovsky, a fim de posterior processamento para a análise microscópica ultraestrutural de transmissão.

Os animais receberam soroterapia com solução fisiológica e a dose 0,025 mg/Kg de sulfato de vincristina via endovenosa. Semanalmente, quando das aplicações do quimioterápico, os caninos tiveram seus pesos aferidos e sua classificação clínica na escala Karnofsky modificada para cães foi anotada (Anexo 1). Além disso, tiveram a massa tumoral medida em 3 eixos com o auxílio de paquímetro. E o volume da massa tumoral foi calculado através da fórmula do elipsóide.

3.1 Preparação das amostras

3.1.1 Citologia

Para a microscopia óptica, as lâminas contendo os “imprints” citológicos fixadas em álcool a 70% foram coradas com hematoxilina durante 60 (sessenta) segundos. Essas lâminas foram então passadas em solução de hidróxido de amônio a 1% para a oxidação da hematoxilina em hemateína, a fim de conferir maior estabilidade à ação da luz. A seguir, as lâminas foram coradas com eosina durante 30 segundos, desidratadas e cobertas com lamínula no Núcleo de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP.

3.1.2 Histologia

O processamento histológico das biópsias das massas tumorais consistiu em desidratação numa série de álcoois de concentração crescente (70%, 90% e absolutos) durante 1 hora cada; diafanização em 2 banhos, de 1 hora cada em xilol; e, posteriormente, foram feitos 2 banhos de parafina a 60°C de 1 hora cada. Os fragmentos foram então emblocados em parafina, cortados em espessura aproximada de 4 a 5 mm e fixados em lâmina. Tais amostras foram coradas em hematoxilina e eosina, conforme mesmo protocolo utilizado na coloração da citologia no Núcleo de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP.

3.1.3 Imuno-histoquímica

Para a análise imuno-histoquímica, os blocos de parafina das amostras de TVTC foram encaminhados ao departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo (São Paulo), onde contruiu-se um “tissue microarrayer” TMA (Beecher Instruments, Silver Spring, MD). Cilindros de 1mm de área das amostras tumorais foram retirados dos blocos de parafina e transferidos para o bloco receptor. Nesse bloco, foram dispostas todas as 100 amostras do TVTC coletadas pré e pós quimioterapia com vincristina além de outros tecidos diferentes, para servir como controle à reação.

O bloco receptor foi cortado em micrótomo rotativo na espessura de 5 µm. Esses cortes, colhidos com fita adesiva, foram colados em lâminas e essas submetidas à irradiação ultravioleta por 30 minutos, sendo então imersas em solução solvente (TPC) e secadas à temperatura ambiente. Após a secagem, as

fitas adesivas foram retiradas e as lâminas imersas em banho de parafina, armazenadas a vácuo em freezer (-20°C) até a realização das reações imuno-histoquímicas.

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas pelo método HRP polimérico livre de biotina (Anexo 2).

3.1.4 Microscopia Eletrônica

As 2 amostras pré e pós tratamento de 30 caninos que haviam sido armazenadas em solução Karnovsky foram cortadas em cilindros de 1mm de diâmetro, lavadas com tampão de cacodilato de sódio e pós fixadas com tetróxido de ósmio e cacodilato de sódio em mesma proporção durante 2 horas. As amostras então foram lavadas em acetato de uranila a 0,5% e deixadas em geladeira, imersas em acetato de uranila a 0,5% durante uma noite.

A desidratação das amostras foi realizada em imersões consecutivas de acetona a 30% (30 minutos), acetona a 50% (15 minutos), acetona a 70% (15 minutos), acetona a 90% (15 minutos), acetona anidra (15 minutos), e novamente, em acetona anidra (15 minutos). Após esses procedimentos, as amostras foram dispostas em acetona e resina araldite na mesma proporção e colocadas em rotor durante 2 horas.

As amostras foram incubadas em resina araldite pura, em estufa a 37°C durante 1 hora. Foram cortadas, depois de 4 dias em fatias ultra-finas, com navalha de diamante e colocadas em tela. Finalmente, coradas com solução contendo chumbo (2,66 g nitrato de Pb, 3,52 g citrato de sódio, 60 ml água

destilada e 16 ml NH1 normal) no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP.

3.2 Análise dos dados

3.2.1. Citologia

Imagens provenientes dos esfregaços citológicos de TVTC coradas com eosina e hematoxilina foram digitalizadas interativamente por único operador (MLV), utilizando-se câmara digital de alta resolução (12 “megapixels”), lente objetiva com aumento de 100 X, em óleo de imersão, intensidade de luz 7 e tempo de exposição de 200,5 ms no sistema Leica ®DC 500 e software IrfanView, Microsoft®. As imagens foram salvas sem compactação, no formato bitmap colorido de 24 bits (extensão BMP), com tamanho 1300 x 1030 “pixels”.

As lâminas contendo os esfregaços citológicos foram selecionadas aleatoriamente e realizaram-se até 20 imagens digitalizadas de cada um dos pares de casos de TVTC pré (coleta A) e pós quimioterapia (coleta B), que apresentaram bons esfregaços. Tais imagens foram transformadas em tons de cinza (0 a 255), sendo atribuído o valor 0 à cor negra e 255 à cor branca.

3.2.2 Análise Sintática Estrutural e Contagem de mitoses e de linfócitos

Imagens provenientes dos cortes histológicos de TVTC corados com eosina e hematoxilina foram digitalizadas interativamente por único operador (KCS). Para essa digitalização, utilizou-se também câmara digital de alta

resolução (12 “megapixels”), lente objetiva com aumento de 100 X, em óleo de imersão, intensidade de luz 7 e tempo de exposição de 200,5 ms no sistema Leica ®DC 500 e software IrfanView, Microsoft®. Essas imagens também foram salvas sem compactação, no formato bitmap colorido de 24 bits (extensão bmp), com tamanho 1300 x 1030 “pixels”.

Para o cálculo da análise sintática estrutural nas imagens histológicas, todos os núcleos das células tumorais foram marcados por mesmo operador (KCS).

Para o cálculo da porcentagem de figuras mitóticas e linfócitos no tecido, foi realizada contagem manual, por único observador (MLV), de figuras mitóticas, de linfócitos, de células tumorais e de outras células.

3.2.3 Imuno-histoquímica

A leitura das lâminas marcadas com imuno-histoquímica foi realizada em microscópio óptico comum, por único operador (MLV). A aquisição das imagens marcadas com os anticorpos da imuno-histoquímica foi feita com câmara digital, lente objetiva com aumento de 40 X, sistema Leica DC 500 e também foram salvas, sem compactação, no formato bitmap colorido de 24 bits (extensão BMP), com tamanho 1300 x 1030 “pixels”.

Quanto ao marcador de proliferação PCNA, foram realizadas 5 imagens de cada caso e as células marcadas positivamente, contadas manualmente, por único observador (MLV).

As imagens marcadas pela tubulina foram transformadas em 256 graus de cinza, sendo atribuído o valor 0 ao preto e 255 à cor branca.

A marcação da tubulina foi medida computacionalmente conforme tamanho de agrupamentos pré-definidos, por meio de limiar (“thresholding”). Foram chamados componentes pequenos os agrupamentos nos quais a tubulina estava marcada e que tinham tamanho de 25 “pixels” ou menos. Foram chamados componentes grandes os agrupamentos acima de 25 “pixels” e abaixo do limiar de 128 “pixels”. O componente total calculado compreende toda área pigmentada da imagem, excluindo somente o nível de cinza 255 (branco).

3.2.4 Ultraestrutura

A observação das imagens da microscopia eletrônica também foi realizada por único operador (MLV) na UNICAMP, em microscópio Zeiss com aumentos de 2156 X e 4646 X, a fim de observar e descrever a imagem a partir da microscopia eletrônica de transmissão.

Posteriormente, na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), realizou-se pelo mesmo operador (MLV) auxiliado pelo técnico do laboratório da UFU (ML) a aquisição das imagens em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109, com câmera fotográfica digital Olympus 1376 x 1032 “pixels” acoplada, em aumentos de 3000 X, 7000 X e 20.000 X.

Na UFU, foram adquiridas 30 imagens de cada caso e a análise morfométrica computacional dos 30 núcleos de cada amostra foi realizada a partir da seleção da área do núcleo.

3.3 Análises Morfométricas

Para a segmentação interativa dos núcleos, marcação dos núcleos nas imagens, transformação das imagens em graus de cinza, cálculo da morfometria clássica e textura e cálculo das variáveis da análise sintática estrutural, utilizamos programas computacionais a serem registrados e que foram desenvolvidos pelo Dr. Randall Luiz Adam em conjunto com o IC/UNICAMP.

3.4 Análises estatísticas

A distribuição das variáveis foi avaliada com o Teste de Kolmogorov – Smirnov. A comparação dos valores pré e pós tratamento foi realizada com o Teste - T dependente ou Teste Wilcoxon (com correção do erro alfa), conforme a distribuição das variáveis.

Foram realizadas correlações entre as variáveis utilizando o Teste Spearman ou Pearson, conforme a distribuição dos dados.

A correção do erro alfa foi feita conforme Cross e Chaffin (102).

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo mesmo operador (MLV) através do programa Winstat 3.1.

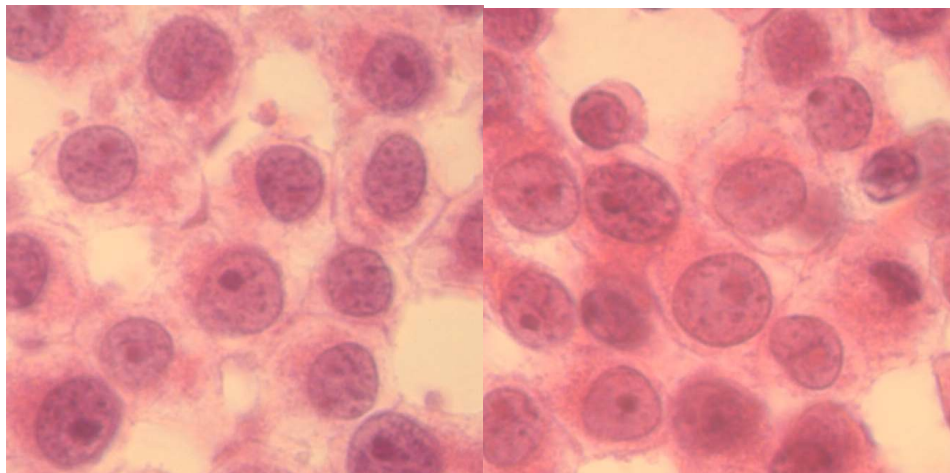
4- RESULTADOS

4.0 Resultados

4.1 Alterações Nucleares

4.1.1 Citologia

A análise morfométrica foi realizada a partir de 62 pares de casos de TVTC pré (Figura 7) e pós tratamento (Figura 8) que apresentaram bons esfregaços. A média de cada variável nuclear foi obtida por meio de cálculo computacional dos valores de 100 núcleos segmentados (Figura 9) de cada um dos 62 pares (total: 12.400 núcleos).



Figuras 7 e 8 – Citologia, HE, TVTC pré tratamento (à esquerda) e TVTC pós quimioterapia (à direita), 1000 X.



