

MARIA LUIZA DE CASTRO RAMOS VALLADÃO

**DADOS CLÍNICOS, MORFOMETRIA E TEXTURA
NUCLEAR COMO FATORES PROGNÓSTICOS E
PREDITIVOS NO TUMOR VENÉREO
TRANSMISSÍVEL CANINO**

CAMPINAS

2007

MARIA LUIZA DE CASTRO RAMOS VALLADÃO

**DADOS CLÍNICOS, MORFOMETRIA E TEXTURA
NUCLEAR COMO FATORES PROGNÓSTICOS E
PREDITIVOS NO TUMOR VENÉREO
TRANSMISSÍVEL CANINO**

*Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Médicas, área de concentração
Fisiopatologia Médica*

ORIENTADOR: DR KONRADIN METZE

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

V23d Valladão, Maria Luiza de Castro Ramos
Dados clínicos, morfometria e textura nucleares como fatores
prognósticos e preditivos no tumor venéreo transmissível canino /
Maria Luiza de Castro Ramos Valladão. Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Konradin Metze
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tumores venéreos transmissíveis. 2. Sobrevida. 3. Cães.
4. Citologia. 5. Morfometria. 6. Cariometria. 7. Fractais.
8. Quimioterapia. 9. Diagnóstico por imagem. 10. Análise de textura.
11. Vincristina. I. Metze, Konradin. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Clinical data, morphometric and texture features nuclei as prognostic and predictive factors in canine transmissible venereal tumor

Keywords: • Venereal Tumors, Veterinary

- Survivorship
- Dogs
- Cytology
- Morphometry
- Kariometry
- Chemotherapy
- Fractals
- Diagnostic by imaging
- Texture analysis
- Vincristine

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

Titulação: Mestrado em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora: Prof Dr Konradin Metze

Prof Dr Fernando Augusto Soares

Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Data da defesa: 06-02-2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr Konradin Metze

Membros:

1. Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

2. Profa. Dra. Laura Sterian Ward

3. Prof. Dr Konradin Metze

Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data- 06. 02. 2007

Aos meus amores
Valladão, Tusa e Alexandre.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze,

À Profa. Dra. Irene Lorand-Metze,

À Profa. Dra. Maria Letícia Cintra,

À Dra. Ellen Pestilli,

À médica veterinária Karime Cury Scarpelli,

Ao Dr. Randall Luís Adam

Aos componentes e participantes do Exame de Qualificação:

Profa. Dra. Iscia Cendes

Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo

Prof. Dr. Fernando Cendes

Aos componentes e participantes da Apresentação da Dissertação:

Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Profa. Dra. Carmen S. Passos

A Deus;

Aos meus pais Valladão, Tusa, Alexandre;

Aos meus avós, madrinha e padrinho, irmãos, sobrinho, tios, e primos pela dedicação, carinho e incentivo;

Aos amigos e companheiros Karime e Edson;

Aos amigos: Marilene, Chico, Walmir, Eduardo, Márcio, Paulo e Henrique do Projeto Melhor Amigo - Centro de Controle de Zoonoses / Prefeitura Municipal de Taubaté-SP;

As amigas Marbele e Milena que me acolheram no início da jornada;

Aos amigos Samira, Ana Maria, Andréia, Hipólita, Brandão, Marcos, Luciana Anelyssa, Simone, Isabel, Daniela, Maribel, Virgínia, Rita, Mariane, Richelle, Mariana, Jacira, Fernanda, Fabiana, Sandra, Priscila, Lilian, Josemara, Rita, Andreza, Kati, Juarez, Rosa, Catarina, Icléia, Franscisco;

Aos que me acolheram e ajudaram na FCM:

Sérgio, Mônica, Tereza, Maria do Carmo, Beth, João Carlos, Luís, Vera, Claudinha, Adislon, Priscila, Lucinha e Dona Gê;

Aos demais professores, residentes e funcionários do Núcleo de Pesquisa, Laboratório de Hematologia, FCM / Unicamp;

Ao Laboratório Sistemas de Informação - Instituto de Computação /Unicamp;

A Capes e Fapesp pelo apoio financeiro.

*“Cada qual sabe amar a seu modo;
o modo, pouco importa;
o essencial é que saiba amar!”*

Machado de Assis

*“Eu queria trazer-te uns versos muito lindos
colhidos no mais íntimo de mim...*

*Trago-te palavras, apenas...
e que estão escritas do lado de fora do papel...*

*Não sei,
eu nunca soube o que dizer-te
e este poema vai morrendo,
ardente e puro,
ao vento da Poesia...
como
uma pobre lanterna que incendiou!”*

Mario Quintana

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1- INTRODUÇÃO.....	18
1.1- Tumor Venéreo Transmissível Canino.....	19
1.2- Fatores Prognósticos e Preditivos.....	24
1.2.1- Escala de Desempenho Karnofsky.....	24
1.2.2- Morfometria e Textura Nuclear.....	25
2- OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	27
2.1-Objetivos Gerais do Estudo.....	28
2.2- Objetivos Específicos.....	28
2.3- Hipóteses.....	28
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1- Dados Clínicos.....	30
3.1.1- Escala de Desempenho Karnofsky Adaptada.....	31
3.2- Coleta de Material.....	31
3.3- Tratamento Quimioterápico.....	31
3.4- Processamento do Material.....	32
3.5- Aquisição das imagens.....	33
3.6- Processamento das imagens.....	33
3.7- Análise das imagens segmentadas.....	34
3.8- Análises Estatísticas.....	35

4- RESULTADOS.....	36
4.1- Estudo Clínico.....	37
4.1.1- Validação da Escala de Desempenho Karnofsky Adaptada.....	38
4.2- Resultados da Sobrevida.....	39
4.3- Resposta ao Tratamento.....	40
5- DISCUSSÃO.....	44
5.1- Estudo Clínico.....	45
5.1.1- Escala de Desempenho Karnofsky.....	45
5.1.2- Peso.....	46
5.2- Resposta ao Tratamento.....	47
5.2.1- Sulfato de Vincristina.....	47
5.2.2- Sexo.....	47
5.2.3- Volume da Massa Tumoral.....	47
5.2.4- Época de Início do Tratamento.....	48
5.2.5- Interrupções do Tratamento.....	48
5.2.6- Resistência ao agente quimioterápico.....	49
5.2.7- Morfometria Nuclear.....	49
5.2.8- Textura Nuclear.....	50
6- CONCLUSÃO.....	51
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
8- ANEXOS.....	63
9- APÊNDICE.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

MHC	Antígenos de Histocompatibilidade Principal
DLA	Antígeno Leucocitário Canino
CCZ-T	Centro de Controle de Zoonoses de Taubaté
EDK	Escala de Desempenho Karnofsky
EDKA	Escala de Desempenho Karnofsky Adaptada
EDKS	Escala de Desempenho Karnofsky Simplificada
FASE-S	Fase Estática
FASE-P	Fase Progressiva
FASE-R	Fase de Regressão
HE	Eosina e hematoxilina
MRP 1	Proteína de Resistência Multidrogas 1
R²	Rugosidade da Cromatina
SRD	Sem Raça Definida
TVTC	Tumor Venéreo Transmissível Canino
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

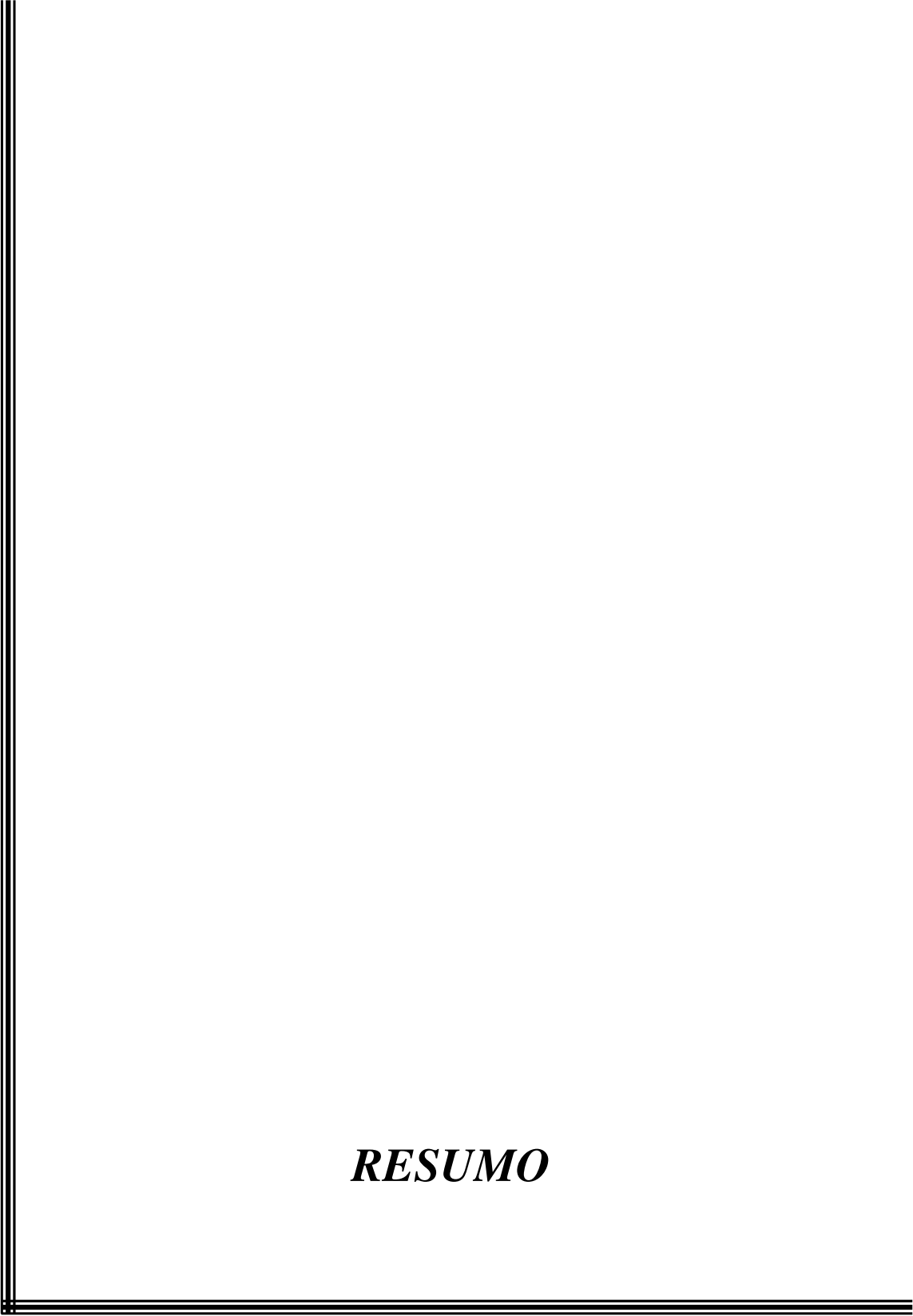
	<i>Pág.</i>
Figura 1 Aspecto histológico do TVTC.....	32
Figura 2 Esfregaço citológico de TVTC.....	33
Figura 3 Núcleo segmentado de esfregaço citológico do TVTC.....	34
Figura 4 TVTC genital em fêmea.....	37
Figura 5 TVTC genital em macho.....	37
Figura 6 TVTC extragenital em mucosa.....	38
Figura 7 Curva sobrevida estratificada conforme o escore na EDKA.....	40
Figura 8 Curva da remissão da massa tumoral.....	41
Figura 9 Curva da remissão da massa tumoral	42
Figura 10 Curva da remissão da massa tumoral.....	42

