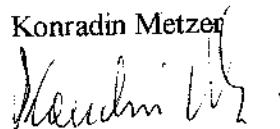


KARIME CURY SCARPELLI

**VARIÁVEIS DERIVADAS DA ANÁLISE DA ESTRUTURA
SINTÁTICA E DADOS CLÍNICOS COMO FATORES
PREDITIVOS EM TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL
CANINO COM TERAPIA DE VINCRISTINA**

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas Médicas, área de Anatomia Patológica do(a) aluno(a) Karime Cury Scarpelli. Campinas, 14 de agosto de 2008.

Prof(a). Dr(a). Konradin Metzer
Orientador(a)



CAMPINAS

2008

KARIME CURY SCARPELLI

**VARIÁVEIS DERIVADAS DA ANÁLISE DA ESTRUTURA
SINTÁTICA E DADOS CLÍNICOS COMO FATORES
PREDITIVOS EM TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL
CANINO COM TERAPIA DE VINCRISTINA**

*Dissertação 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 Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. KONRADIN METZE

CAMPINAS

2008

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

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

Sca76v Scarpelli, Karime Cury
Variáveis derivadas da análise da estrutura sintática e dados clínicos como fatores preditivos em tumor venéreo transmissível canino com terapia de vincristina / Karime Cury Scarpelli. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

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

1. Tumor venéreo transmissível canino. 2. Vincristina. I.
Metze, Konradin. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Variables derived from syntactic structure analysis and clinical features as predictive factors in canine transmissible venereal tumor treated with vincristine

Keywords: • Canine transmissible venereal tumors
• Vincristine

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Konradin Metze
Profa. Dra. Maria Letícia Cintra
Profa. Dra. Rita de Cássia Ferreira

Data da defesa: 14 -08 - 2008

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze

Membros:

1. Profa. Dra. Maria Letícia Cintra

2. Profa. Dra. Rita de Cássia Ferreira

3. Prof. Dr. Konradin Metze

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

Data:

14/08/2008

Dedico esse trabalho ao meu avô Gilberto, que sempre valorizou o conhecimento, à minha avó Amneris, cuja força me serve de modelo, ao meu pai que me ensinou por meio de livros, histórias e filmes a amar a natureza e os animais e ao meu irmão Gilberto a quem eu amo tanto.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Konradin Metze,

À Dra. Ellen Pestilli,

À Médica Veterinária Ms. Maria Luiza de Castro Ramos Valladão,

Ao Dr. Randall Luís Adam.

Aos componentes do Exame de Qualificação e de Defesa de Tese:

Profa. Dra. Maria Letícia Cintra,

Profa. Dra. Rita de Cássia Ferreira,

Profa. Dra. Liliana Aparecida De Ângelo Andrade,

Profa. Dra. Rosana Morandin,

Prof. Dr. Marcelo Emílio Belleti.

À Prefeitura Municipal de Taubaté.

À toda equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Taubaté, especialmente ao Walmir, como importante auxiliar, que foi, no período de coleta de amostras e tratamento dos animais.

À Sra. Jandyra Emília de Sousa Ortiz, por criar a possibilidade de um tratamento humanitário aos animais abandonados de Taubaté, o que foi um dos fatores que possibilitou este trabalho.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa, Laboratório de Hematologia, FCM / Unicamp.

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

À FAPESP pelo apoio ao Projeto Temático 0752015-0R
--

Aos amigos Ana, Sérgio, Pedro e Carol por receberem o Rafael em sua casa com tanto carinho por todas as vezes que precisamos viajar.

Aos amigos Kátia, Cristina, Ana Paula, Luís Cláudio, Vitor, Luana, Virgínia, Malu e Faial, pela amizade que dá forças.

À Maria do Carmo, pelo carinho com que nos recebe e pela competência com que trabalha.

À Dra. Marielza pelo seu cuidado.

Aos amigos do trabalho Mylene, Mário, Ednéia, Sáskia, Fabiana cuja competência em exercer suas funções me permitiu conciliar o fim do mestrado com o dia-a-dia no Centro de Controle de Zoonoses.

Ao Francisco, por seus muitos acertos.

À Marilene.

À Amora, Kzar, Gaia, Paloma, Pandora, Scooby, e tantos outros animais que me inspiram.

Aos animais sem dono, sem nome, mas com muita alegria de viver que chegam todos os dias ao Centro de Controle de Zoonoses de Taubaté.

Agradeço especialmente:

Ao Edson, por ser um companheiro de todas as horas, pelo apoio, compreensão, amor. E especialmente por termos a sorte de partilhar dos mesmos ideais, e valores.

Ao Rafael por ser um filho tão bom.