Figura 9 – Núcleos de diferentes casos do TVTC segmentados.

As médias das variáveis que foram significantes após o cálculo da distribuição Kolmogorov-Smirnov e teste T dependente estão dispostas na tabela 1.

Tabela 1: Citologia nuclear – Teste T dependente, variáveis significantes com distribuição normal.

Variável Morfométrica	p	Média A	Média B	Diferença entre A e B
Área nuclear (μm^2)	p<0,001	43,93	39,70	4,23
Perímetro 4 (μm^2)	p<0,001	2,08	1,96	0,12
Maior Corda (μm)	p<0,001	0,54	0,51	0,03
Média do Diâmetro Transverso (μm)	p<0,001	0,36	0,34	0,02
Tonalidade dos Agrupamentos	p<0,001	-1216,14	-355,27	- 860,87
Densidade Óptica Integrada	0,0015	6568,77	5959,68	609,09
Diâmetro Transverso Máximo (μm)	0,0052	43,41	39,49	3,92
“Goodness-of-fit”	0,0032	0,99985	0,99986	-0,00001

A análise estatística demonstrou que as médias das variáveis que representam tamanho (área, perímetro, maior corda) e forma do núcleo (maior corda, diâmetro médio transverso e diâmetro máximo transverso) diminuíram após a primeira dose de tratamento e são estatisticamente diferentes para as condições pré e pós a terapia com sulfato de vincristina (Tabela 1).

Quando analisamos as médias das variáveis significantes da textura nuclear, obtivemos que a variável da matriz de co-ocorrência, chamada tonalidade dos agrupamentos (“cluster shade”), aumentou entre a coleta A e B (levando em conta que esta é uma variável negativa). Outra variável da textura nuclear, a densidade óptica integrada, diminuiu. A variável “goodness of fit,” obtida com o método de cálculo descrito por Sarkar, aumentou entre as coletas A e B (Tabela 1).

4.1.2 Ultraestrutura

Ao exame ultraestrutural, observamos que as células do TVTC têm o núcleo de arredondado a ovalado e nucléolo evidente. As células do TVTC observadas possuíam quantidade variável de mitocôndrias dispersas no citoplasma. Observamos também grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (Figuras 10 a 14).

Em 25 casos do TVTC, os cortes obtidos na coleta pré quimioterapia (coleta A) apresentaram células tumorais para a aquisição de imagem (Figura 13). Na coleta pós quimioterapia (coleta B), somente 7 casos apresentaram células tumorais nos cortes preparados para a microscopia eletrônica (Figura 14).

Quando comparamos as médias das variáveis morfométricas calculadas a partir da área nuclear entre os 7 pares de amostras pré (coleta A) e pós tratamento (coleta B), dimensão fractal, energia e segundo momento diagonal da imagem nuclear apresentaram $p < 0,10$ (Tabela 2).

Tabela 2 – Ultraestrutura nuclear – Teste T dependente, variáveis significantes com distribuição normal.

Variável				Diferença entre
Morfométrica	p	Média de A	Média de B	A e B
Dimensão Fractal	0,10	2,43	2,45	0,02
Energia	0,09	2,54 e+5	2,83 e+5	0,31 e+5
Segundo Momento	0,07	7,01	7,59	-0,58
Diagonal				

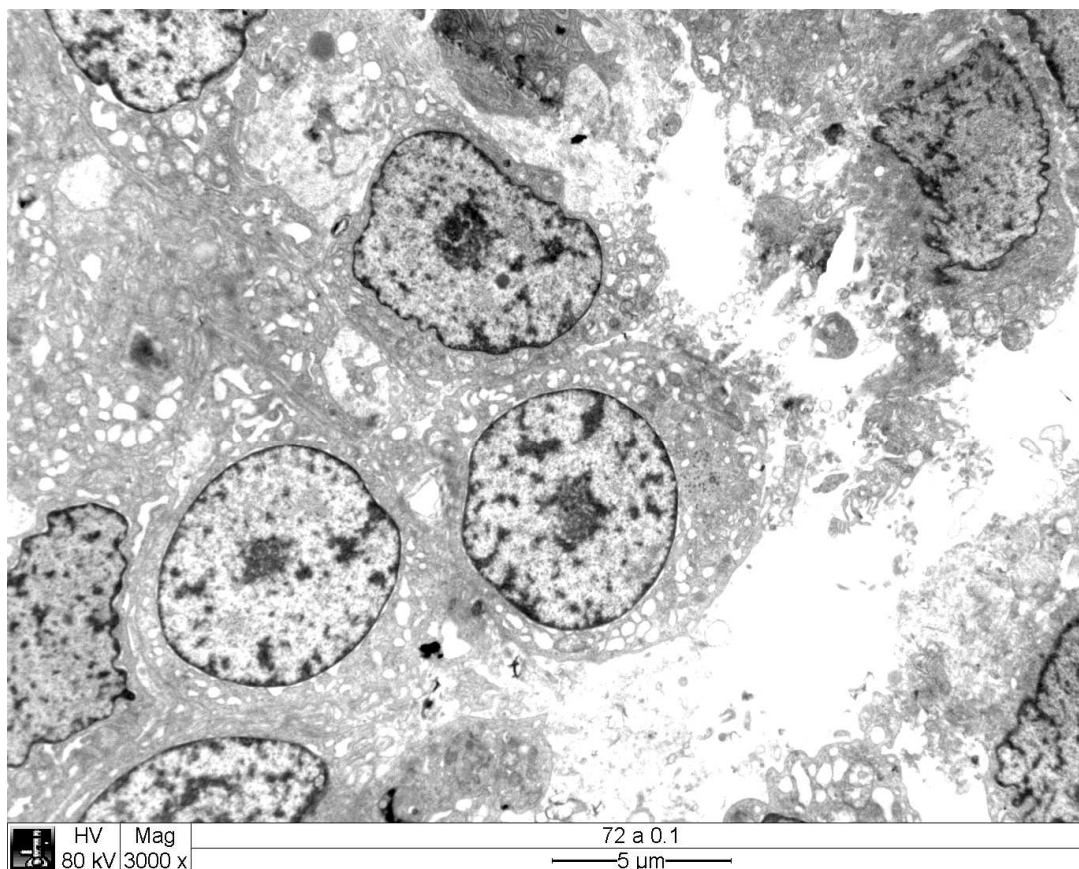


Figura 10 – Tumor Venéreo Transmissível Canino, ultraestrutura de transmissão, 3.000 X.

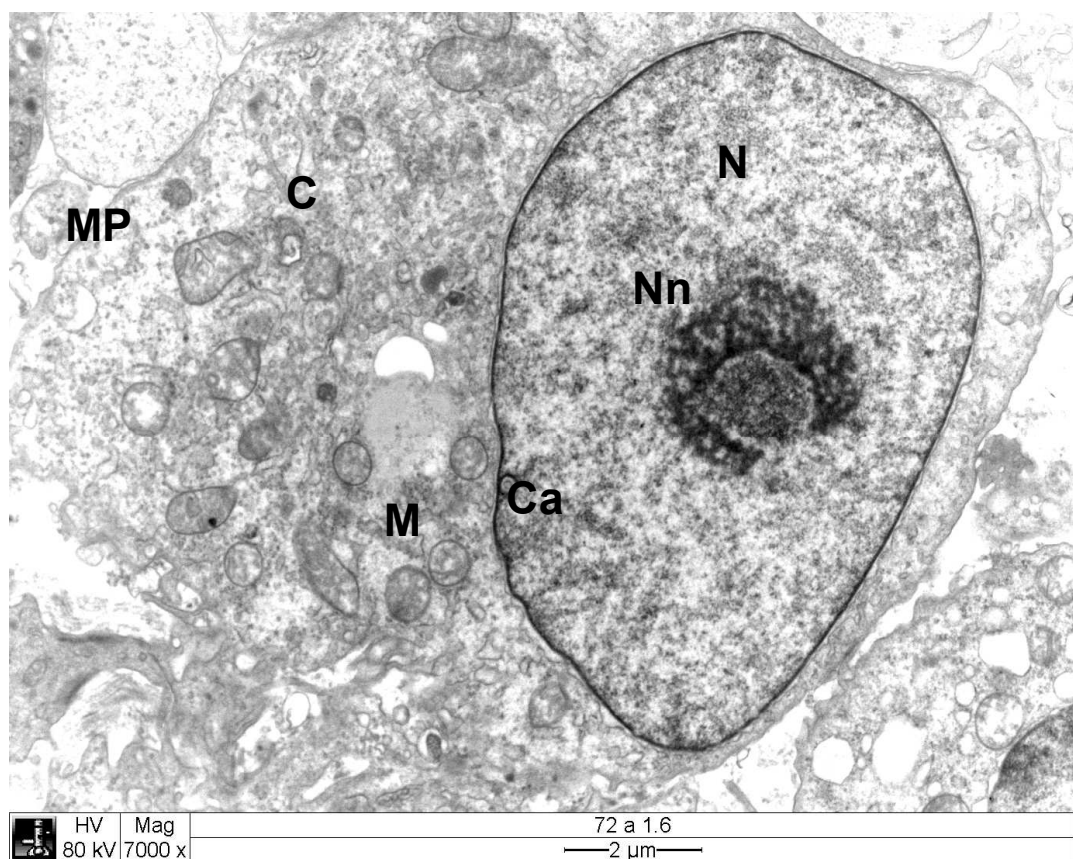


Figura 11 – Tumor Venéreo Transmissível Canino, ultraestrutura de transmissão, 7.000 X,
 N=núcleo, Nn=nucléolo, Ca=carioteca, C=citoplasma, MP=membrana plasmática,
 M=mitocôndria.

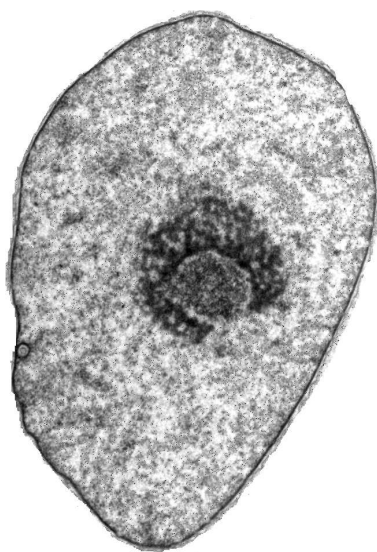
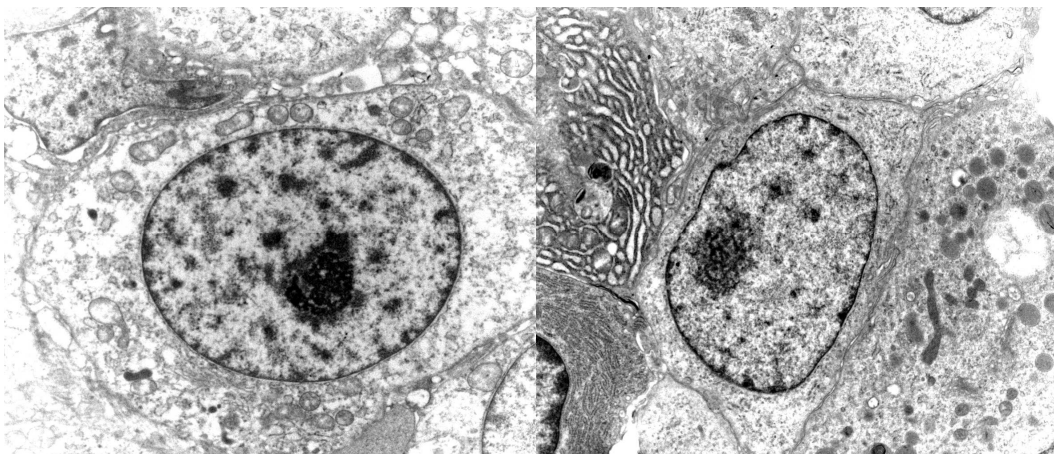


Figura 12 - Área nuclear selecionada.