LISTA DE ANEXOS

	<i>Pág.</i>
Anexo 1 Escala de Desempenho Karnofsky (1949).....	64
Anexo 2 Escala de Desempenho Karnofsky Simplificada (1952).....	65

LISTA DE APÊNDICE

	<i>Pág.</i>
Apêndice 1 Escala de Desempenho Karnofsky Adaptada para caninos.....	67



RESUMO

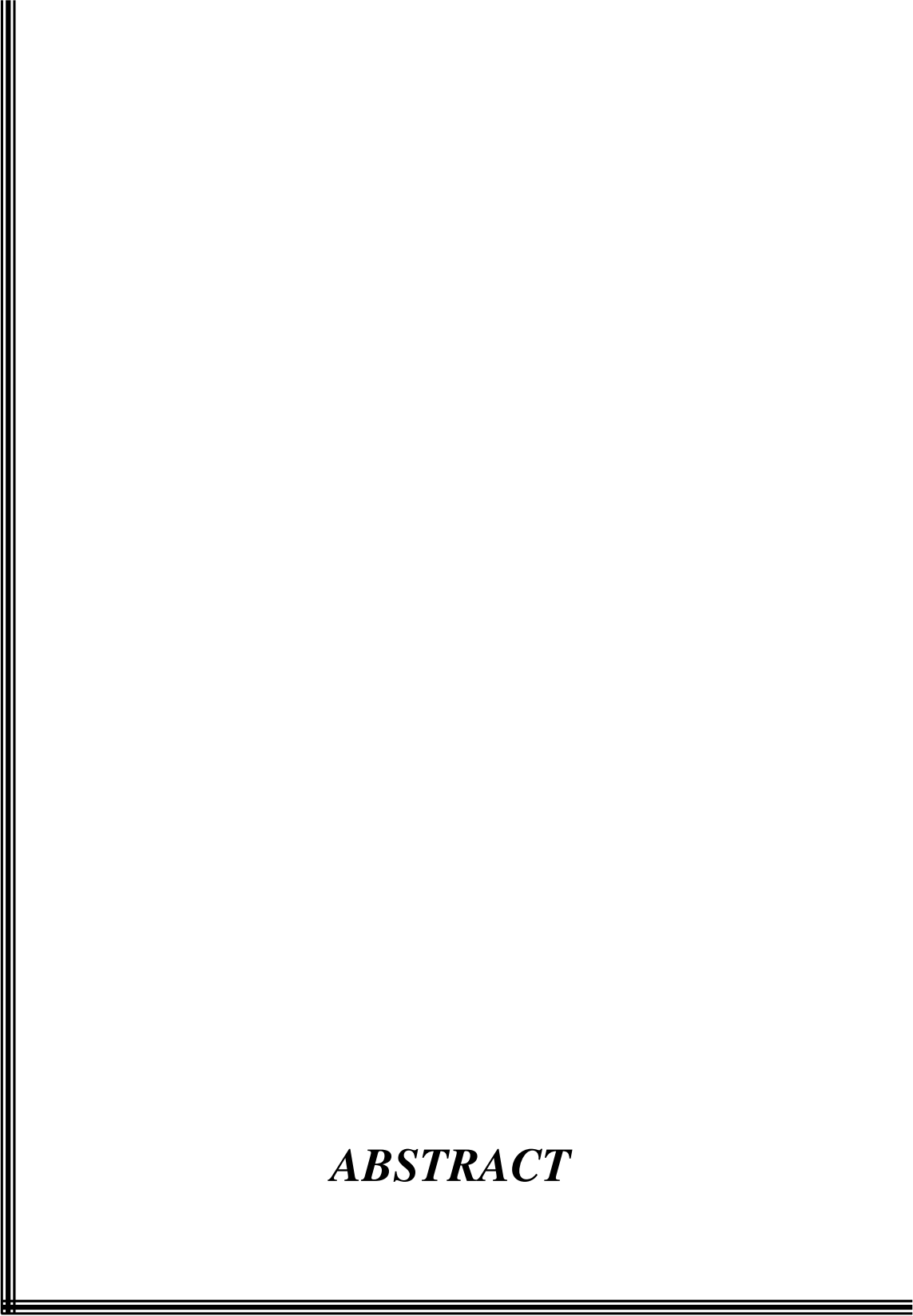
O Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC) é uma neoplasia muito comum em caninos com livre acesso as ruas. O TVTC pode provocar metástases que levam o animal à morte.

A presente tese realizou estudo exploratório e prospectivo em 100 caninos portadores de TVTC de ocorrência natural. Foram anotados dados clínicos como raça, sexo, idade, peso corporal e escore na Escala de Desempenho Karnofsky Adaptada (EDKA), bem como amostras citológicas. O objetivo do estudo foi elaborar fatores prognósticos relacionados à sobrevida e fatores preditivos da resposta da monoterapia com vincristina.

Os resultados demonstraram que o a idade, o peso corporal do cão e o escore na EDKA são fatores independentes prognósticos da sobrevida durante o tratamento. Cães com escore na EDKA abaixo de 50 tiveram um péssimo prognóstico de sobrevida.

O tempo de interrupção do tratamento, época do ano em que se iniciou o tratamento, área do núcleo e a "rugosidade" da cromatina em preparações citológicas mostraram ser fatores independentes preditivos do sucesso da terapia.

A sobrevida durante a terapia depende do estado clínico do animal, enquanto a resposta terapêutica depende tanto de características da neoplasia como de fatores ambientais externos que modificam o estado clínico do animal.



ABSTRACT

The veneral transmissible tumor of dogs (CTVT) is a common neoplasia in free roaming dogs. Since this tumor may metastasize it is a possible tread for the animals.

In a prospective exploratory study based on 100 dogs with naturally occuring CTVT we collected data on breed, sex, age, weight, tumor size and the score on a modified Karnofsky Performance Scale, as well cytologic smears. The objective of the investigation was study to elaborate prognostic factors related to survival and predicitive factors related to the response to vincristine monochemotherapy.

Age, sex and the Karnofsky score showed to be independent prognostic factors for survival during chemotherapy. A score below 50 indicated poor survival.

Time of interruption of the treatment, season of the year, nuclear area and "roughness" of the cromatin in cytologic preparations showed to be independent prognostic factors for the success of therapy. Thus survival during therapy depends on the performance status of the dog, whereas therapy success depends both on tumor characteristics and external factors modificating the animals performance.

1- INTRODUÇÃO

O Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC) é a neoplasia mais freqüente do trato genital externo de caninos abandonados ou com livre acesso às ruas em nosso país e pode ter comportamento maligno em animais imunossuprimidos e filhotes (Theilen e Madwell, 1997; Brito, 2004).

O TVTC é uma neoplasia que constantemente gera discussão pelo fato de ser transmissível e ser um ótimo modelo para a compreensão dos diversos mecanismos de escape ao sistema imunológico (VonHoldt e Ostrander, 2006).

Embora esta neoplasia tenha sido bastante pesquisada, não encontramos na literatura internacional, informações quanto à sobrevida dos animais, bem como, fatores que possam prever a resposta ao agente quimioterápico sulfato de vincristina, amplamente utilizado no tratamento do TVTC.

Associamos fatores clínicos, dados morfométricos e de análise da textura nuclear, avaliamos fatores prognósticos de sobrevida e também fatores preditivos de resposta ao tratamento com sulfato de vincristina em 100 cães com TVTC.

A dissertação que segue foi estruturada em 6 (seis) capítulos. O primeiro trata de uma revisão bibliográfica, na qual procuro sistematizar as principais informações sobre o TVTC, morfometria e textura nuclear, que são concernentes ao tema deste trabalho. Em seguida, descrevo os materiais e métodos utilizados, os resultados obtidos. E, por fim, apresento a discussão desses mesmos resultados e suas conclusões, encerrando a presente dissertação.

1.1 Tumor Venéreo Transmissível Canino

Lombard e Cabanie (1968) atribuem ao pesquisador Jean-Baptiste Huzard, no ano de 1820, a primeira descrição de um tumor venéreo, possivelmente, transmissível em caninos. Em 1876, o médico veterinário Novinsky conseguiu transmitir experimentalmente células do tumor através de incisão e sutura, quando então, este tumor venéreo canino foi reconhecido como transmissível (Theilen e Madwell, 1987). Sticker (1905-1906) realizou

diversos trabalhos sobre o TVTC e referiu-se ao tumor como um linfoma contagioso; o qual passou a ser chamado posteriormente de “sarcoma de Sticker” (Theilen e Madwell, 1987; Harmelin et al. 2002).

O TVTC de ocorrência natural é transmitido através de deposição de células tumorais vivas após a injúria de superfícies epiteliais durante o coito, lambedura, mordedura e até aspiração de células tumorais (Mozos et al, 1996; Marchal et al., 1997; Harmelin et al. 2002). O crescimento é observado na submucosa, estende-se e reveste o epitélio, que pode ulcerar (Kennedy et al. 1998).

Tumores primários ocorrem, com maior frequência, na vagina e vestíbulo das fêmeas, parte posterior do bulbo e prepúcio de machos. Tumores extragenitais nos olhos, espaço orbital, vias nasais, mucosa oral e tumores subcutâneos também foram descritos (Theilen e Madwell, 1987; Parent et al., 1983; Pèrez et al., 1994; Rogers et al., 1998; Chu et al., 2001; Papazoglou et al., 2001).