Figuras 13 e 14 – TVTC pré quimioterapia (à esquerda) e TVTC pós quimioterapia (à direita), ultraestrutura de transmissão, 7000 X.

4.1.3 Antígeno de Proliferação Nuclear

As células do TVTC mostraram marcação de intensidade moderada pelo Antígeno de Proliferação Nuclear (PCNA) (Figura 15). Realizamos a contagem visual das células marcadas positivamente em 70 casos pré quimioterapia e em 21 casos pós quimioterapia.

A média da porcentagem de células positivas pré tratamento foi de 70% e a média da porcentagem de células positivas pós tratamento foi de 83%. Na análise estatística (teste T dependente), foram avaliados 21 pares e não encontramos diferença significativa entre a marcação do PCNA pré e pós quimioterapia ($p = 0,69$).

4.1.4 Contagem de figuras mitóticas

A contagem de figuras mitóticas foi realizada nas lâminas histológicas coradas em HE pré e pós quimioterapia (Figura 16). A média da porcentagem de mitoses em relação às todas as células no tecido aumentou de

0,5% para 1,1% pós tratamento, porém não houve diferença significativa após o teste Wilcoxon ($p=0,09$).

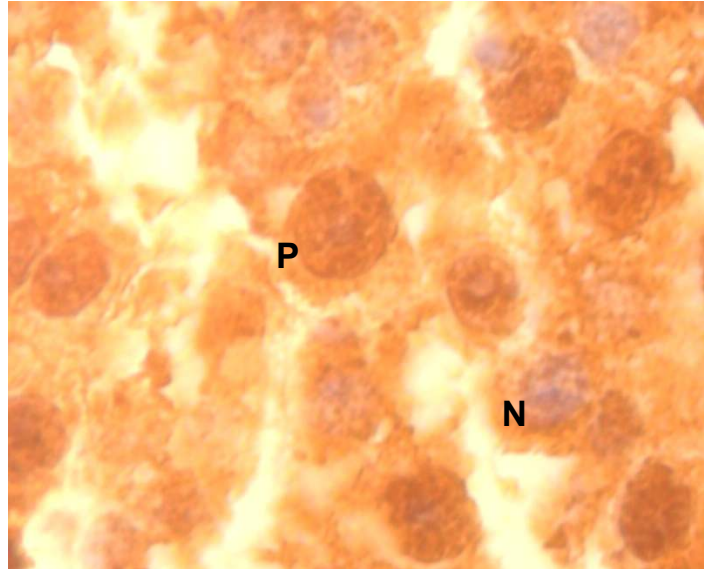


Figura 15 – Imuno-histoquímica, TVTC, anticorpo anti - PCNA, 1000 X,
P=marcação positiva, N=marcação negativa.

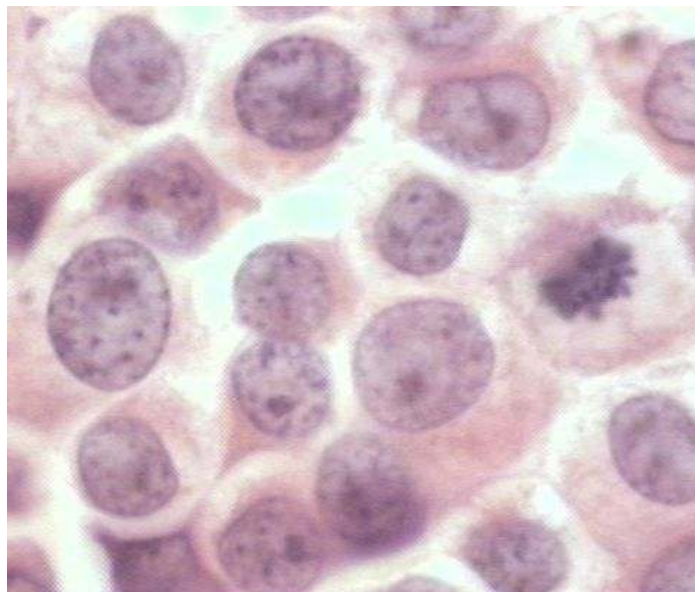


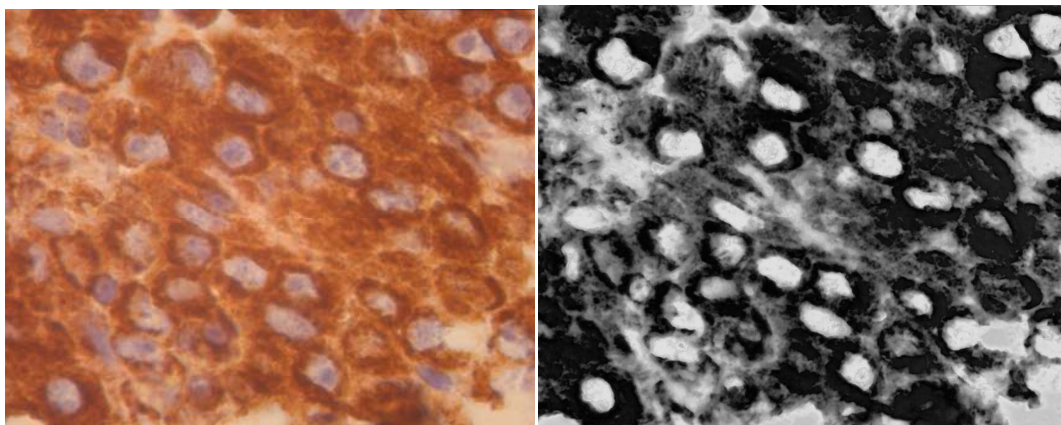
Figura 16: Figura Mitótica, HE, aumento 1000X

4.2 Alterações Citoplasmáticas

4.2.1 Tubulina

A aquisição das imagens marcadas com tubulina foi realizada em 89 pares (pré e pós tratamento com vincristina) e foram feitas 5 imagens de cada caso (total: 890 imagens).

A tubulina marcou intensamente o citoplasma das amostras do TVTC (Figura 17). Após a transformação das imagens adquiridas em graus de cinza (Figura 18), foram calculadas as variáveis morfométricas e densitométricas pré (Figura 19) e pós uma dose do quimioterápico vincristina (Figura 20). As médias dessas variáveis que, após o cálculo da distribuição Kolmogorov-Smirnov, foram significantes no Teste T dependente e Wilcoxon estão dispostas nas tabelas 4 e 5.



Figuras 17 e 18 – Imuno-histoquímica, marcação Tubulina, 1000X (à esquerda) e imagem transformada em graus de cinza (à direita).

O número de Componentes (nº Comp.) pequenos, nº Comp. Total, área dos Comp. Grandes e área dos Comp. Total, tamanho da área dos Comp.

Grandes por componente Grande, tamanho da área dos Comp. Total por componentes, soma dos níveis de cinza dos Comp. Total, soma dos níveis de cinza dos Comp. Grandes, entropia e segundo momento diagonal diminuíram após a primeira dose de tratamento (Tabela 3). Enquanto as variáveis energia, homogeneidade local, tonalidade dos agrupamentos (*cluster shade*), “goodness of fit” e segundo momento angular aumentaram após uma semana do tratamento quimioterápico e foram diferentes estatisticamente entre as coletas A e B (Tabelas 3 e 4).

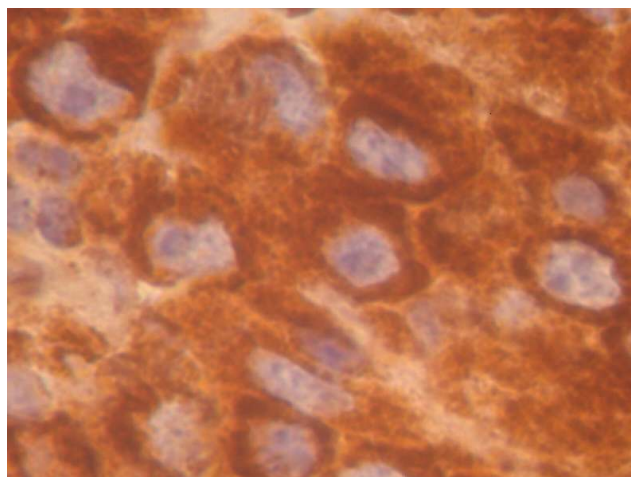


Figura 19 – Imuno-histoquímica com Tubulina, pré quimioterapia, 1000X.

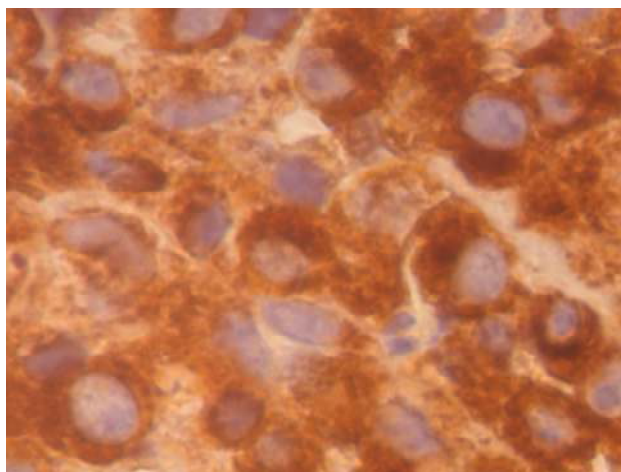


Figura 20 – Imuno-histoquímica com Tubulina, pós tratamento, 1000 X.

Tabela 3: Imuno-histoquímica para Tubulina, Teste T dependente, variáveis morfológicas significantes.

Variável Morfológica	p	Média A	Média B	Diferença entre A e B
Número de Componentes	0,01	784,32	680,65	103,67
(N Comp.) Pequenos				
N Comp. Total	0,03	870,03	773,24	96,79
Área dos Comp. Grandes	0,001	2027,77	1535,95	491,82
(G) (μm^2)				
Área Total por Comp.	0,001	2032,24	1540,1	492,14
(μm^2)				
Tamanho da Área G por	p<0,001	32,91	18,66	14,25
Comp. (μm^2)				
Tamanho da Área Total	0,003	2,22	1,71	0,51
por Comp. (μm^2)				
Soma dos Comp. Total	p<0,001	4,21 e+7	3,19 e+7	1,02 e+7
Soma dos Comp. G	p<0,001	4,19 e+7	3,18 e+7	1,01 e+7
Entropia	0,01	10,81	10,38	0,43
Energia	0,04	130521	139275	-8754
Homogeneidade Local	p<0,001	0,42	0,46	-0,04
“Cluster Shade”	p<0,001	-1,43 e+05	-2,54 e+05	-1,11e+5
Dimensão Fractal	p<0,001	2,26	2,24	0,02

Tabela 4 – Imuno-histoquímica Tubulina, Teste Wilcoxon, variáveis morfométricas significantes.