Altas taxas de prevalência do TVTC ocorrem em regiões tropicais e subtropicais (Das e Das, 2000). O TVTC é mais comum em animais jovens, errantes, sexualmente ativos e não há predisposição racial (Vermooten, 1987; Rogers et al., 1998).

Pesquisas sugerem que as fêmeas são mais acometidas que os machos. A ação de hormônios na região genital das fêmeas durante o período de cio promove aumento do aporte sanguíneo local, podendo favorecer o transplante das células tumorais (Brito, 2004).

O número de cromossomos diplóides normais, em células somáticas de cães (*Canis familiaris*), é 78; sendo 76 cromossomos autossômicos acrocêntricos e, 2 cromossomos sexuais metacêntricos. Amostras de TVTC, coletadas em 5 continentes, são, geneticamente, diferentes do genótipo do hospedeiro e têm cariótipo similar de 59 a 61 cromossomos (Weber et al., 1965; Hasler e Weber, 2000).

Apesar do cariótipo do tumor ser aneuplóide, ele tem marcadores cromossomais característicos. Em todas as amostras de tumores examinados o “transposon” LINE-1 é encontrado, inserido próximo ao gene *c-myc* (Amariglio et al., 1991; Mukaratirwa e Gruys, 2003; Murgia et al., 2006).

Murgia (2006) hipotetiza que o genótipo dessas amostras é derivado de um único clone neoplásico surgido, provavelmente, há 200 e 2500 anos, em um lobo ou cão de raça antiga da Ásia Oriental.

Células de TVTC podem ser parasitadas por *Leishmania* (Albanese et al., 2002) e marcadores imunohistoquímicos sugerem origem celular histiocitária (Costa, 1994; Mozos et al., 1996; Liao et al., 2003).

O TVT pode ocorrer, também, em outros canídeos como raposas, coiotes, lobos e chacais e essa transplantação, provavelmente, ocorre devido ao fato de que células do TVTC têm a atividade dos antígenos de histocompatibilidade principal (MHC) classe I diminuídas e atividades dos MHC de classe II completamente ausentes (Murgia et al., 2006; VonHoldt e Ostrander, 2006). Os antígenos da MHC são indispensáveis na apresentação de peptídeos antigênicos para os linfócitos T e as funções dos linfócitos T e células *natural killer* (NK), dependem do nível de antígenos da barreira de MHC expressos na superfície das células tumorais (Pèrez et al., 1998; Hsiao et al., 2002). Células do TVTC também agem diminuindo a atividade do antígeno leucocitário canino (DLA) (Pèrez et al., 1998; Murgia et al., 2006).

O TVTC cresce rapidamente (Kennedy et al., 1998) e, tanto em casos naturais como em casos experimentais, o crescimento inclui fase progressiva (fase-P), estática (fase-S) e regressão (fase-R). Durante a fase-P, os caninos apresentam sua resposta imunológica suprimida, semelhantemente ao observado em diversos tumores malignos humanos (Gonzalez et al., 2000).

A regressão espontânea é pouco observada em tumores de ocorrência natural (Kennedy et al., 1998; Harmelin et al., 2002; Hsiao et al., 2002). O bloqueio da proliferação das células tumorais, característico da regressão espontânea ou induzida por quimioterapia, pode ser coincidente ou resultante de posterior infiltração de linfócitos, principalmente tipo T, células NK e substituição do estroma tumoral por fibrose, (Gonzalez et al., 2000; Mukaratirwa et al., 2004).

As células do TVTC acionam resposta imunológica humoral e celular. Subseqüentes transplantações tumorais são prevenidas pela transferência passiva de anticorpos a filhotes de mães imunizadas com TVTC, antes ou durante a gestação, e a adultos imunocompetentes (Yang et al., 1976; Mozos et al, 1996; McNiel et al., 1997; Mukaratirwa et al., 2004).

Metástases ocorrem, principalmente, em filhotes e caninos imunossuprimidos e já foram encontradas em linfonodos regionais, fígado, pâncreas, baço, pulmões, rins, cavidade ocular, cérebro e tecido subcutâneo (Pèrez et al., 1994; MacEwen, 1996; Theilen e Madwell, 1997; Ferreira et al., 2000).

O diagnóstico do TVTC é baseado no histórico ambiental, nas observações clínicas e em achados laboratoriais (Theilen e Madwell, 1997).

O aspecto macroscópico do TVTC é variável, podendo ser simples ou múltiplo, nodular, pedunculado, multilobular, em forma de couve-flor, firme ou friável (Hahn e Richardson, 1995; Papazoglou et al., 2001) com diâmetro entre 0,5 e 10 cm (MacEwen, 1996). Clinicamente, a massa tumoral apresenta descarga sero-sanguinolenta e são freqüentes as áreas de necrose e de infecção bacteriana superficial (Vermooten, 1987).

Ao exame citológico, o TVTC em estágio de crescimento é composto de células ovais ou redondas que se assemelham às células linfóides e são arranjadas em agrupamentos, camadas ou, menos comumente, em cordões. As células têm núcleos grandes, freqüentemente, redondos e hipercromáticos, contendo cromatina grosseiramente agregada em padrão filamentoso. Os nucléolos são únicos, grandes e bem definidos. Figuras mitóticas são comuns. O citoplasma é claro e pouco corado, e as margens celulares são indistintas, exceto nas áreas onde as células não estão justamente agrupadas (Kennedy et al, 1998).

Ao exame ultra-estrutural, células saudáveis de TVTC têm núcleo de redondo a oval, cromatina dispersa, exceto por um pequeno agregado ao longo do envelope nuclear e nucléolo com nucleolema evidente. O citoplasma contém mitocôndrias com poucas e irregulares cristas, retículo endoplasmático rugoso abundante, poliribossomos, complexo de

Golgi, gotículas lipídicas ocasionais e numerosos contornos tubulares e vesiculares. Ocasionalmente, são observadas microvilosidades, mais facilmente, em áreas onde as células estão menos coesas. Células em degeneração têm um citoplasma mais escuro, mitocôndrias e retículo endoplasmático inchados, espaço perinuclear ampliado e cromatina grosseira, em grumos (Otomo et al., 1981; Harmelin et al., 2002).

Apesar do comportamento biológico do TVTC ser variável e depender da resposta imune do hospedeiro (Mozos et al., 1996), o TVTC pode responder a diversas formas de terapia, como excisão cirúrgica, quimioterapia, radioterapia, criocirurgia, imunoterapia e ou vacinação autógena (Costa, 1994; Vermooten, 1997; Gonzalez et al., 2000).

A quimioterapia é a mais comum e eficiente forma de tratamento. Vários agentes quimioterápicos podem ser empregados, incluindo ciclofosfamida, vincristina, metotrexate e doxorubicina. A maioria dos protocolos quimioterápicos resulta entre 90 a 95 % de cura (Rosenthal, 1981).

O protocolo mais utilizado é 0,5 mg/m² de sulfato de vincristina, administrado via endovenosa, semanalmente, até remissão clínica completa, equivalente a 0,025 mg/Kg de sulfato de vincristina (Calvet et al., 1982; Hahn, 1990; Hahn e Richardson, 1995; Singh et al., 1996; Metcalfe et al., 1997; Erunal-Maral et al., 2000; Nak et al., 2005).

Os alcalóides da vinca são componentes específicos do ciclo celular que bloqueiam a mitose, interrompem a metáfase e comprometem outras funções celulares como movimentos celulares, fagocitose e transporte axonal de organelas subcelulares (Gidding et al., 1999).

Na literatura internacional pesquisada, o número de cães tratados é pequeno e os dados das doses de vincristina utilizadas no tratamento do TVTC são variáveis, bem como a resposta a esse agente quimioterápico, e embora a resistência ao sulfato de vincristina seja relatada, em vários casos, a resposta ao tratamento é satisfatória, e esse agente quimioterápico é bastante acessível (Calvet et al., 1982; Hahn, 1990; Pèrez et al.,

1994; Singh et al., 1996; Metcalfe et al., 1997; Rogers et al., 1998; Gidding et al., 1999; Erunal-Maral et al., 2000; Papazoglou et al., 2001; Nak et al., 2005; Weinkle et al., 2005).

1.2- Fatores Prognósticos e Preditivos

Diversos estudos investigando fatores prognósticos da sobrevida tem sido desenvolvidos na medicina veterinária devido a preocupação com a sobrevida e a qualidade de vida dos animais de companhia (Caahalane et al., 2004; Freeman et al., 2005; Gibson et al., 2005; Weinkle et al., 2005; Weisse et al., 2005; Yazbek e Fantoni, 2005).

Existe uma imensa variedade de fatores prognósticos e preditivos incluindo desde fatores clínicos, escalas de avaliação de dor e qualidade de vida, até variáveis obtidas através de sofisticadas técnicas (Freeman et al., 2005; Metze et al., 2005a; Weinkle et al., 2005; Weisse et al., 2005; Yazbek e Fantoni, 2005, Adam et al., 2006).

Estudo prognóstico da sobrevida e preditivo da resposta à terapia com sulfato de vincristina em cães com TVTC não foram encontrados na literatura pesquisada.

1.2.1- Escala de Desempenho Karnofsky

A Escala de Desempenho Karnofsky (EDK) (Anexo I) é uma ferramenta usada há várias décadas para avaliar a qualidade de vida em pacientes humanos durante o tratamento quimioterápico. Sua principal característica é tornar objetiva a mensuração subjetiva do estado clínico do paciente (Karnofsky e Burchenal, 1949).

Encontramos, na literatura medica veterinária, autores que utilizaram a EDK na avaliação de felinos (Hartmann et al., 1997; Hartmann e Kuffer, 1997; Hartmann e Kuffer, 1998). A escala de Desempenho Karnofsky Simplificada (EDKS) (AnexoII) foi utilizada na por Ogilvie et al. (1989) e Hahn et al. (1994). Não encontramos estudos que utilizassem a EDK na avaliação de cães com TVTC.

1.2.2 Morfometria e Textura Nuclear

A base da análise microscópica dos tecidos está na observação da imagem de equivalência citológica ou histológica obtida através das diferentes técnicas de colorações. Essas diversas colorações têm afinidade com as diferentes estruturas que compõem as células, dependendo do estado fisiológico ou patológico destes tecidos (Doudikine et al., 1995; Losa, 1995).

Alterações na aparência da cromatina podem ocorrer devido às mudanças na ativação do padrão de genes, tanto nas diferentes fases do ciclo celular como em diferentes estados metabólicos ou de diferenciação da célula. Em células tumorais, as mudanças na aparência da cromatina são freqüentes, e estas alterações podem estar relacionadas à progressão do estado patológico (Doudikine et al., 1995; Losa, 1995).