Variável Morfométrica	p	Z	Media A	Media B	Diferença entre A e B
“Goodness of fit” Segundo	p<0,001	-3,857	0,99703	0,99735	-0,00032
Momento Angular	p<0,001	-3,819	2,66 e-3	4,60 e-3	-1,93 e-3

4.2.1.1 Tubulina e Volume da massa tumoral

O volume da massa tumoral dos 100 caninos mostrou diferença estatisticamente significativa no teste T dependente ($p<0,001$). A média pré quimioterapia foi 24,15 cm³ e, pós quimioterapia foi 10,53 cm³.

Quando realizamos a correlação Spearman das variáveis morfométricas significantes da tubulina e o volume da massa tumoral, obtivemos que todas as variáveis exibem correlação significativa ($p<0,025$), com exceção da variável tonalidade dos agrupamentos (“cluster shade”).

4.2.1.2 Variáveis da Tubulina e Núcleo

Quando realizamos a correlação Spearman das variáveis morfométricas significantes obtidas através do núcleo das células do TVTC com as respectivas variáveis obtidas na morfometria da marcação citoplasmática da tubulina, obtivemos que as variáveis área, perímetro, maior corda, média do diâmetro transversal, diâmetro transversal máximo e “goodness of fit” exibem correlação significativa ($p<0,025$). Somente as variáveis

tonalidade dos agrupamentos (“cluster shade”) e densidade óptica não apresentam correlação significativa.

4.3 Alterações estruturais

Quanto às variáveis mensuradas da análise sintática estrutural, o número (nº) de núcleos por imagem, nº de triângulos por imagem, nº de vértices do “Minimum Spanning Tree” por imagem foram diferentes estatisticamente e diminuíram (Tabela 5). Já a distância entre os vértices, maiores ângulos e menores ângulos da triangulação de Delaunay aumentaram após 1 semana do tratamento (Tabela 5 e 6).

Tabela 5 – Análise Sintática Estrutural, variáveis com distribuição normal, Teste T dependente, variáveis morfométricas significantes.

Variável Morfométrica	p	Média A	Média B	Diferença entre A e B
Número (Nº) de Núcleos por imagem	p<0,001	51,84	29,24	22,6
Nº de Triângulos por imagem	p<0,001	79,42	41,39	38,03
Nº de Vértices do “Minimum Spanning Tree” por imagem	p<0,001	50,83	28,27	22,56
Distância entre os Vértices	p<0,001	8,78	12,31	-3,53
Maiores Ângulos	p<0,001	120,36	126,21	-5,85

Tabela 6 – Análise Sintática Estrutural, variáveis morfométricas significantes, com distribuição não gaussiana, Teste Wilcoxon.

Variável Morfométrica	p	Média A	Média B	Diferença entre A e B
Menores Ângulos	p<0,001	48	52,80	-4,8

4.4 Linfócitos infiltrantes

A contagem de linfócitos foi realizada nas lâminas histológicas coradas com HE (figura 21). Observamos que a média da porcentagem de linfócitos infiltrantes aumentou de 11,2% para 31,4% após o tratamento, e foi estatisticamente diferente após o teste Wilcoxon entre as coletas pré e pós quimioterapia (p<0,001).

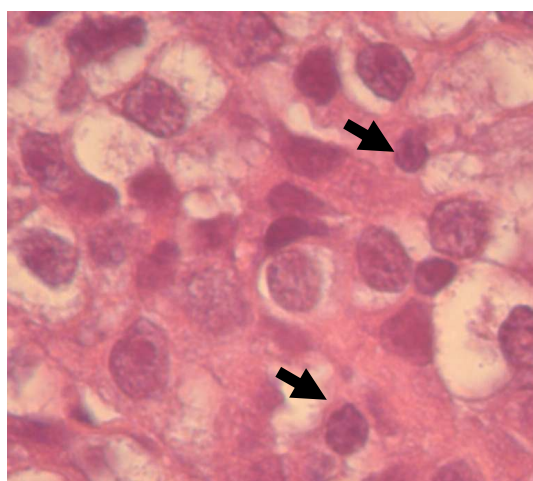


Figura 21- Linfócitos infiltrantes (setas), HE, aumento 1000X.

4.6 Panorama Geral do Remodelamento

Tabela 7: Panorama das Alterações Celulares pós tratamento com sulfato de vincristina.

Variáveis	Citologia Núcleo	Histologia Citoplasma – Tubulina
Tamanho	↓	↓ agrupamentos Grandes
IOD / OD=soma dos níveis de cinza	↓	↓
“Cluster Shade”	↓	↑
Entropia	-	↓
Energia	-	↑
Homogeneidade e Segundo Momento Angular	-	↑
Dimensão Fractal	-	↓
“Goodness of fit”	↑	↑
↑ - aumento; ↓ - diminuição; “-” não houve diferença significativa		

Tabela 8: Panorama das Alterações Teciduais pós tratamento com sulfato de vincristina.

Alterações Teciduais	Pós Tratamento
Nº núcleos por imagem	↓
Nº de triângulos por imagem	↓
Distância entre os vértices dos triângulos	↑
Menores ângulos	↑
Maiores ângulos	↑
Porcentagem de Mitoses	↑
Porcentagem de Linfócitos	↑
↑ - aumento; ↓ - diminuição	

5- DISCUSSÃO

5.0 Discussão

5.1 Volume da massa tumoral

Quanto à diminuição do volume da massa tumoral de quimioterapia com vincristina, Gonzalez et al. (48) relataram a diminuição de 50% do volume da massa tumoral após 1 semana do tratamento de 16 cães com TVTC, utilizando a dose 0,7 mg/m² de sulfato de vincristina.

No entanto, o resultado da nossa pesquisa demonstrou que, nesse mesmo período de tempo, uma dosagem menor de vincristina (0,025 mg/kg equivalente a 0,5 mg/m²), já empregada pela grande maioria dos autores, é suficiente para uma maior diminuição do volume da massa tumoral.

Marino et al. (44) também haviam relatado que o tratamento quinzenal com a mesma dose de sulfato de vincristina poderia ser suficiente para a remissão completa do TVTC nos casos em que não houvesse possibilidade do tratamento semanal, no entanto não apresentaram o estudo comparativo da porcentagem de redução do volume da massa tumoral após 1 dose do tratamento, como fizemos.

5.2 Análise Sintática Estrutural

Quanto ao remodelamento ocorrido em nível tecidual, nossa pesquisa revelou que o número de núcleos marcados por imagem para o cálculo da análise sintática estrutural diminuiu 40% após o tratamento.

Observamos que parâmetros da análise sintática estrutural foram modificados. Houve a diminuição do número de triângulos de Delaunay, o aumento da distância entre os vértices dos triângulos de Delaunay e o aumento dos ângulos menores e maiores dos triângulos formados.

Tal panorama de alterações nos leva à conclusão de que a densidade populacional das células do TVTC diminuiu no tecido após uma dose do tratamento, já que os núcleos diminuíram em número e ficaram mais distantes entre si. Esses resultados estão de acordo com o exposto por Nak et al. (42), em que o número de células tumorais características do TVTC diminuiu, drasticamente, utilizando-se a técnica “swab” após cada semana de tratamento.

A análise da estrutura sintática é uma ferramenta objetiva que vem sendo utilizada com sucesso, tanto como método auxiliar no diagnóstico diferencial (89,94,103), como para avaliar a agressividade de tumores (65,104,105); e, no nosso caso, ela foi capaz de revelar, de modo objetivo, o remodelamento ocorrido em nível tecidual com o tratamento do TVTC.

5.3 Células linfocitárias, Mitoses e PCNA

Em nosso trabalho, encontramos aumento significativo de 24,81% na porcentagem dos linfócitos infiltrantes após o tratamento do TVTC. Esse achado está de acordo com Gonzales et al. (48) e Mukaratirwa et al. (28) que também encontraram aumento significativo nos linfócitos infiltrantes da massa tumoral do TVTC na fase regressiva.

Enquanto, no estudo de Chu et al. (4), o número de figuras mitóticas foi muito inferior na fase regressiva; em nosso estudo não constatamos diferença significativa na porcentagem de mitoses pré e pós tratamento quimioterápico. Convém ressaltar que os resultados descritos por Chu et al. (4) foram obtidos a partir da transplantação do TVTC no subcutâneo de cães saudáveis, em condições experimentais; diferentemente dos nossos resultados, os quais foram observados a partir de tumores naturalmente ocorridos.

Madewell (106) revisou a literatura veterinária quanto aos marcadores de proliferação celular e pode observar que a marcação do PCNA foi útil como ferramenta prognóstica em tumores mamários caninos e felinos, em meningiomas caninos, em carcinomas de células escamosas de felinos e equinos e em carcinomas perioculares de eqüinos; enquanto, não se mostrou útil em prever o comportamento dos linfomas em caninos, felinos e equinos.

Rhind (107) relatou que os resultados da marcação do PCNA em tumores caninos apresentaram variações e que esse anticorpo foi utilizado com sucesso em mastocitomas caninos, enquanto, em tumores melanocíticos, não apresentou bons resultados.

O PCNA apresentou moderada marcação em nosso trabalho sendo possível quantificá-la em 21 pares. E não observamos diferenças estatisticamente significantes na porcentagem de células marcadas pré e pós tratamento.

Chu et al. (4) encontraram alta porcentagem de células PCNA positivas na fase progressiva do TVTC, utilizando o mesmo clone (PCNA, PC-10, Dako®) de nossa pesquisa; porém não informaram, a diluição do marcador que empregaram.

Mesmo tendo somente 21 pares em que houve marcação adequada do PCNA, a amostragem seria suficiente para a detecção de diferença relevante entre os grupos, caso ela existisse, já que utilizamos o Teste T pareado, no qual o número de elementos por grupo é consideravelmente menor, quando comparado aos testes estatísticos não pareados.

Ainda, quanto aos resultados obtidos na porcentagem de mitoses e marcação do PCNA, não podemos deixar de considerar as alterações do metabolismo e da atividade proliferativa das células neoplásicas durante o período de 1 semana após a infusão da quimioterapia que antecedeu a segunda biópsia.

5.4 Alterações Nucleares

5.4.1 Análise quantitativa – Microscopia óptica

A análise computadorizada de imagens de núcleos contribui muito para o diagnóstico diferencial e a avaliação do prognóstico na patologia humana (82,83, 108-113). Isso também é válido na patologia veterinária (100,101,114,115-120).

Waldemarin et al. (55) observaram diferença significativa entre a área e o perímetro dos núcleos do TVTC, histiocitoma e mastocitoma.

Observamos que os núcleos das células do TVTC ficaram menores após o tratamento realizado por nós. Em células tumorais mais agressivas, outros pesquisadores encontraram núcleos com valores mais elevados na área, no perímetro e no diâmetro (101,121).