Como existe considerável discordância entre os especialistas da citopatologia e histopatologia sobre a aparência da cromatina, diversas ferramentas matemáticas para a análise de imagens microscópicas vêm sendo criadas com o intuito de auxiliar o processo diagnóstico (Adam, 2002; Adam et al., 2004; Waldemarin et al., 2004; Gaspar, 2005; Metze et al., 2005b; Metze et al., 2005c; Ferreira et al., 2006; Simeonov e Simeonova, 2006a, Simeonov e Simeonova, 2006b).

Variáveis morfométricas que descrevem aspectos relacionados à forma nuclear, como área, perímetro, maior e menor diâmetro (maior corda) e fator de forma circular, demonstraram grande utilidade na clínica médica e clínica veterinária em prever a sobrevida e ou a resposta a agentes terapêuticos (Adam, 2002; Adam et al., 2004; Waldemarin et al., 2004; Gaspar, 2005; Simeonov e Simeonova, 2006a).

Além de variáveis morfométricas, as características de textura geradas através do cálculo de diversas relações e interações entre os pixels da imagem, também têm a habilidade de avaliar o padrão de cromatina e fornecer informação quantitativa útil para a escolha de protocolos de tratamento (Haralick et al., 1973; Doudikine et al., 1995; Losa, 1995; Metze et al., 2005b; Metze et al., 2005c; Adam, 2006; Ferreira et al., 2006; Simeonov e Simeonova, 2006b).

Adam et al, 2006 estudaram uma nova variável denominada razão de variância (R^2) de Minkowski-Bulligan que descreve pontos, em uma regressão linear, que estão dispersos na periferia da linearidade com relação aos graus de cinza obtidos da imagem nuclear, pois, conforme Losa (1995), a maioria das estruturas biológicas apresentam aspectos de complexidade e organização fractal, que podem não ser reveladas quando são usados somente conceitos geométricos clássicos.

2- OBJETIVOS E HIPÓTESES

2.1- Objetivos Gerais do Estudo

Como o TVT é uma neoplasia muito comum em caninos e tem uma grande variação na apresentação clínica, especialmente em seu comportamento, seria importante desenvolver ferramentas que pudessem prever a evolução da neoplasia, já no ato do diagnóstico, para auxiliar na escolha adequada do tratamento.

Diferenças sutis da cromatina em lâminas de rotina podem conter informações sobre o grau de agressividade das neoplasias. Assim, o objetivo principal do estudo é relacionar parâmetros da textura histológica ou citológica com aspectos clínicos, especialmente da sobrevida, com o intuito de elaborar um modelo prognóstico. Também é nosso objetivo avaliar a resposta ao tratamento quimioterápico padronizado, tanto em seu aspecto clínico, como em possíveis alterações microscópicas.

2.2- Objetivos Específicos

- A) Documentar a extensão do Tumor Venéreo Transmissível em cães;
- B) Avaliar o comportamento clínico dos cães segundo classificação da Escala Karnofsky Adaptada à espécie canina durante e após a remissão completa;
- C) Avaliar a textura dos núcleos em biópsias do tumor pré-tratamento;
- D) Avaliar parâmetros clínicos, morfométricos e textura nucleares como fatores prognóstico de sobrevida após remissão completa tumoral;
- E) Avaliar parâmetros clínicos, morfométricos e textura nucleares como fatores preditivos da remissão tumoral após tratamento com sulfato de vincristina.

2.3- Hipóteses

H₀: Os dados clínicos, a morfometria e a análise da textura nuclear do tumor venéreo transmissível canino não fornecem variáveis prognósticas e ou preditivas da sobrevida e resposta à quimioterapia com sulfato de vincristina.

H₁: Os dados clínicos, a morfometria e a análise da textura nuclear do tumor venéreo transmissível canino fornecem variáveis prognósticas e ou preditivas da sobrevida e resposta à quimioterapia com sulfato de vincristina.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Dados Clínicos

Entre julho de 2003 e setembro de 2006, após o diagnóstico clínico realizado por duas médicas veterinárias, 100 (cem) caninos portadores de TVTC naturalmente ocorridos foram prospectivamente acompanhados e tratados. Os caninos portadores do TVTC, recolhidos como errantes, foram mantidos no Centro de Controle de Zoonoses de Taubaté, estado de São Paulo em canis convencionais, alimentados com ração comercial para cães, obtida comercialmente (Faro - Guabi), e água *ad libitum*. Caninos pertencentes à população carente do município foram mantidos pelos proprietários, embora alguns tenham ficado hospedados no CCZ-T, por algumas semanas.

Semanalmente, os cães foram avaliados clinicamente e anotados os seguintes parâmetros: peso (Kg), classificação na Escala de Desempenho Karnofsky Adaptada para caninos (EDKA) (Apêndice I), classificação na Escala de Desempenho Karnofsky Simplificada (EDKS) (Anexo II) e observações clínicas relevantes como mês e ano do início da quimioterapia, dados do animal e da massa tumoral. As medidas da massa tumoral (a, b, c) foram obtidas com paquímetro e o volume do tumor foi calculado pela fórmula do elipsóide: $\frac{4}{3}\pi abc$ (sendo a, b, c semi-eixos).

Dados como interrupção do tratamento ou alterações no quadro clínico também foram anotados durante o tratamento. Os caninos que, durante o tratamento quimioterápico, apresentaram algum tipo de afecção foram medicados de acordo com suas necessidades.

Animais que apresentavam complicações sérias e sofrimento exacerbado, chegando, inclusive, a não responder ao tratamento medicamentoso implementado, foram eutanasiados.

Após a remissão completa do tumor, os animais foram acompanhados por, no mínimo 4 (quatro) semanas para estimar a sobrevida. Consideramos a data de início do tratamento quimioterápico como o dia inicial para o cálculo da sobrevida.

Exames citológico e histológico foram realizados, confirmando o diagnóstico de TVTC.

3.1.1- Escala de Desempenho Karnofsky Adaptada

A EDKA foi modificada para a utilização em cães com neoplasia durante o tratamento quimioterápico. Cada escore da EDK foi adaptado, considerando diferenças comportamentais e sensibilidade ao sofrimento e à dor entre a espécie canina e a espécie humana, sinais de vitalidade e comportamento social, condições físicas e fisiológicas, necessidade de contenção, cuidados médicos e hospitalização.

Com o intuito de avaliar a aplicabilidade e acurácia da EDKA, 32 (trinta e dois) caninos sem raça definida que não estavam acometidos pelo TVTC foram selecionados ao acaso no CCZ-T de Taubaté, estado de São Paulo e avaliados por 2 (duas) veterinárias independentes. Essas avaliações do escore da EDKA foram anotadas.

3.2- Coleta de Material

Para a biópsia da massa tumoral, os caninos receberam 0,1 mg/Kg de sulfato de atropina, sendo anestesiados com 3 mg/Kg de xilasina e 15 mg/Kg de ketamina, por via intramuscular. Os animais receberam infusão de solução fisiológica e foram realizadas as biópsias da massa tumoral com punch nº 5. As lâminas contendo esfregaço citológico ficaram armazenadas em álcool 70° e os fragmentos coletados, mantidos em formalina tamponada durante 24 horas.

3.3- Tratamento Quimioterápico

Para o tratamento dos cães com TVTC, utilizamos 0,025 mg/Kg do agente quimioterápico sulfato de vincristina, via endovenoso, semanalmente e até 1 semana após a remissão clínica total da massa tumoral. Estabeleceu-se que o canino seria castrado caso a massa tumoral persistisse após a 17ª dose do quimioterápico.

Depois de 1 ano da remissão completa do TVTC, todos os caninos que não tinham proprietários foram castrados e disponibilizados para adoção.

3.4- Processamento do material

Confeccionaram-se 300 (trezentas) lâminas, contendo esfregaços citológicos. Essas foram coradas com hematoxilina, durante 60 segundos e com eosina, durante 30 segundos. Os esfregaços foram desidratados e cobertos com lamínula no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Universidade estadual de Campinas (UNICAMP).

O processamento histológico das biópsias colhidas consistiu de desidratação em uma série de álcoois de concentração crescente (70%, 90% e 3 absolutos), durante 1 (uma) hora cada; diafanização em 2 (dois) banhos, de 1 (uma) hora cada, em xilol e à temperatura de laboratório. Em seguida, foram realizados 2 (dois) banhos de parafina a 60°C, de 1 (uma) hora cada, e emblocados com identificação. O material impregnado em parafina foi cortado em espessura aproximada de 4 a 5 µm e corado com hematoxilina durante 60 (sessenta) segundos. Os cortes então foram passados, rapidamente, 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, os cortes foram corados com eosina durante 30 (trinta) segundos, desidratados e cobertos com lamínula.

Todas as lâminas de esfregaços citológicos e histológicos foram preparadas, coradas e cortadas pelo mesmo técnico do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, a fim de minimizar a variação de qualidade dos reagentes e tempo de exposição das lâminas à luz. As lâminas histológicas foram utilizadas, no estudo, como ferramenta diagnóstica (Figura 1).

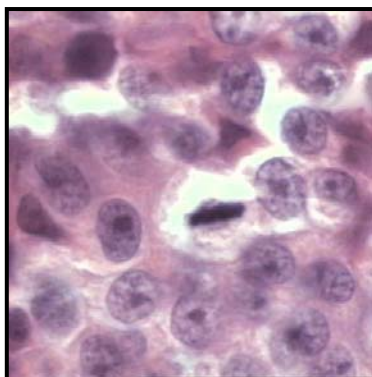


Figura 1- Aspecto histológico do TVTC (coloração HE, aumento 100X).

3.5- Aquisição das imagens

Imagens provenientes de esfregaço citológicos de TVTC, corados com eosina e hematoxilina, foram digitalizadas interativamente. Para essa digitalização, utilizou-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 foram selecionadas aleatoriamente e realizaram-se até 20 imagens digitalizadas de cada um dos 81 (oitenta e um) casos de TVTC, os quais apresentaram bons esfregaços citológicos (total de 1620 imagens).

Todas as imagens digitalizadas das lâminas foram nomeadas automaticamente, eliminando a possibilidade de erro durante a tarefa.

3.6- Processamento das imagens

Das imagens digitalizadas (Figura 2), foram selecionados 100 (cem) núcleos de células de cada caso de TVTC, através de segmentação interativa, pela técnica de limiarização (Figura 3).