A densidade óptica integrada (IOD) determina de modo quantitativo a absorção de luz, ou seja, ela mede a absorbância em determinada área (122).

West et al. (123) relataram que a variável IOD foi diferente entre adenocarcinoma “in situ” e o adenocarcinoma invasivo da cérvix.

Na literatura internacional consulta não encontramos estudos comparativos da IOD pré e pós tratamento. Após a quimioterapia, a IOD do núcleo do TVTC diminuiu, portanto, os núcleos ficaram mais escuros, já que foram atribuídos aos níveis de cinza da imagem os valores 0 para a transmitância 0% e 255 para a transmitância 100 %.

A textura nuclear avaliada pelo cálculo das variáveis da matriz de co-ocorrência nos revelou que a tonalidade dos agrupamentos (“cluster shade”) encontrados no núcleo diminuiu.

Ainda quanto ao núcleo, a variável “goodness of fit” aumentou. Na dissertação de Valladão (45), a análise Cox multivariada demonstrou que a área nuclear, o “goodness of fit” e a época do ano de início do tratamento são variáveis que, independentemente, prevêm o sucesso da terapia com sulfato de vincristina em cães com TVTC.

Ferro et al. (82) observaram que pacientes humanos com mieloma múltiplo apresentando núcleos de células tumorais com valores menores de “goodness of fit” demonstraram um pior prognóstico de sobrevida. Tal resultado também foi encontrado em pacientes humanos com leucemia linfoblástica aguda (113).

A arquitetura fractal é hábil em diferenciar a heterocromatina da eucromatina. A eucromatina apresenta maior dimensão fractal e superfície descrita como mais áspera. Quanto menor a dimensão fractal da heterocromatina mais suavidade é relatada. Tumores que apresentam rearranjo mais complexo da

cromatina, nos quais há mistura de regiões de cromatina de diferentes densidades (claras e escuras) têm prognóstico pior. Tal rearranjo equivale a uma maior dimensão fractal na análise de imagem computadorizada (124).

Diante das mudanças encontradas na textura nuclear do TVTC pós tratamento, sugerimos que tais alterações refiram-se a uma diminuição da agressividade do tumor.

5.4.2 Análise quantitativa - Ultraestrutura

Das amostras coletadas de TVTC para a análise ultraestrutural, 25 casos pré quimioterapia apresentaram células tumorais adequadas à aquisição de imagens; porém, na coleta realizada pós quimioterapia, somente 7 casos (aumento de 7000 X) continham células tumorais nas amostras. A ação do quimioterápico diminuiu a densidade de células tumorais na massa. Além disso, o número reduzido de células tumorais nas amostras da microscopia eletrônica deveu-se também a espessura dos cortes, que são ultrafinos.

Devido à pequena amostra pareada, houve uma redução imensa do poder estatístico. A fim de compensar essa perda, definimos excepcionalmente o limiar para o nível de significância como 0,10. Então consideramos que as variáveis energia, segundo momento diagonal e dimensão fractal tiveram diferenças significantes ($p < 0,10$), quando comparadas pré e pós tratamento.

O segundo momento angular e a energia avaliam a homogeneidade do núcleo e ambas variáveis aumentaram após o tratamento na imagem nuclear obtida da microscopia eletrônica. Houve, portanto, aumento da homogeneidade entre os tons de cinza da imagem. No entanto, a dimensão fractal aumentou após

o tratamento, o que pode significar maior variação dos eventos e menor organização, embora os tons de cinza estejam mais homogêneos.

5.5 Alterações Citoplasmáticas

5.5.1 Tubulina

Segundo Bernard-Marty et al. (125), os microtúbulos são compostos de heterodímeros de tubulina (uma molécula alfa e uma beta) além de proteínas associadas (MTAPs). Todos os microtúbulos contêm diferentes proporções de isotipos e se ligam a uma grande variedade de MTAPs. São identificados 8 isotipos de beta tubulina. O isotipo II (125) e o isotipo III têm sido investigados amplamente quanto ao seu potencial preditivo da resposta ao tratamento (126-133). Quanto à alfa tubulina, não encontramos, na literatura consultada, trabalhos que avaliem o remodelamento celular após o uso de agentes quimioterápicos ou seu potencial preditivo da resposta ao tratamento quimioterápico.

Neste trabalho, mensuramos computacionalmente a marcação da tubulina no citoplasma em relação aos agrupamentos formados. Foram chamados de componentes pequenos os agrupamentos que possuíam tamanho de 25 “pixels” ou menos. Foram chamados componentes grandes os agrupamentos acima de 25 “pixels” e abaixo do limiar 128 “pixels”. O componente total compreendeu toda a área pigmentada da imagem, excluindo somente o nível de cinza 255 (branco).

5.5.2 Morfometria clássica

O número de componentes pequenos (784,32 - 680,65) e o número total de componentes (870,03 - 773,24), a área dos componentes grandes (2027,77 μm^2 - 1535,95 μm^2) e a área total dos componentes (2032,24 μm^2 - 1540,1 μm^2), além do tamanho da área dos componentes grandes (32,91 μm^2 - 18,66 μm^2) e tamanho da área total dos componentes (2,22 μm^2 - 1,71 μm^2) marcados com tubulina diminuíram significativamente após a primeira dose do tratamento.

Ao observar o número de agrupamentos pequenos e totais, notamos que o número de agrupamentos grandes foi menos numeroso e não mudou significativamente após o tratamento. No entanto, os componentes grandes, apesar de não mudarem em número após o tratamento, tiveram seus tamanhos diminuídos significativamente. Portanto, é provável que eles tenham sido fragmentados e diminuídos, passando a compor o agrupamento pequeno após o tratamento. Esses agrupamentos grandes de tubulina tiveram sua área média diminuída de 32,91 μm^2 para 18,66 μm^2 após o tratamento.

Tais resultados apontam para a ação de ruptura dos microtúbulos, provocada pela vincristina, levando-os à fragmentação, como descreve a literatura consultada (37-39, 49-51).

5.5.3 Textura

Na análise da textura das áreas marcadas pela tubulina, encontramos a tonalidade dos agrupamentos (“cluster shade”) aumentada após o tratamento.

A soma de todos os níveis de cinza dos componentes grande e total (correspondentes à densidade óptica) diminuiu após a quimioterapia, revelando que as áreas marcadas pela tubulina ficaram mais escuras.

Tanto a homogeneidade quanto o segundo momento angular aumentaram e ambos revelam maior homogeneidade entre os tons de cinza da marcação no citoplasma.

Outras variáveis que avaliam a organização da textura são energia e entropia. A energia aumentou nas áreas de tubulina das imagens, o que também indica maior uniformidade dos eventos. A entropia diminuiu após a quimioterapia e ela nos fornece dados da dispersão dos níveis de cinza, portanto é mais um indicativo de que houve menor alternância entre os tons de cinza após o tratamento.

Assim como no núcleo, na área marcada pela tubulina, observamos que houve diminuição da dimensão fractal e aumento da organização nessas áreas, pois a variável “goodness of fit” aumentou.

A marcação imuno-histoquímica tem importante papel no diagnóstico de diversos tumores (134). No entanto, a avaliação e mensuração da marcação imuno-histoquímica são bastante subjetivas e nem sempre exequíveis. A mensuração com o uso de ferramentas computacionais avalia objetivamente essas marcações.

Ferreira (135) comparou marcadores imuno-histoquímicos nucleares em lesões foliculares da tireóide de humanos e tanto a variável derivada da matriz de co-ocorrência (energia) quanto o grau de aproximação da dimensão fractal (“goodness of fit”) demonstraram diferenças entre as lesões benignas e malignas.

Não encontramos, na literatura consultada, trabalhos que tenham avaliado a textura da marcação de tubulina nas células tumorais.

Após o uso do quimioterápico sulfato de vincristina nas células do TVTC, observamos quanto à tubulina que as áreas marcadas diminuíram em número e tamanho, além de apresentarem imagens mais absortíveis, com menor variação entre a tonalidade da marcação e maior organização.

Encontramos correlação significativa entre a diminuição da massa tumoral e as variáveis significantes da tubulina, o que nos leva a crer que exista relação entre a regressão do tumor e as alterações observadas nos microtúbulos.

No citoplasma das células do TVTC, encontramos alta correlação entre as variáveis da morfometria nuclear da citologia e as alterações da tubulina. Segundo Bloom (136), os microtúbulos estão relacionados com a cromatina. Histonas desacetiladas podem transitar da cromatina para o microtúbulo (136). Essas observações de Bloom (136) podem explicar o fato de termos encontrado alterações tanto na cromatina quanto na tubulina.

5.6 Perspectivas futuras

O remodelamento descrito em nosso trabalho, no núcleo das células do TVTC e na tubulina presente no citoplasma, abre caminho para diversas novas pesquisas. Tais alterações podem ser futuramente avaliadas como ferramentas prognósticas da sobrevida dos animais e ou como ferramentas preditivas da resposta ao tratamento.

A classificação dos tumores conforme os 3 tipos citomorfológicos poderá ser feita, comparada com os dados morfométricos e incluída eventualmente em estudos prognósticos.

Pesquisas com outros marcadores imuno-histoquímicos como os da proliferação (AgNOR, Ki-67), da apoptose (BCI-2, BCL-X), de componentes do estroma e de componentes da matriz extracelular (vimentina, “tenascin”, “hialuronan”), da imunidade celular (NK, Linfócitos T citotóxicos) e de antígenos de histocompatibilidade (MHC) poderão complementar os resultados obtidos e elucidar o papel desses na regressão do tumor e na resistência ao agente quimioterápico.

6- CONCLUSÃO

6.0 Conclusão

Após uma semana da quimioterapia com sulfato de vincristina, há redução do tamanho do tumor, da densidade celular, e remodelamento do núcleo e da estrutura da tubulina no citoplasma.

A intensidade das alterações da tubulina acompanha as alterações do núcleo e do volume da massa tumoral.

A porcentagem de linfócitos infiltrando a massa tumoral aumentou após o tratamento.

A porcentagem de mitoses e a marcação imuno-histoquímica do antígeno de proliferação celular (PCNA) não mostraram alterações após 1 dose de tratamento.

As alterações encontradas na textura dos núcleos após o tratamento são semelhantes às encontradas em tumores com menor agressividade.

O tratamento com sulfato de vincristina induziu à diminuição da quantidade de tubulina presente no citoplasma.

As alterações observadas no núcleo e na tubulina somente puderam ser detectadas e descritas por meio da análise computacional das imagens digitalizadas.

Trabalhos futuros poderão elucidar se o remodelamento ocorrido no núcleo e na tubulina têm influência na resposta ao tratamento quimioterápico e ou na sobrevida dos animais tratados.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.0 Referências Bibliográficas

- 1- Cohen, D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. Adv Cancer Res. 1985; 43: 75-112.
- 2 - Das U, Das AK. Review of canine transmissible venereal sarcoma. Veterinary Res Comm 2000; 24: 545-56.
- 3 - Kennedy PC, Cullen JM, Edwards JF, et al. Histological Classification of Tumors of the Genital Systems of Domestic Animals. World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. 2. ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1998, 23-38.
- 4 - Chu RM, Lin CY, Liu CC, Yang SY, Hsiao YW, Hung SW, et al. Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. Anticancer Research 2001; 21: 4017-24.
- 5 - Theilen GH, Madwell BR. Veterinary Cancer Medicine. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987. p. 108-303.
- 6 - Harmelin A, Zuckerman A, Nysha A. Correlation of Ag-NOR protein measurements with prognosis in canine transmissible venereal tumour. J Comp Pathol 1995; 112(4):429-33.
- 7 - Weber, W. T.; Nowell, P. C.; Hare, W. C. D. Chromosome studies of a transplanted and a primary canine transmissible venereal sarcoma. J. of the National Cancer Institute. 1965; 35(3), 537-541.
- 8 - Barski, G.; Cornefert-Jensen. Cytogenetic study of Stiker venereal sarcoma in European dogs. J. of the National Cancer Institute. 1966; 37(6), 787-797.

9 - VonHoldt BM, Ostrander EA. The Singular history of a cancer transmissible tumor.

Cell 2006; 126: 445-7.

10 - Amariglio EN, Hakim I, Brok-Simoni F, Grossman Z, Katzir N, Harmelin A, Ramot B, Rechavi G. Identity of rearranged LINE/c-MYC junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88(18):8136-9.

11 - Murgia C, Pritchard JK, KIM SY, Fassati A, Weiss RA. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. Cell 2006; 126: 477-87.

12 - Fonseca, L. S. Tumor Venéreo Transmissível Espontâneo Canino: A inserção do transposon Line-1 no gene c-myc e os critérios de malignidade. Dissertação apresentada à FMVZ da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, 2009.

13 - Rebbeck CA, Thomas R, Breen M, Leroi AM, Burt A. Origins and evolution of a transmissible cancer. Evolution. 2009; 63(9):2340-9.

14 - Calvert, C. A., Transmissible venereal tumor in the dog. In: KIRK R. W. Current veterinary therapy VIII. Philadelphia WB Saunders Co, 1983; 413-415.

15 - Withrow, S. J., Mac-Ewen, E. G. Small animal clinical oncology. 2 ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1996.

16 - Amaral AS, Gaspar LFJ, Silva SB, Rocha NS. Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003). Rev Portuguesa de Ciências Veterinárias. 2004; 99 (551): 167-71.

17 - Amaral, A. S.; Bassani-Silva, S.; Ferreira, I; Fonseca, L. S.; Andrade, F. H. E.; Gaspar, L. F. J.; Rocha, N. S. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal. Rev Portuguesa de Ciências Veterinárias, 2007; 102 (563-564) 253-260.

18 - Dabus DMM, Tentrin TC, Bocardo M, Lima GS, Lot RFE, Bariani MH, Rocha NS (2008). Estudo epidemiológico do tumor venéreo transmissível nos padrões plasmocitóide e linfocitóide em cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, 11, 1-7.

19 – Gaspar, LFJ; Amaral, AS; Bassani-Silva, S; Rocha, NS. Imunorreatividade à Glicoproteína-P nos diferentes tipos citomorfológicos de Tumor Venéreo Transmissível Canino. 35 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Conbravet ano: 2008, Gramado, RS. Anais do 35 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária resumo 0681-3.

20 - Harmelin A, Pinthus JH, Friedmann-Morvinski D, Kaufman K, Brenner O. Lack of MHC expression and retention of ultrastructural characteristics by xenograft transmissible venereal tumor cells in SCID mice. Vet Immunology and Immunopathology 2002, 86: 245-9.

21 - Marchal T, Chabanne L, Kaplanski C, Rigal D, Magnol JP. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. Vet Immunol and Immunopathol 1997, 57(1-2):1-11.

22 - Mozos E, Mendez A, Gomez-Villamandos JC, Martin De Las Mulas J, Perez J. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. Vet Pathol 1996, 33: 257-63.

23 - Higgins, D. A. Observations on canine transmissible venereal tumour as seen in the Bahamas. *Veterinary Record*. 1966; 79, 67-71.

24 - Gaspar LFJ. Características Citomorfológicas do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com os danos citogenéticos, taxa de proliferação e resposta clínica à quimioterapia (Tese Doutorado). Botucatu (SP) Universidade Estadual Paulista, 2005.

25 - Liao K, Hung S, Hsiao Y, Benett M, Chu R. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule (s) specifically toxic B cells. *Vet Immun Immunopath* 2003; 92: 149-62.

26 - Hsiao YW, Liao KW, Hung SW, Chu RM. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet. Immunol. Immunopathol* 2002; 87(1-2): 19-27.

27 - Mukaratirwa S, Chimonyo M, Obwolo M, Gruys E, Nederbragt H. Stromal cells and extracellular matrix components in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Histol Histopathol* 2004; 19: 1117-23.

28 - Mukaratirwa S., Chiwome T., Chitanga S., Bhebhe E. Canine transmissible venereal tumour: assessment of mast cell numbers as indicators of the growth phase. *Vet Res Commun*. 2006 Aug;30(6):613-21.

29 - Chou P. C., Chuang T. F., Jan T. R., Gion H. C., Huang Y. C., Lei H. J., Chen W. Y., Chu R. M. Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009 Jul 15;130(1-2):25-34.

30 – Mukaratirwa S. Prognostic and predictive markers in canine tumours: rationale and relevance. A review. *Vet Q*. 2005 Jun;27(2):52-64.

- 31 – Santos, F. G. A.; Guedes, R. M. C.; Cassali, G. D.; Mejia, G. E. G.; Vasconcelos, A. C. Caracterização e quantificação de regiões organizadoras de nucléolos coradas pela prata (AgNORs) em tumor venéreo transmissível canino, genital e extragenital. *Arq. Bras. Med. Vet Zootec* 1998; 50: 665-672.
- 32 - Chuang, T.; Lee, S.; Liao, K.; Hsiao, Y.; Lo, C.; Chiang, B.; Lin, X.; Tao, M.; Chu, R. Eletroporation-mediated IL-12 gene therapy in a transplanted canine cancer model. *Int J Cancer* 2009; 125: 698-707
- 33 – Hsiao, Y. W.; Liao, K. W.; Chung, T. F.; Liu, C. H.; Hsiu, C. D.; Chu, R. M. Interactions of host IL-6 and IFN-gama and cancer-derived TGF-beta1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *Cancer Ummunol Immunother* 2008; 57: 1091-1104.
- 34 - Lin, C.; Chuang, T.; Liao, K.; Huang, Y.; Pai, C.; Chu, R. Combined immunogene therapy of IL-6 and IL-15 enhances anti-tumor activity through augmented NK cytotoxicity. *Cancer Letters* 2008; 272: 285-295.
- 35 - Rogers KS, Walker AM, Dillon HB. Transmissible venereal tumor: a retorspective study of 29 cases. *J of the Am An Hosp Assoc* 1998; 34: 463-70.
- 36 - Thrall, D. E. Orthovoltage radiotherapy of canine transmissible venereal tumor. *Veterinary Radiology* 1982; 23(5): 217-219.
- 37 - Rosenthal RC. Clinical Applications of Vinca Alkaloids. *J Am Vet Med Assoc* 1981; 179(11):1084-6.
- 38 - Golden DL, Langston VC. Uses of vincristine and vinblastine in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 193:1114-7.

- 39 - Hahn KA, Richardson RC. Cancer Chemotherapy – A Veterinary Handbook. Baltimore: Ed. Williams & Wilkins;1995. p. 124-5.
- 40 - Camacho, A. A., Laus, J. L. Estudo sobre a eficiência da vincristina no tratamento de cães com tumor venéreo transmissível. *Ars Veterinária*; 1987 3(1):37-42.
- 41 - MacEwen, E. G. Miscellaneous Tumors In: Whithrow S. J., MacEwen E. G. *Small Animal Clinical Oncology*. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1996. p. 533-7.
- 42 - Nak D, Nak Y, Cangul IT, Tuna, B. Clinico-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2005; 52(7):366-70.
- 43 - Calvert, C. A.; Leifer, C. E., MacEwen, E. G. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. *J Am Vet Med Assoc*; 1982, 181:163-164.
- 44 - Marino, G; Barna, A; Quartuccio, M; Cristarella, S; Ajello, A; Zanghi, A. Alternative vincristine treatment in dogs with transmissible venereal tumour. *Veterinária*, 2008: 22(4), 13-18.
- 45 - Valladão, M. L. C. R. Dados clínicos, morfometria e textura nuclear como fatores prognósticos e preditivos no tumor venéreo transmissível canino. (Dissertação) Campinas (SP): UNICAMP; 2007.
- 46 - Valladão, M. L., Scarpelli, K. C. Metze, K. Clinical utility of a life quality score in dogs with canine transmissible venereal tumor treated by vincristine chemotherapy. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2010, 62 (5): 1086-1093.

47 - Scarpelli K. C., Valladão M. L., Metze K. Predictive factors for the regression of canine transmissible venereal tumor during vincristine therapy. *Vet J.* 2010 183(3):362-3.

48 - Gonzalez CM, Griffey SM, Naydan DK, Flores E, Cepeda R, Cattaneo G, et al. Canine Transmissible venereal tumour: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. *J Comp Path* 2000; 122:241-8.

49 - Huff L. M., Sackett D. L., Poruchynsky M. S., Fojo T. Microtubule-disrupting chemotherapeutics result in enhanced proteasome-mediated degradation and disappearance of tubulin in neural cells. *Cancer Res.* 2010 Jul 15;70(14):5870-9.

50 - Mollinedo F, Gajate C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis.* 2003; 8(5):413-50.

51 - Cheung C. H., Chen H. H., Kuo C. C., Chang C. Y., Coumar M. S., Hsieh H. P., Chang J. Y. Survivin counteracts the therapeutic effect of microtubule destabilizers by stabilizing tubulin polymers. *Mol Cancer.* 2009; 3;8:43.

52 - Elston L. B., Sueiro F. A., Cavalcanti J. N., Metze K. The importance of the mitotic index as a prognostic factor for survival of canine cutaneous mast cell tumors: a validation study. *Vet Pathol.* 2009; 46(2):362-4, author reply 364-5.

53 - Seki, N.; Yassin, M. A.; Cuevas, L. E.; Bailey, J. W.; Squire, S. B.; Ramsay, A. Short communication: Color vision and proficiency in diagnostic microscopy. *Tropical Medicine and International Health*, 10(5):433-4, 2005

54 - Glaessgen, A.; Hamberg, H.; Pihl, C. G., Sundelin, B.; Nilsson, B.; Egevad, L. Interobserver reproducibility of Modified Gleason Score in Radical Prostatectomy Specimens. *Virchows Archives*, 445: 17-21, 2004.