Foram segmentados 8100 núcleos de células tumorais, sem sobreposição de estrutura, no foco em que a maior parte dos contornos nucleares estava nítida.

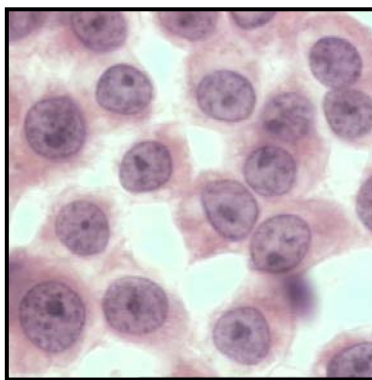


Figura 2- Esfregaço citológico de TVTC (coloração HE, aumento 100X).

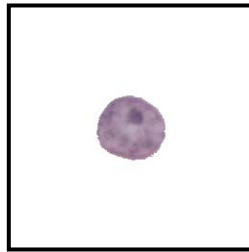


Figura 3- Núcleo segmentado de esfregaço citológico do TVTC (coloração HE, aumento 100X).

As imagens foram segmentadas pela mesma pessoa e todo o processo de seleção dos casos foi realizado aleatoriamente.

Os núcleos do TVTC segmentados foram nomeados automaticamente, eliminando-se a possibilidade de erro durante a tarefa.

3.7- Análise das imagens segmentadas

As imagens dos núcleos segmentados foram transformadas em escala de cinza e analisadas através de programas de análise de imagem que possuem várias vantagens em relação aos programas comerciais. Esses programas foram desenvolvidos para a realização de projetos anteriores e possibilitaram a extração de diversos parâmetros dos núcleos segmentados, como variáveis morfométricas clássicas, variáveis da matriz de co-ocorrência e análise da textura nuclear (Adam, 2002 e 2006).

Todos equipamentos e softwares utilizados para o desenvolvimento do trabalho pertencem à Faculdade de Ciências Médicas e Laboratório de Sistemas de Informação do Instituto de Computação da UNICAMP.

3.8- Análises estatísticas

A correlação Kappa e o Kappa Médio foi calculada, a fim de avaliar o nível de concordância entre os observadores, quanto aos 32 (trinta e dois) caninos escolhidos aleatoriamente e que não apresentavam TVTC.

No cálculo da sobrevida e da resposta ao agente quimioterápico utilizado no tratamento do TVTC, realizamos a análise de regressão Cox univariada, para testar todas as variáveis clínicas, morfométricas e texturais nucleares.

Na análise da sobrevida, apenas as variáveis com $p < 0,10$ foram selecionadas para serem testadas pela regressão Cox multivariada. Então, aplicamos a regressão Cox (stepwise) em 100 (cem) novos conjuntos de dados, obtidos com os dados originais aleatorizados, a fim de indicar a estabilidade dos resultados obtidos a partir dos dados originais da pesquisa.

Para a análise da resposta ao agente quimioterápico, variáveis com $p < 0,20$ foram selecionadas e testadas na regressão Cox multivariada. Na avaliação das variáveis de remissão ao tratamento quimioterápico, realizamos 200 (duzentos) novos conjuntos que foram testados na regressão Cox (stepwise).

Quanto às variáveis morfométricas e de textura nuclear, foram utilizadas as médias dos valores obtidos, após os cálculos computacionais, de 100 (cem) núcleos de cada um dos 81 (oitenta e um) casos.

Todas as análises foram realizadas com os programas Winstat e SPSS 8.0. O cálculo do índice de correlação Kappa foi feito pelo site: www.graphpad.com.

4- RESULTADOS

4.1- Estudo Clínico

Dos 100 cães com TVTC ocorridos naturalmente, 98 TVTCs eram localizados nos genitais (Figuras 3 e 4) e 2 extragenitais, os quais ocorreram na mucosa conjuntival (Figura 5) e mucosa oral desses caninos. 85 fêmeas e 15 machos compuseram o estudo; 88 cães sem raça definida, 12 cães de raças variadas 3 Cocker Spaniel, 2 Poodle, 2 Pinscher, 1 Boxer, 1 Pastor Alemão, 1 Sheep Dog, 1 Husky Siberiano, 1 Basset Hound; 53 animais eram semi-domiciliados e 47 não-domiciliados.



Figura 4- TVTC genital em fêmea.



Figura 5- TVTC genital em macho.



Figura 6- TVTC extragenital em mucosa conjuntival.

As idades estimadas variaram de 1 e 12 anos e a média das idades foi de 4 anos (desvio padrão: 2,26), o peso corporal dos cães variou de 2Kg e 30 Kg e a média foi de 12 Kg (desvio padrão: 5,86) e 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).

Dos 100 cães com TVTC, 32 cães apresentavam algum tipo de inflamação; 26 apresentavam inflamação purulenta, 16 inflamação purulenta localizada na massa tumoral e 12 apresentavam caquexia antes do início do tratamento.

4.1.1- Validação da Escala de Desempenho Karnofsky Adaptada

A EDK adaptada para o estudo foi avaliada pelo índice de correlação Kappa. O índice Kappa foi 0,735 (95%; intervalo de confiança de 0,444 a 0,910); e o Kappa Médio foi 0,835. Esses resultados representam uma boa correlação entre os observadores independentes após a avaliação dos 32 caninos sem TVTC selecionados aleatoriamente.

4.2- Resultados da Sobrevida

Durante o tratamento, 7 cães vieram à óbito, sendo que 2 desses óbitos ocorreram subitamente. Foram realizadas 7 eutanásias em cães que apresentavam sofrimento exacerbado e não respondiam ao tratamento medicamentoso implementado.

A sobrevida foi de 1 semana a 21 semanas e a média da sobrevida foi de 9 semanas (desvio padrão: 4,86), a qual foi calculada até após 4 semanas do término do tratamento.

Na regressão Cox univariada realizada com o intuito de avaliar as seguintes variáveis: peso, idade, sexo, condições de domicílio, volume do tumor, logaritmo do volume do tumor, época de início do tratamento, EDKA, EDKS e a sobrevida até após 4 semanas do final do tratamento, as variáveis peso, idade, condições de domicílio, EDK adaptada ($p<0,001$) e EDK simplificada ($p<0,001$) foram significativas em relatar o óbito durante e ou até após 4 semanas do término da terapia. Entretanto, na regressão Cox multivariada, somente a idade, o peso e a EDKA foram significativas em prever o óbito ($p<0,05$).

Em 100 novos conjuntos de dados criados a partir dos dados iniciais (*bootstrap*) e testados, as variáveis entraram nos modelos conforme segue: EDKA - 96%, logaritmo do peso - 94%, logaritmo da idade - 60%, inflamação purulenta, 11% caquexia 9%, EDKS - 8%, condições de domicílio - 6%.

Aplicamos a análise de grupos e o dendrograma obtido sugeriu separação dos escores em 3 grupos prognósticos mostravam-se distintos; grupo 1, caninos com escore na EDK adaptada >70 ; grupo 2, escore entre 70 e 60; grupo 3 escore > 50 (Figura 6).

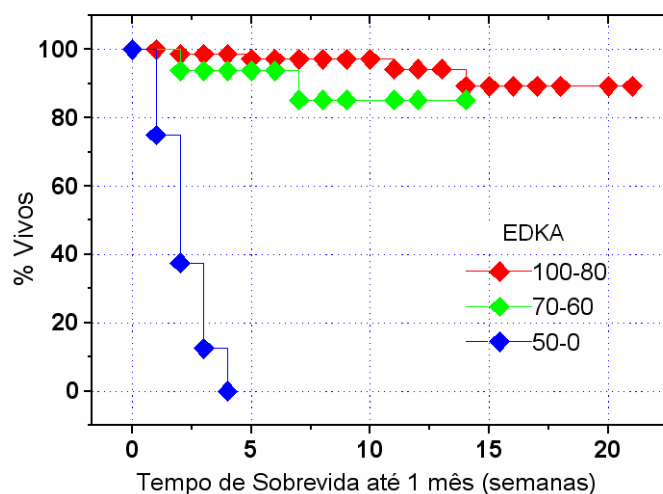


Figura 7- Curva de sobrevida estratificada pelo escore EDKA.

4.3- Resposta ao Tratamento

Em 71 cães, o tratamento foi iniciado nos meses com temperaturas mais quentes (setembro a maio) e em 29 cães o tratamento foi iniciado nos meses mais frios (junho a agosto).

Durante o tratamento surgiram alterações clínicas em 28 caninos. Sendo que 10 caninos tiveram secreção nasal serosa; 02 secreção nasal purulenta, 01 secreção ocular serosa, 02 secreção ocular purulenta, 3 tosse, 1 dispnéia, 2 palidez mucosa oral e ocular, 6 emagrecimento, 1 sarna, 1 diarreia, 1 secreção peniana purulenta, 1 descarga vaginal purulenta, 1 aumento de lesão mamária, 1 dermatite úmida aguda, 3 alterações neurológicas, 1 incontinência urinária, 2 piora na queda pêlos, 1 seborréia, 2 alterações oculares, e 2 cães tiveram piora geral no quadro clínico. Essas complicações foram observadas desde a 2ª aplicação do medicamento até a 14ª aplicação, sendo 4,5 a média do aparecimento destas complicações em semanas de aplicação.

O tempo de tratamento foi de 1 a 17 semanas e em média 5 doses de sulfato de vincristina foram eficazes na remissão do TVTC. A remissão completa ocorreu em 73 dos cães tratados. Interrupções ou abandono do tratamento aconteceram durante o tratamento quimioterápico de 13 animais.

Em 1 caso, o tratamento foi ineficaz devido a problemas venosos que impossibilitavam o tratamento adequado e em outro caso, resistente a 17 doses de tratamento, a massa tumoral teve remissão completa após orquiectomia.

Na regressão Cox univariada, realizada para avaliar a relação entre peso, idade, sexo, condições de domicílio, volume do tumor, logaritmo do volume do tumor, EDKA, EDKS, interrupções no tratamento, época do ano de início do tratamento, presença de inflamação purulenta e a resposta ao tratamento com sulfato de vincristina nos cães com TVTC, selecionou as seguintes variáveis com $p < 0,20$: sexo, logaritmo do volume do tumor, número de semanas de interrupção no tratamento, época do ano do início do tratamento e presença de inflamação purulenta no início do tratamento.

Na regressão Cox multivariada, somente as variáveis: sexo; logaritmo do volume do tumor, interrupção no tratamento e época do ano do início do tratamento foram estatisticamente significativas em prever a resposta ao tratamento padronizado (Figuras 7, 8 e 9).

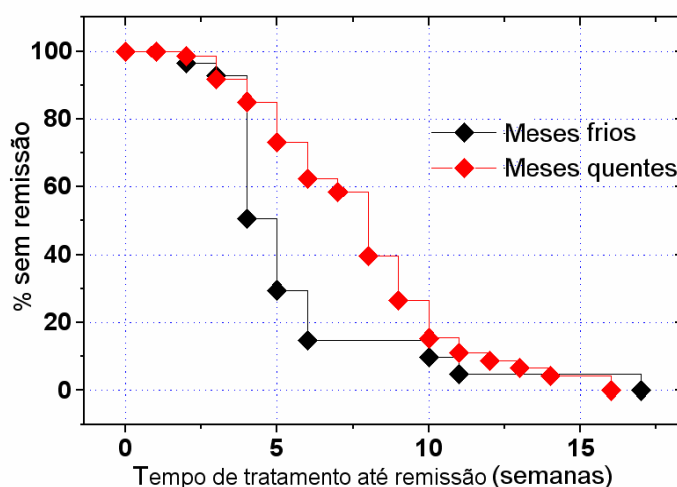


Figura 8- Curva de remissão da massa tumoral durante o tratamento.

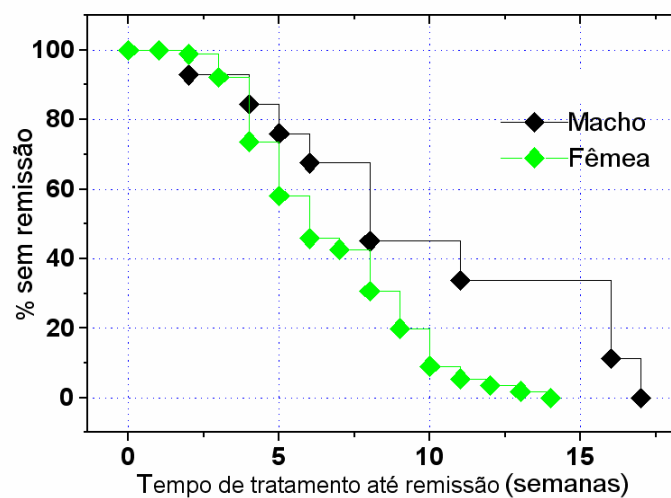


Figura 9- Curva de remissão da massa tumoral durante o tratamento.

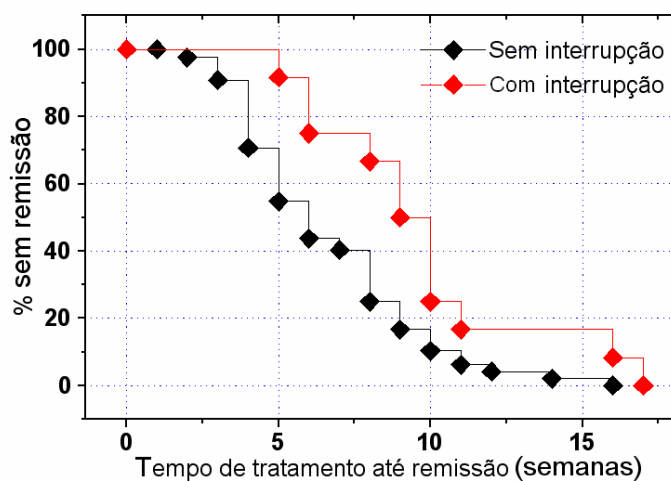


Figura 10- Curva de remissão da massa tumoral durante o tratamento.

Em 200 novos conjuntos de dados criados a partir dos dados iniciais, as variáveis entraram nos modelos conforme segue: interrupção no tratamento 79,5%, sexo (Fêmea) 57%, época do início do tratamento 78,5%, logaritmo do volume 72%, e presença de inflamação purulenta no início do tratamento 11 %.

Os casos em que houve interrupção do tratamento foram censurados e, só então, calculamos se a resposta ao tratamento quimioterápico com vincristina estava relacionada com os valores médios da morfometria dos núcleos e da textura dos núcleos do TVTC antes do tratamento quimioterápico.

Na regressão Cox univariada as médias das variáveis tiveram $p < 0,20$ foram: área nuclear, época de início do tratamento, logaritmo do volume do tumor, idade estimada e R^2 .

Na análise Cox multivariada as variáveis independentes responsáveis em prever o sucesso da terapia com sulfato de vincristina em cães com TVTC foram: média do R^2 , média da área nuclear e época do início do tratamento.

5- DISCUSSÃO

Hall e Going (1999) definem fatores prognósticos como fatores, utilizados no planejamento da terapia, através dos quais o andamento da doença pode ser inferido. Fatores prognósticos são essenciais no tratamento do câncer. Indicadores prognósticos confiáveis, de rápida execução e interpretação, são necessários aos clínicos na escolha e planejamento da terapia. Já os fatores preditivos indicam sensibilidade ou resistência de determinada doença a uma terapia em particular. Apesar de esses fatores fornecerem tão importantes informações, existe resistência dos clínicos veterinários em utilizar resultados obtidos de pesquisas prognósticas e preditivas. Essa resistência deve-se, principalmente, a fatores como a utilização de testes não reprodutíveis e ou não viáveis aos clínicos veterinários.

A seguir, discutirei diversos aspectos sobre o TVTC, a reprodutibilidade e a viabilidade da utilização dos resultados obtidos a partir dos dados clínicos, morfometria e textura nuclear serão discutidos.

5.1- Estudo Clínico

O abandono de cães, ou livre acesso desses, às ruas, ainda ocorre em nosso país, e é um dos fatores que facilita a disseminação do TVTC entre a espécie canina. Programas de educação para a Posse Responsável e o Controle Populacional Humanitário precisam ser implementados e divulgados, para que o abandono e o livre acesso de cães às ruas sejam práticas coibidas.

5.1.1- Escala de Desempenho Karnofsky

Analisando a sobrevida de 86 cães com tumores cerebrais, Heidner et al (1991) encontraram que a severidade clínica inicial dos pacientes estava correlacionada com a sobrevida.

A Escala de Desempenho Karnofsky Simplificada, graduada em 5 (cinco) escores, foi usada, com sucesso na medicina veterinária, por Ogilvie e colaboradores em

1989, para avaliar a extensão da toxicidade da doxorubicina, porém, em 1994, Hahn e colaboradores não obtiveram resultado significativo usando essa mesma EDKS na avaliação de cães com linfossarcoma. Em nosso estudo a EDKS não foi um fator prognóstico da sobrevida, como ocorreu no estudo de Hahn et al. (1994), o que nos leva a crer que haja perda de informação quando a EDK é reduzida a apenas 5 (cinco) escores.

No presente estudo, porém, a Escala de Desempenho Karnofsky Adaptada foi hábil em prever a sobrevida dos cães com TVTC, possibilitando a criação de 3 (três) grupos prognósticos e mostrando estabilidade mesmo, após a realização de testes, em 100 (cem) novos conjuntos criados com os dados originais aleatorizados. Além disso, quando dois observadores independentes utilizaram a EDKA na avaliação do estado clínico de cães não acometidos pelo TVTC, obteve-se bom resultado na correlação Kappa, havendo pouca discordância entre os observadores. Esses resultados levam a crer que a EDKA é uma ferramenta reprodutível, além de útil ao clínico veterinário.

Yazbek e Fantoni (2005) criaram um questionário que avalia a qualidade de vida de cães com dor secundária ao câncer. O questionário contém 12 questões a serem respondidas pelos proprietários dos cães. Em nosso estudo, no entanto, adaptamos a Escala de Desempenho Karnofsky para avaliação dos pacientes, pois os cães que compuseram nosso estudo são abandonados ou tem proprietários relapsos, que permitem livre acesso dos cães às ruas do município.

5.1.2- Peso

Nosso estudo foi composto de cães mestiços, ou de raça pura, de altura baixa à alta e apresentando condições nutricionais que variavam de caquexia à obesidade. O peso do animal, antes do início do tratamento quimioterápico, foi significativo em prever a sobrevida dos cães com TVTC. Em estudo realizado por Garret e colaboradores em 2002, cães com linfoma apresentando peso abaixo ou igual a 18 Kg tiveram sobrevida significativamente reduzida; o que os levou a refletir sobre a possível existência de habilidade em tolerância ao tratamento quimioterápico nos cães mais pesados. No entanto,

em revisão da literatura sobre a vincristina, Gidding e colaboradores alertam que, no caso de crianças, o problema está na transformação da dose em mg/m² para mg/Kg (Gidding et al., 1999).

5.2- Resposta ao Tratamento

5.2.1- Sulfato de Vincristina

Diversos efeitos colaterais são atribuídos ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina (Gidding et al., 1999). Hamilton et al (1991) descreveram neuropatia periférica em um cão após tratamento com 16 doses de vincristina (0,5 mg/m²).

No presente estudo, realizamos até 17 doses de vincristina e possíveis efeitos colaterais durante o tratamento não interferiram no tempo de sobrevivência dos animais durante e até após 4 semanas do fim do tratamento, conforme pudemos observar após a análise estatística dos dados.

5.2.2- Sexo

A remissão completa do TVTC ocorreu após menor número de doses do agente quimioterápico nas fêmeas que compuseram o estudo. No entanto, Brito et al (2006) relataram que as células do TVTC não expressam receptores hormonais esteroidais.

O câncer, na glândula tireóide, tem maior prevalência e incidência em mulheres do que em homens (Ward, 2005). Além disso, Matos et al. (2006) sugerem que fatores hormonais podem favorecer o desenvolvimento do microcarcinoma na tireóide de mulheres. Alguns pesquisadores sugerem também que, a resposta ao agente quimioterápico está relacionada à fase do crescimento tumoral na qual se iniciou o tratamento (Gonzalez et al., 2000; Hsiao et al., 2002; Mukaratirwa et al., 2004), porém, fatores hormonais ainda não identificados podem afetar o comportamento e a resposta à quimioterapia em caninos com TVTC (Hamilton et al., 1991).

5.2.3- Volume da Massa Tumoral

Julgando ser o esferóide, a estrutura mais aproximada do volume dos tumores, calculamos o tamanho da massa tumoral conforme a fórmula do elipsóide, e o volume aproximado de cada massa tumoral do TVTC foi, no presente estudo, um dos fatores preditivos para a resposta ao tratamento com sulfato de vincristina.