- 55 - Waldemarin KCA, Beletti ME, Costa LF. Nuclear morphometry of neoplastic cells as a method for diagnosis of histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumor in dogs. *Real-Time Imaging* 2004; 10: 197-204.
- 56 - Vuurpijl, L., Schomaker, L, Broek, E. L. van den. Using the user through cooperative annotation. In S. N. Srihari and M. Cheriet, editors, *Proceedings of the Eighth IEEE International Workshop on Frontiers in Handwriting Recognition*, pag 221-226, Ontario, Canada, 2002.
- 57 - Adam RL, Ribeiro E, Metze K, Leite NJ, Lorand-Metze I. Morphometric and granulometric features of erythroblasts as a diagnostic tool of hematologic diseases. *Cytometry Part A* 2004; 59:46.
- 58 - Ferreira RC, de Matos PS, Adam RL, Leite NJ, Metze K. Application of the Minkowski-Bouligand fractal dimension for the differential diagnosis of thyroid follicular neoplasias. *Cellular Oncology* 2006; 28: 331-3.
- 59 - Adam RL, Silva RC, Pereira FG, Leite NJ, Lorand-Metze I, Metze K. The Fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Cell Oncol* 2006; 28:55-9.
- 60 - Felisbino, M. B.; Tamashiro Wiwia, M. S. C.; Mello, M. L. S. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *Plos One*. 2011; 6(12): e29144.
- 61 - Darro F., Kruczynski A., Etievant C., Martinez J., Pasteels J. L., Kiss R. Characterization of the differentiation of human colorectal cancer cell lines by means of Voronoi diagrams. *Cytometry*. 1993;14(7):783-92.

62 - Numahara, T.; Tanemura, M.; Nakagawa, T.; Takaiwa, T. Spatial Data Analysis by Epidermal Langerhans Cells Reveals an Elegant System. *Journal of Dermatological Science*, 25: 219-28, 2001.

63 - Guillaud, M.; Matthews, J.B.; Harrison, A.; Macaulay, C.; Skov, K. A Novel Image Cytometric Method for Quantitation of Immunohistochemical Staining of Cytoplasmic Antigens. *Analytical Cellular Pathology*, 14:87099, 1997.

64 – Scarpelli, K. C. Variáveis derivadas da análise da estrutura sintática e dados clínicos como fatores preditivos em tumor venéreo transmissível canino com terapia de vincristina (Dissertação) Campinas (SP): UNICAMP, 2008.

65 - Matos M, Raby B N, Zahm J M, Polette M, Birembaut P, Bonnet N. Cell migration and proliferation are not discriminatory factors in the in vitro sociologic behavior of bronchial epithelial cell lines. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2002; 53: 53-65.

66 - Geusebroek J. M., Cornelissen F., Smeulders A. W., Geerts H. Robust autofocusing in microscopy. *Cytometry*. 2000; 1;39(1):1-9.

67 - Gonzales, R. C., Woods, R. E. Digital image processing. PrenticeHall, Inc. New Jersey, 2nd edition, 2002.

68 - Bovik A. C., Clarke, M., Geisler, W. S. Multichannel texture analysis using localized spatial filters. *TransPAMI*, 12:55-73, 1990.

69 - Haralick RM, Shanmugan K, Dinstein I. Texture features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 1973; 3: 610-21.

70 - Broek E. L. van den, Hendriks, M. A., Puts, M. J. H., Vuurpijl, L. G. Modeling human color categorization: Color discrimination and color memory. In T. Heskes,

P. Lucas, L. Vuurpijl and W Wiegerinck, editors, Proceedings of the 15th Belgium-Netherlands Artificial Intelligence Conference, pag 59-68. SNN, Radboud University Nijmegen, 2003.

71 - Rikxoort Eva M van. Texture analysis [Graduate research proposal in AI] Supervision Broek, Egon L van den. Cognitive Engineering department of the NICI Institute, UK, 2004.

72 - Adam RL. Análise espectral usando a Transformada de Fourier Discreta para o estudo de núcleos celulares: Elaboração de Programa e aplicação no desenvolvimento do coração. (Dissertação). Campinas (SP):Universidade Estadual de Campinas; 2002.

73 - Doudkine A, Macaulay C, Poulin N, Palcic B. Nuclear texture measurements in image cytometry. Pathologica 1995; 87: 286-99.

74 - Losa GA. Fractals in pathology: are they really useful? Pathologica 1995; 87: 310-6.

75 - Metze K, Piazza AC, Iaza AA, Adam RL, Leite NJ. Texture analysis of AgNOR stained nuclei in lung cancer. Cell Oncol 2005; 27:137-8.

76 - Metze K, Silva RC, Adam RL, Leite NJ, Pereira FG, Lorand-Metze I. Relation between chromatin texture and phenotype in acute leukemias. Cell Oncol 2005; 27:112-3.

77 - Simeonov R, Simeonova G. Fractal dimension of canine mammary gland epithelial tumors on cytologic smears. Vet Clin. Pathol 2006; 35(4): 446-8.

78 - Kayser K., Görtler J., Bogovac M., Bogovac A., Goldmann T., Vollmer E., Kayser G. AI (artificial intelligence) in histopathology--from image analysis to automated diagnosis. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009;47(3):355-61.

79 - Mello, M. L. S.; Russo, P.; Russo, J.; Vidal, B. C. Entropy of Feulgen-stained 17- β -estradiol-transformed human breast epithelial cells as assessed by restriction enzymes and image analysis. *Oncology Reports.* 2009. 21: 1484-1487.

80 - Simeonov R, Simeonova G. Computerized morphometry of mesn nuclear diameter and nuclear roundness in canine mammary gland tumors on cytologic smears. *Vet Clin. Pathol* 2006; 35(1): 88-90.

81 - Karslioğlu Y., Günal A., Kurt B., Ongürü O., Ozcan A. Fractal dimension of microvasculature in renal oncocytomas and chromophobe renal cell carcinomas. *Pathol Res Pract.* 2009; 205(10):677-81. Epub 2009 Apr 10.

82 - Ferro D. P., Falconi M. A., Adam R. L., Ortega M. M., Lima C. P., de Souza C. A., Lorand-Metze I., Metze K. Fractal characteristics of May-Grünwald-Giemsa stained chromatin are independent prognostic factors for survival in multiple myeloma. *PLoS One.* 2011;6(6):e20706. Epub 2011 Jun 16.

83 - Bedin V, Adam RL, de Sá BC, Landman G, Metze K. Fractal dimension of chromatin is an independent prognostic factor for survival in melanoma. *BMC Cancer.* 2010; 5;10:260.

84 - Tambasco M, Eliasziw M, Magliocco AM. Morphologic complexity of epithelial architecture for predicting invasive breast cancer survival. *J Transl Med.* 2010; 31;8:140.

85 - Goutzanis L, Papadogeorgakis N, Pavlopoulos PM, Katti K, Petsinis V, Plochoras I, Pantelidaki C, Kavantzias N, Patsouris E, Alexandridis C. Nuclear

fractal dimension as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2008; 44(4):345-53. Epub 2007 Aug 9.

86 - Delides A, Panayiotides I, Alegakis A, Kyroudi A, Banis C, Pavlaki A, Helidonis E, Kittas C. Fractal dimension as a prognostic factor for laryngeal carcinoma. Anticancer Res. 2005 May-Jun;25(3B):2141-4.

87 – Sanchez, I.; Uzcátegui, G. Fractals in dentistry. J Dent 2011; 39: 273-292.

87 – Cafá. Árvore Fractal Blogs da Ciência página 4743. Acesso em 20 de dezembro 2011. Disponível em URL: www.divulgarciencia.com/2008/12/30/bonita-arvore-fractal.

89 - Bigras G, Marcepoil R, Brambilla E, Brugal G. Cellular sociology applied to neuroendocrine tumors of the lung: quantitative model of neoplastic architecture. Cytometry. 1996; 24: 74 – 82.

90 - Sudbo J, Bankfalv A, Bryne M, Marcepoil R, Boysen M, Piffko J, Hemmer J, Kraft K, Reith A. Prognostic value of graph theory-based tissue architecture analysis in carcinomas of the tongue. Lab Invest. 2000; 80 (12):1881-9.

91 – Duyckaerts C, Godefroy G. Voronoi Tessellation to study the numerical density and the spatial distribution of neurons. Jchemneu. 2000; 20: 83-92.

92 - Meijer G A, Belien JAM, van Diest PJ, Baak JPA. Image analysis in clinical pathology. J Clin Pathol. 1997; 50: 365-70.

93- Van Laerhoven, K. Delaunay. Acesso em 10 de março de 2012. Disponível em URL: <http://www.comp.lancs.ac.uk/~kristof/research/notes/voronoi>.

94 - Weyn B, Wouwer G, Kumar-Singh S, Daele A, Scheunders P, Marck E, Jacob W. Computerassisted differential diagnosis of malignant mesothelioma based on syntactic structure analysis. *Cytometry*. 1999; 35: 23-9.

95 - Palmer, J. E.; Cassia, L. J. S.; Irwin, C. J.; Morris, A. G.; Janssen, E. A. M.; Baak, J. P. et al. The prognostic and predictive value of syntactic analysis in serous carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Pathology* 2008; 27(2): 191-198.

96 - Furness, P. N. The use of digital images in pathology. *J Pathol*. 1997 Nov;183(3):253-63. Review.

97 - Chieco P., Bertaccini A., Giovannini C., Stecca B. A., Martorana G. Telomerase activity in touch-imprint cell preparations from fresh prostate needle biopsy specimens. *Eur Urol*. 2001; 40(6):666-72.

98 - Guzman M., Judkins A. R. Digital pathology: a tool for 21st century neuropathology. *Brain Pathol*. 2009;19(2):305-16.

99 - Gabriel MY, Yousef GM. Informatics for practicing anatomical pathologists: marking a new era in pathology practice. *Mod Pathol*. 2010; 23(3):349-58. Epub 2010 Jan 15.

100 - De Vico, G.; Sfacteria, A.; Maiolino, P.; Mazzullo, G Comparison of nuclear morphometric parameters in cytologic smears and histologic sections of spontaneous canine tumors. *Veterinary Clinical Pathology*. 31(1): 16-8, 2002.

101 - Simeonov R., Simeonova G. Computer-assisted nuclear morphometry in the cytological evaluation of canine perianal adenocarcinomas. *J Comp Pathol*. 2008; 139(4):226-30. Epub 2008 Sep 25.

102 - Cross, E. M., Chaffin, W. W. Use of the Binomial Theorem in Interpreting Results of Multiple Tests of Significance. Educational and Psychological Measurement. 1982 42: 25-34.

103 - Demir C, Gultekin SH, Yener B. Augmented cell-graphs for automated cancer diagnosis. Bioinformatics. 2005; 21(2): ii7-ii12.

104 - Raby B N, Polette M, Gilles C, Clavel C, Strumane K, Matos M, Zahm J M, Roy V F, Bonnet N, Birembaut P. Quantitative cell dispersion analysis: new test to measure tumor cell aggressiveness. Int. J. Cancer. 2001; 93: 644-52.

105 - Kayser K, Zink S, André S, Schüring M P, Hecker E, Klar E, Bovin N V, Kaltner H, Gabius H J. Primary colorectal carcinomas and their intrapulmonary metastases: Clinical, glyco-immuno- and lectin histochemical, nuclear and syntactic structure analysis with emphasis on correlation with period of occurrence of metastases and survival. APMIS. 2002; 110: 435-46.

106 – Madewell, B. R. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. J Vet Intern Med. 2001;15(4):334-40.

107 – Rhind, S. M. Veterinary oncological pathology--current and future perspectives. Vet J. 2002; 163(1):7-18.