5.2.4- Época de Início do Tratamento

Lorand-Metze et al. (1998) relataram que, nos meses com temperaturas mais elevadas, a frequência de leucemia aguda linfocítica aumenta na região de Campinas, estado de São Paulo. Enquanto, Weinkle et al. (2005) observaram que a anemia hemolítica imunomediada canina ocorre, com maior frequência, durante os meses quentes. Lacetera et al. (2005) demonstraram que vacas pré-parturientes apresentam concentração de cortisol mais elevada em época de calor do que em época de frio.

Forte correlação entre a prevalência de TVTC, temperatura média anual e aumento de chuvas, são relatadas na literatura (Theilen e Madwell, 1978; Nielsen et al., 1990).

Nos meses com temperaturas mais elevadas, a sobrevida de cães com TVTC foi menor e a resposta ao tratamento quimioterápico foi mais lenta.

Gonzalez et al. (2000) sugerem que a imunidade tumoral tem papel na regressão do TVTC, mesmo durante tratamento quimioterápico; porém, ainda não foi determinado se essa regressão é dependente de imunidade co-existente.

Provavelmente, mais dados sobre o clima influenciam a resposta imunológica (associada ou não a agentes quimioterápicos) e a sobrevida, pois alterações neuroendócrinas, devido às altas temperaturas e ondas de calor, perturbam as funções imunológicas, como Lacetera et al. (2005) puderam observar em sua pesquisa.

5.2.5- Interrupções do Tratamento

Em nosso estudo, identificamos que interrupções do tratamento aumentaram o

número de doses do quimioterápico necessários para a remissão completa do TVTC.

5.2.6- Resistência ao agente quimioterápico

Segundo BUENO et al. (2003), nos últimos anos, os casos de resistência à quimioterapia aumentaram significativamente; porém, na literatura consultada, as médias de doses oscilaram e o número de animais tratados pelos diversos estudos foram pequenos (Calvert et al., 1982; Pèrez et al., 1994; Harmelin et al., 1995; Singh et al., 1996; Metcalfe et al., 1997; Rogers et al., 1998; Erunal-Maral et al., 2000; Papazoglou et al., 2001; Nak et al., 2005).

Em nosso estudo, a média de doses de sulfato de vincristina necessárias para a remissão completa do TVTC foi de 5 doses. Dos 100 cães tratados, 75 tiveram remissão completa da massa tumoral após o tratamento com vincristina; e os demais 25 cães tiveram seus dados da resposta a terapia censurados devido a óbito ou abandono de tratamento.

5.2.7- Morfometria nuclear

No campo da análise morfológica, diferenças sutis, não visíveis ao observador humano durante a análise citológica, já mostraram que são importantes no diagnóstico diferencial de diversas neoplasias (Losa, 1995; Adam et al., 2006; Ferreira et al., 2006).

Strefezzi et al (2003) demonstraram que a análise nuclear morfométrica em combinação com a técnica de citopatologia pode ajudar a estabelecer o grau de malignidade do mastocitoma. Em recente estudo realizado por Simeonov e Simeonova as médias dos valores de diâmetro nucleares e do perímetro nucleares foram capazes de auxiliar na diferenciação de células epiteliais normais da glândula mamária, de adenomas e carcinomas anaplásicos.

Waldemarin et al., 2004 avaliaram diversos parâmetros morfométricos como métodos de diagnóstico diferencial entre TVTCs, histiocitomas e mastocitomas. E sugerem o uso da morfometria para auxiliar o diagnóstico diferencial entre esses 3 tipos de tumores.

Porém, a morfometria nuclear e nucleolar não mostrou diferença significativa entre os 3 tipos citomorfológicos do TVTC propostos no estudo de Gaspar (2005).

Em nosso estudo, a média da área nuclear das células do TVTC foi a variável que melhor previu a resposta à quimioterapia com sulfato de vincristina; quanto maior a média da área nuclear, mais doses do tratamento foram necessárias para a remissão completa da massa tumoral. E, embora provavelmente, as células do TVTC sejam derivadas de 1 único clone, existem diferenças sutis na cromatina capazes de prever o sucesso da quimioterapia entre os tumores nos diferentes animais.

5.2.8- Textura Nuclear

Dentre as ferramentas que calculam a textura nuclear, a média da dimensão fractal dos núcleos foi capaz de diferenciar células epiteliais normais da glândula mamária, de adenomas e carcinomas do tipo tubulopapilífero, não diferenciando apenas carcinoma do tipo sólidos de carcinoma anaplásico (Simeonov e Simeonova, 2006b).

A fim de analisar a cromatina nuclear, quando a dimensão fractal não é capaz de demonstrar a diferença entre as amostras biológicas, um novo parâmetro da dimensão fractal, o R^2 , que mede a rugosidade da cromatina demonstrou ser fator prognóstico relevante em pacientes com Leucemia Linfóide Aguda, além de utilidade no diagnóstico diferencial entre tumores tireoideanos (Adam et al., 2006; Ferreira et al., 2006).

No presente estudo, a média do R^2 dos núcleos foi capaz de prever a resposta ao agente quimioterápico, o que pode indicar que as alterações da complexidade e organização dos núcleos estão diretamente relacionadas à resposta ao agente quimioterápico no TVTC.

6- CONCLUSÃO

Podemos concluir, a partir dos resultados obtidos no presente estudo, que a idade, o peso corpóreo do animal e o escore obtido da Escala de Desempenho Karnofsky Adaptada, no início do tratamento, são fatores clínicos prognósticos do tempo da sobrevida dos cães com TVTC.

A Escala de Desempenho Karnofsky Adaptada ainda, possibilitou a criação de 3 grupos prognósticos; cães com escore maior que 70 na EDKA tiveram um bom prognóstico; cães com escore entre 70 e 60 tiveram prognóstico reservado, e cães com escore abaixo ou igual a 50 tiveram péssimo prognóstico da sobrevida.

Os fatores clínicos: sexo, o volume do tumor, o tempo de interrupção no tratamento e a época do ano em que se iniciou o tratamento puderam prever a resposta ao tratamento dos cães.

O modelo final obtido em nosso estudo demonstrou que a época de início do tratamento, a média do perímetro nuclear e média do R^2 prevêm independentemente o sucesso da quimioterapia com sulfato de vincristina nos cães com TVTC.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam RL, Ribeiro E, Metze K, Leite NJ, Lorand-Metze I. Morfometric and granulometric features of erythroblasts as a diagnostic tool of hematologic diseases. **Cytometry Part A** 2004; 59:46.

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.

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.

Adam RL. **Análise Granulométrica da textura de núcleos celulares: Elaboração de Ferramentas Computacionais e Aplicação em modelos biológicos** (Tese – Doutorado). Campinas (SP):Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Albanese F, Poli A, Millanta F, Abramo F. Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with Leishmania-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin ? **Veterinary Dermatology** 2002; 13:243-6.

Amariglio, EN, Hakin I, Brok-Siimoni F, Grossman Z, Katzir N, Harmelin A, et al. Identify of rearranged LINE/c-myc junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. **Proc. Natl. Acad. Sci USA** 1991; 88:8136-9.

Brito CP. **Avaliação Imunohistoquímica dos receptores de estrógeno e progesterona no tumor venéreo transmissível (TVT) e tecido vaginal de cadelas portadoras e hípidas em diferentes fases do ciclo estral.** (Dissertação) São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2004.

Brito CP, de Oliveira CM, Soares FA, Faustino M, de Oliveira CA. Immunohistochemical determination of estrogen receptor- α in vaginal and tumor tissues of healthy and TVT-affected bitches and their relation to serum concentrations of estradiol-17 β and progesterone. **Theriogenology** 2006; 66(6-7):1587-92.

Bueno MG, Haipek K, Brito CP, Oliveira CM. Análise retrospectiva do tumor venéreo transmissível (TVT) em cadelas, durante os anos de 1996 a 2002. Avaliação da resposta ao tratamento quimioterápico. **Brazilian J of Vet Res and Enim Science** 2003; 40: S214.

Cahalane AK, Payne S, Barber LG, Duda LE, Henry CJ, Mauldin GE, et al. Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). **J Am Vet Med Assoc** 2004; 225(3):401-8.

Calvet CA, Leifer CE, MacEwen EG. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. **J Am Vet Med Assoc.** 1982;181(2):163-4.

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.

Costa MT. **Utilização do Fator de Transferência Dializável (TFD) e RNA imune na imunoterapia de cães portadores naturais do tumor venéreo transmissível canino.** (Dissertação) Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 1994.

Das U, Das AK. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Veterinary Res Comm** 2000; 24: 545-56.

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

Elipsóide. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Elips%C3%B3ide>. Acesso em 10 de out, 2006.

Erunal-Maral N, Findik M, Aslan S. Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. **Deutsche Tierarztl Wochenschr** 2000; 107(5):175-80.

Ferreira AJ, Jaggy A, Varejao AP, Ferreira ML, Correia JM, Mulas JM, et al. Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. **Journal of Small Animal Practice** 2000; 41: 165-8.

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.

Freeman LM, Rush JE, Farabaugh AE, Must A. Development and evaluation of a questionnaire for assessing health-related quality of life in dogs with cardiac disease. **J Am Vet Med Assoc** 2005; 226:1864-8.

Garrett LD, Thamm DH, Chun R, Dudley R, Vail DM Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **J Vet Intern Med** 2002;16(6):704-9.

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.

Gidding CEM, Kellie SJ, Kamps WA, de Graaf SS. Vincristine revised. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 1999; 29(3): 267-87. 1: Crit Rev Oncol Hematol. 1999 Feb;29(3):267-87.

Gibson TWG, Brisson BA, Sears W. Perioperative survival rates after surgery for diaphragmatic hernia in dogs and cats: 92 cases (1990-2002). **J Am Vet Med Assoc** 2005; 227(1):105-9.

Golden DL, Langston VC. Uses of vincristine and vinblastine in dogs and cats. **J Am Vet Med Assoc** 1988; 193:1114-7.

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.

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.

Lombard C, Cabanie P. Considerations on the nature and studies of the ultrastructure of the Sticker sarcoma of the dog. **Bull Cancer** 1967; 54(3): 357-65.

Hahn KA, Richardson RC. Cancer Chemotherapy – **A Veterinary Handbook**. Baltimore: Ed. Williams & Wilkins;1995. p. 124-5.

Hahn KA, Richardson RC, Hahn EA, Chrisman CL. Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. **Vet Pathol** 1994; 31:528-40.

Hahn KA. Vincristine sulfate as single-agent chemotherapy in a dog and a cat with malignant neoplasms. **J Am Vet Med Assoc** 1990; 197:504-6.

Hall PA, Going JJ. Predicting the future: a critical appraisal of cancer prognosis studies. **Histopathology** 1999; 35:489-94.

Hamilton TA, Cook Jr JR, Braund KG, , Morrison WB, Mehta JR. Vincristine-induced peripheral neuropathy in a dog. **J Am Vet Med Assoc** 1991; 198:635-8.

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

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.

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.

Hartmann K, Kuffer M, Balzarini J, Naesens L, Goldberg M, Erfle V, et al. Efficacy of the acyclic nucleoside phosphonates (S)-9-(3-Fluoro-2-Phosphonylmethoxypropyl)adenine (FMPA) and 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) against feline immunodeficiency virus. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology** 1997; 17:120-8.

Hartmann K, Kuffer M. Karnofsky's score modified for cats. **Eur J Med Res** 1998; 3(1-2): 95-8.

Hartmann K, Kuffer M. Modifikation des Karnofsky-Indexes für die Katze zur Beurteilung der Lebensqualität und zur Therapiekontrolle. **Tierärztl Prax** 1997; 25:540-2.

Hasler AH, Weber WT. Theriogenology Question of the Month. Transmissible Venereal Tumor (TVT). **J Am Vet Med Assoc** 2000; 216(10), 1557-9.

Heidner GL, Kornegay JN, Page RL, Dodge RK, Thrall DE. Analysis of survival in a retrospective study of 86 dogs with brain tumors. **J Vet Int Medic** 1991; 5(4): 219-26.

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.

Karnofsky DA, Burchenal JH. The Clinical Evaluation of Chemotherapeutic Agents in Cancer. In: MacLeod CM. **Evaluation of Chemotherapeutic Agents**. Columbia: Univ. Press, 1949; p. 196.

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.

Lacetera N, Bernabucci U, Scalia D, Ronchi B, Kuzminsky G, Nardone A. Lymphocyte functions in dairy cows in hot environment. **Int J Biometeorol** 2005; 50:105-10.

Ma L, Pratt SE, Cao J, Dantzig AH, Moore RE, Slapak CA. Identification and characterization of the canine multidrug resistance-associated protein. **Molecular Cancer Therapeutics** 2002; 1:1335-42.

Lorand-Metze I, Aranalde MP, Barbosa KB, Metzke K. Seasonality in the diagnosis of acute lymphocytic leukemia in the southeast region of Brazil. **Epidemiology of Hematological Disease** 1998; S38.

- Losa GA. Fractals in pathology: are they really useful? **Pathologica** 1995; 87: 310-6.
- MacEwen EG. Miscellaneous Tumors In: Whithrow SJ, MacEwen EG. **Small Animal Clinical Oncology**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1996. p. 533-7.
- 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.
- Matos PS, Ferreira AP, Ward LS. Prevalence of papillary microcarcinoma of the thyroid in Brazilian autopsy and surgical series. **Endocr Pathol** 2006;17(2):165-73.
- McCallum H, Jones M. To lose both would look like carelessness: Tasmanian devil facial tumour disease. **Plos Biology** 2006, 4(10):1671-4.
- McNiel EA, Ogilvie GK, Powers BE, Hutchison JM, Salman MD, Withrow SJ. Evaluation of prognosis factors for dogs with primary lung tumors: 67 cases (1985-1992). **J Am Vet Med Assoc** 1997; 211(11):1422-7.
- Metcalf SS, Osborne DA, MacFarlane RA. Canine transmissible venereal tumour. **Aust Vet Practit** 1997; 27(4): 186-92.
- Metze K, Bedin V, Adam RL, Cintra ML, Souza EM, Leite NJ. Parameters derived from the fast Fourier transform are predictive for the recurrence of basal cell carcinoma. **Cell Oncol** 2005a; 27:137.
- Metze K, Piazza AC, Iaza AA, Adam RL, Leite NJ. Texture analysis of AgNOR stained nuclei in lung cancer. **Cell Oncol** 2005b; 27:137-8.
- Metze K, Silva RC, Adam RL, Leite NJ, Pereira FG, Lorand-Metze I. Relation between chromatin texture and phenotype in acute leukemias. **Cell Oncol** 2005c; 27:112-3.
- Metze K, Silva PVVT, Adam RL, Cintra ML, Leite NJ. Differentiation of keloid and hypertrophic scar by texture analysis. **Analytical Cellular Pathology** 2002; 24: 196-7.

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.

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.

Mukaratirwa S, Gruys E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. **Vet Quaterly** 2003; 25(3): 102-11.

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

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.

Nielsen SW, Kennedy PC. In: Moulton JE. **Tumors in Domestic Animals** 3. ed. California: University of California Press, 1990. p. 498-502.

Ogilvie GK, Richardson RC, Curtis CR, Withrow SJ, Reynolds HA, Norris AM, et al. Acute and short-term toxicoses associated with the administration of doxorubicin to dogs with malignant tumors. **Am Vet Med Assoc** 1989; 195(11):1584-7.

Otomo K, Koike T, Kudo T, Sakai, T. Histological and ultrastructural findings of regressing canine transmissible venereal tumor after repeated transplantation. **Nippon Juigaku Zasshi** 1981; 43: 823-32.

Papazoglou LG, Koutinas AF, Plevraki AG, Tontis, D. Primary intranasal transmissible venereal tumour in the dog: a retrospective study of six spontaneous cases. **J Vet Med** 2001; 48: 391-400.

Parent R, Teucher E, Morin M, Buyschaert A. Presence of the canine transmissible venereal tumor in the nasal cavity of dogs in the area of Dakar (Senegal). **Can Vet J** 1983; 24: 287-8.

Pérez J, Day MJ, Mozos E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. **Vet Immunol Immunopathol** 1998; 64(2):133-47.

Pérez J, Bautista MJ, Carrasco L, Gomèz-Villamandos, JC, Mozos, E. Primary extragenital occurrence of transmissible venereal tumors: three case reports. **Canine Practice** 1994; 19(1): 7-10.

Quantify interrater agreement with kappa. Disponível em: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1.cfm>. Acesso em 05 de ag, 2003.

Rogers KS, Walker AM, Dillon HB. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. **J of the Am An Hosp Assoc** 1998; 34: 463-70.

Rosenthal RC. Clinical Applications of Vinca Alkaloids. **J Am Vet Med Assoc** 1981; 179(11):1084-6.

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

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

Singh J, Rana JS, Sood N, Pangawkar, GR, Gupta PP. Clinico-pathological studies on the effect of different anti-neoplastic chemotherapy regimens on transmissible venereal tumours in dogs. **Vet Res Commun** 1996; 20(1):71-81.

Strefezzi RF, Xavier JG, Catão-Dias JL. Morphometry of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Vet Pathology** 2003; 40: 268-75.

Theilen GH, Madwell BR. **Veterinary Cancer Medicine**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987. p. 108-303.

Vermooten M. Canine transmissible venereal tumour (TVT): a review. **J of South African Vet Assoc** 1987; 58(3): 147-50.

VonHoldt BM, Ostrander EA. The Singular history of a cancer transmissible tumor. **Cell** 2006; 126: 445-7.

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.

Ward, LS. Epidemiologia do câncer da tiróide no Brasil: apontando direções na política de saúde do país. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2005; 49(4): 474-6.

Weber WT, Nowell PC, Hare WCD. Chromosome studies of a transplanted and primary canine venereal sarcoma. **Journal of the National Cancer Institute** 1965; 3:537-47.

Weinkle TK, Center SA, Randolph JF, Warner KL, Barr SC, Erb HN. Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). **J Am Vet Med Assoc** 2005; 226(11):1869-80.

Weisse C, Soares N, Beal MW, Steffey MA, Drobatz KJ, Henry CJ. Survival times in dogs with right atrial hemangiosarcoma treated by means of surgical resection with or without adjuvant chemotherapy: 23 cases (1986-2000). **J Am Vet Med Assoc** 2005; 226(4): 575- 9.

Wojciechowska JI, Hewson CJ. Quality-of-life assessment in pet dogs. **JAmVet Med Assoc** 2005; 226:722-8.

Yang TJ, Kennedy JR, Andrews RB. Rosette formation of human erythrocytes on canine transmissible venereal sarcoma cells. **American Journal of Pathology** 1976; 83: 359-66.

Yazbek KVB, Fantoni DT. Validity of a health-related quality-of-life scale for dogs with signs of pain secondary to cancer. **J Am Vet Med Assoc** 2005; 226:1354-8

8- ANEXOS

Escala de Desempenho Karnofsky (1949)

100	Normal, no complaints, no evidence of disease;
90	Able to carry on normal activity: minor symptoms of disease;
80	Normal activity with effort: some symptoms of disease;
70	Cares for self: unable to carry on normal activity or active work;
60	Requires occasional assistance but is able to care for needs;
50	Requires considerable assistance and frequent medical care;
40	Disabled: requires special care and assistance;
30	Severely disabled: hospitalization is indicated, death not imminent;
20	Very sick, hospitalization necessary: active treatment necessary;
10	Moribund, fatal processes progressing rapidly;
0	Dead.

Escala de Desempenho Karnofsky simplificada (1952)

- | | |
|---|---|
| 0 | Uncompromised quality of life; |
| 1 | Demonstrating clinical signs directly related to the disease without compromised quality of life; |
| 2 | Compromised quality of life with normal defecation and urination behavior; |
| 3 | Severely compromised quality of life; |
| 4 | Dead. |

9- APÊNDICE

Escala de Desempenho Karnofsky adaptada para caninos

100	Vitalidade excelente, canino sem nenhuma evidência de doença;
90	Vitalidade muito boa, presença de afecção em um órgão ou sistema;
80	Vitalidade boa, mais de um órgão ou sistema apresentando afecção;
70	Vitalidade satisfatória; acometimento mais severo de um órgão ou sistema;
60	Vitalidade regular, ligeira inapetência;
50	Vitalidade irregular, inapetência significativa, comprometimento acentuado de órgãos e sistemas;
40	Vitalidade baixa; canino ainda se mantém em estação, porém não responde ao tratamento sintomático;
30	Vitalidade muito baixa; permanece pouco tempo em estação, necessita de nutrição parenteral, precisando ainda ser contido;
20	Vitalidade extremamente baixa, canino permanece em decúbito, se levantando apenas para urinar e defecar e durante nutrição parenteral não necessita ser contido;
10	Ausência de vitalidade, permanente decúbito;
0	Falecido.