108 - De Andrea CE, Petrilli AS, Jesus-Garcia R, Bleggi-Torres LF, Alves MT. Large and round tumor nuclei in osteosarcoma: good clinical outcome. Int J Clin Exp Pathol. 2011. 30;4(2):169-74.

109 - Rao, S. M.; Sherlin, H. J.; Anujá, N.; Pratibha, R.; Priya, P.; Chandrasekar, T. Morphometry of buccal mucosal cells in fluorosis--a new paradigm. Hum Exp Toxicol. 2011 Nov;30(11):1761-8. Epub 2011 Mar 15.

110 - Mahfouz M., Abdel Fatah E. E., Bowers L. S., Scuderi G. Three-dimensional Morphology of the Knee Reveals Ethnic Differences. Clin Orthop Relat Res. 2012; 470(1):172-85.

111 - Smitha T., Sharada P., Girish H. Morphometry of the basal cell layer of oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma using computer-aided image analysis. J Oral Maxillofac Pathol. 2011; 15(1):26-33.

112 - Baek T., Huh J., Kwak H., Park M., Lee H. Image analytic study of nuclear area in mantle cell lymphoma. Korean J Hematol. 2010 45(3):193-6.

113 – Adam, R. L.; Leite, N. J.; Metze, K. Spectral analysis using discrete Fourier Transformation for the study of nuclei: software design and application on cardiomyocytes during physiological development. Analytical Cellular Pathology 22: 64 – 5 2001

114 - Simeonov R, Simeonova G. Quantitative analysis in canine cutaneous mast cell tumors. Anal Quant Cytol Histol. 2010 Jun;32(3):178-81.

115 – Simeonov R, Simeonova G. Nuclear cytomorphometry in feline mammary gland epithelial tumours. Vet J. 2009 Feb;179(2):296-300. Epub 2007 Oct 23.

116 - De Vico, G.; Cataldi, M.; Carella, F.; Marino, F.; Passantino, A. Histological, histochemical and morphometric changes of splenic melanomacrophage centers (SMMCs) in Sparicotyle-infected cultured sea breams (Sparus aurata). Immunopharmacol Immunotoxicol. 2008; 30(1):27-35.

117 - De Vico G, Maiolino P, Cataldi M, Mazzullo G, Restucci B. Nuclear morphometry in relation to lymph node status in canine mammary carcinomas. Vet Res Commun. 2007; 31(8):1005-11.

118 - Maiolino P, Cataldi M, Paciello O, Restucci B, De Vico G. Nucleomorphometric analysis of canine cutaneous mast cell tumours. J Comp Pathol. 2005;133(2-3): 209-11.

119 - Maiolino P, Restucci B, Papparella S, Paciello O, De Vico G. Correlation of nuclear morphometric features with animal and human World Health Organization International Histological Classifications of canine spontaneous seminomas. Vet Pathol. 2004; 41(6):608-11.

120 - De Vico G, Maiolino P. Prognostic value of nuclear morphometry in feline mammary carcinomas. J Comp Pathol. 1997 Aug;117(2):99-105.

121 – Simeonov R. S., Simeonova G. P. Use of quantitative analysis as a method for differentiation between canine cutaneous apocrine adenomas and apocrine carcinomas on cytological smears. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2007; 54(9):542-4.

122 – Galo, A. L.; Colombo, M. F. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. Quím. Nova. 2009; 32(2): 488-492.

123 – West L. A., Swartz R., Cox D., Boiko I. V., Malpica A., Macaulay C., Follen M. Cytometric features of cell nuclei of adenocarcinoma in situ and invasive adenocarcinoma of the cervix. Am J Obstet Gynecol. 2002; 187(6):1566-73.

124 – Metze, K. Fractal dimension of chromatin and cancer prognosis. Epigenomics. 2010 Oct;2(5):601-4

125 - Bernard-Marty, C.; Treilleux, I.; Dumontet, C.; Cardoso, F.; Fellous, A et al. Microtubule-associated parameters as predictive markers of docetaxel activity in

advanced breast cancer patients: result of a pilot study. *Clinical Breast Cancer*. 2002; 3(5): 341-345.

126 - Ploussard, G.; Terry, S.; Maillé, P.; et al. Class III-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-based chemotherapy. *Cancer Research*. 2010; 70: 9253-9264.

127 - Seve, P; Lai, R; Ding, K, et al. Class III-tubulin expression and benefit from adjuvant cisplatin/vinorelbine chemotherapy in operable non-small cell lung cancer: Analysis of NCIC JBR.10. *Clinical Cancer Research*. 2007; 13: 994-999.

128 - Ferrandina, G.; Zannoni, G.; Martinelli, E. ET al. Class III-tubulin overexpression is a marker of poor clinical outcome in advanced ovarian cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12: 2774-2779.

129 - Dumontet, C.; Isaac, S.; Souquet, P.; Bejui-Thivolet, F.; Pacheco, Y.; et al. Expression of class III β tubulin in non-small cell lung cancer is correlated with resistance to taxane chemotherapy. *Electronic Journal of Oncology*. 2005; 92(2): E25-30.

130 - Mozetti, S.; Ferlini, C.; Concolino, P et al. Class III-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11: 298-305.

131 - Seve, P.; Isaac, S.; Tredan, O. et al. Expression of class III-tubulin is predictive of patient outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving vinorelbine-based chemotherapy. *Clin Cancer Research* 2005; 11: 5481-5486.

132 - Paradiso, A.; Mangia, A.; Chiriatti, A.; Tommasi, S.; Zito, A.; Latorre, A.; Schittulli, F.; Lorusso, V. Biomarkers predictive for clinical efficacy of taxol-based chemotherapy in advanced breast cancer. *Annals of Onc* 2005; 16 (S4) iv14-iv19.

133 - Katsetos, C. D.; Herman, M. M.; Mork, S. J. Class III β -tubulin in human development and cancer. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2003; 55: 77-96.

134 - Jogai S, Adesina AO, Temmim L, Al-Jassar A, Amir T, Amanguno HG. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma -- a cytological study. *Cytopathology*. 2004; 15(4):212-6.

135 – Ferreira, R. C. Contribuição da Análise de textura do núcleo celular para o diagnóstico diferencial de lesões foliculares da tireóide – Comparação com marcadores imunoistoquímicos. (Tese Doutorado) Campinas (SP): UNICAMP; 2007.

136 - Bloom, K. Microtubule composition: Cryptography of dynamic polymers. *PNAS* 2004; 4(101): 6839-6840.

137 - Rasmussen, T. P.; Mastrangelo, M. A.; Eden, A.; Pehrson, J. R.; Jaenisch, R. J Dynamic relocation of histone MacroH2A1 from centrosomes to inactive X chromosomes during X inactivation. *Cell Biol* 2000; 150: 1189-1198.

138 - Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(6): 1409-20.

8- *ANEXOS*

Anexo 1: Escala de Desempenho Karnofsky adaptada para caninos (CKS)

Score	Karnofsky score in human medicine	Karnofsky score adapted for dogs (CKS)
100	Normal, no complaints, no evidence of disease.	Normal activities of daily living (ADL), no clinical evident alterations even with the presence of a small asymptomatic tumor.
90	Able to carry on normal activity: minor symptoms of disease.	Normal ADL, one organ with localized accompanying disease of minor importance.
80	Normal activity with effort: some symptoms of disease.	Normal ADL, two organs with localized accompanying disease of minor importance.
70	Cares for self: unable to carry on normal activity or active work.	At least one organ with accompanying disease of major importance. Mild letargy over baseline (letargy grade 1); normal appetite.
60	Requires occasional assistance but is able to care for needs.	At least one organ with accompanying disease of major importance. Moderate lethargy causing some difficulty with performing ADL (letargy grade 2). Slightly decreased appetite and normal water intake.
50	Requires considerable assistance and frequent medical care.	At least one organ with accompanying disease of major importance. Letargy grade 2. Moderately decreased appetite, normal water intake.
40	Disable: requires special care and assistance.	Severely restricted in ADL. Ambulatory only to the point of performing ADL (letargy grade 3). Severly decreased appetite. Spontaneous water intake slightly reduced, but without clinical signs of dehydration.
30	Severely disabled: hospitalization, death not imminent.	Letargy grade 3. Animal still stands up spontaneously and remains standing for a while; restraint necessary during examinations or therapy. Severly decreased appetite and spontaneous water intake, clinical signs of dehydration.
20	Very sick, hospitalization necessary: active treatment necessary.	Disabled, must be force fed and helped to perform ADL (letargy grade 4). Remaining most of the time in lateral decubitus and stands up only for defecation or urination; slight restraint for examination or treatment still necessary.
10	Moribund, fatal processes progressing rapidly.	Absent ADL, dog remains constantly in lateral decubitus, even during defecation or urination; restraint no longer necessary for examination or treatment, moribund.
0	Death.	Death.

Publicado em: Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2010, 62 (5): 1086-1093.

Anexo 2: Reações Imuno-histoquímicas

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo (São Paulo) por meio do método HRP polimérico livre de biotina. As lâminas foram desparafinadas em estufa a 60°C (24 horas) e então imersas em xilol a 60°C (20 minutos), xilol à temperatura ambiente (20 minutos), etanol a 100% (30 segundos), etanol a 95% (30 segundos), etanol a 70% (30 segundos) e, finalmente, lavadas em água corrente e destilada.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em pressão, com solução tampão citrato 10mM em pH 6.0 pré-fervida (4 minutos após pressurização).

As lâminas foram então lavadas em água corrente e destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado, utilizando-se água oxigenada a 3% em 3 trocas (10 minutos cada) e as lâminas foram novamente lavadas em água corrente e água destilada.

Foi feita lavagem com solução salina tamponada, com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM, pH 7.4 (5 minutos) e então as lâminas foram incubadas em câmara úmida, com os anticorpos primários diluídos (Tabela 9) em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) a 1% (Sigma, cod # A9647, EUA) e azida sódica a 0,1% (18 horas a 4°C).

Realizou-se a incubação com “Post Primary Block” (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido) durante 30 minutos, a 37° C, a lavagem com tampão PBS (3 trocas, 3 minutos cada) e fez-se a incubação com o

NovoLink Polymer (30 minutos a 37° C) e fez-se a lavagem em tampão PBS (3 trocas, 3 minutos cada) novamente.

As lâminas foram posteriormente incubadas em solução substrato 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, cod# D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO), 1 mL de água oxigenada a 6% e 100 mL de PBS a 37°C (5 minutos). E essas, lavadas em água corrente e em água destilada por 3 minutos, contracoradas com hematoxilina de Harris durante 1 minuto, lavadas em água corrente e destilada e imersas 2 vezes em água amoniacal (hidróxido de amônio a 0,5%), lavando-se, novamente, em água corrente e destilada.

A desidratação das lâminas foi feita, utilizando-se etanol a 80% por 30 segundos, etanol a 95% por 30 segundos, etanol a 100% por 30 segundos, duas vezes seguidas, e xilol por 30 segundos, 4 vezes seguidas.

Tabela 9: Marcadores imuno-histoquímicos avaliados

Marcador	Diluição	Clone	Fabricante
Tubulina (alfa Ab -2)	1:1000	DMA-1	Neomarkers
PCNA	1:7.500	PC-10	Dako