À minha mãe, por ser fonte inspiradora, por sempre me incentivar nos caminhos do estudo, por sua prontidão em dividir seus conhecimentos em língua portuguesa, e por seu carinho maternal em deixar seus compromissos estando presente em momentos tão importantes.

Aos tios Claudelino, Lúcia, Leila e Nilton, ao meu irmão Aníbal, e sua família pelo interesse que sempre demonstraram.

À Dorinha pelo interesse, carinho e apoio.

“A possibilidade de um câncer contagioso é tanto intrigante quanto assustadora. Portanto, se e quando um câncer mais contagioso surgir, nós não seremos surpreendidos. Sempre vigilante, o melhor amigo do homem nos avisou do perigo que está por vir”

VonHoldt BM, Ostrander EA (2006)

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Tumor Venéreo Transmissível Canino.....	20
1.1.1. Epidemiologia.....	20
1.1.2. Origem.....	20
1.1.3. Mecanismo de Transmissão.....	21
1.1.4. Sítios de Localização.....	22
1.1.5. Evolução Natural.....	22
1.1.6. Características Macroscópicas.....	23
1.1.7. Características Microscópicas.....	23
1.1.8. Diagnóstico.....	24
1.1.9. Tratamento.....	24
1.2. A Análise da Estrutura Sintática e a Sociologia celular.....	25
1.2.1. Sistemas Especializados Quantitativos.....	25
1.2.2. Análise da Estrutura Sintática	26
2. OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	31
2.1. Objetivos Gerais do Estudo.....	32

2.2. Objetivos Específicos.....	32
2.3. Hipóteses.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Comitê de Ética.....	34
3.2. Diagnóstico e Parâmetros Clínicos.....	34
3.3. Coleta de Material e Tratamento.....	35
3.4. Processamento do Material.....	36
3.5. Aquisição das imagens.....	36
3.6. Processamento das imagens.....	38
3.7. Variáveis da Sociologia Celular.....	39
3.8. Análises Estatísticas.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Estudo Clínico.....	44
4.2. Análise da Estrutura Sintática.....	45
4.3. Resposta ao Tratamento.....	46
4.3.1. Variáveis clínicas como fator preditivo da cura.....	47
4.3.2. Variáveis da AES como fator preditivo da cura.....	50
5. DISCUSSÃO.....	53
5.1. Aspectos Gerais.....	54
5.2. Mecanismos Imunológicos no TVTC.....	55
5.3. Variáveis clínicas como fator preditivo da cura	56
5.3.1. Gênero.....	56
5.3.2. Peso.....	56
5.3.3. Animal com proprietário.....	57
5.3.4. Raça.....	57
5.3.4. Volume da massa tumoral.....	57

5.3.5. Época do início do tratamento.....	58
5.3.6. Idade	59
5.4. Variáveis da AES como fator preditivo da cura.....	59
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8. ANEXO	72

RESUMO

RESUMO

O tumor venéreo transmissível canino (TVTC) é uma neoplasia transmitida por transplantação. A quimioterapia com injeções semanais de sulfato de vincristina até remissão completa, é considerada bastante efetiva, mas o tempo de tratamento pode variar. O objetivo do nosso trabalho é apurar quais dados clínicos e morfológicos, obtidos por meio da análise da estrutura sintática do tecido (AES), no momento do diagnóstico, podem prever a resposta do TVTC à quimioterapia com vincristina. Cem (100) cães com TVTC compuseram este estudo prospectivo (85 fêmeas e 15 machos). Somente dois tinham sítio de localização extragenital, o peso médio dos animais foi de 13,2 kg e a idade média 4,4 anos. Os animais foram tratados com sulfato de vincristina (0,025mg/kg), a intervalos semanais, até o desaparecimento completo do tumor macroscopicamente. O número médio de aplicações foi de 5,4. O tempo até a remissão completa foi registrado. O modelo de Cox multivariado indicou que tumores maiores, idade avançada, início do tratamento nos meses quentes foram fatores preditivos desfavoráveis, independentemente, retardando a remissão clínica completa, enquanto que sexo, peso, *status* de animal com proprietário e raça não tiveram valor preditivo. Das variáveis da sociologia celular, obtidas pela Análise da Estrutura Sintática, aplicadas ao modelo de Cox multivariado, a média do ângulo mínimo foi preditiva para a cura, sendo que o maior ângulo mínimo foi favorável a uma remissão mais rápida do TVTC.

ABSTRACT

ABSTRACT

The canine transmissible venereal tumor (CTVT) is a neoplasm transmitted by transplantation. Monochemotherapy with weekly injections of vincristine until complete clinical remission is considered to be very effective, but treatment time may vary. The aim of our study was to find which clinical and syntactic structure analysis data at diagnosis could predict the responsiveness of the CTVT to vincristine chemotherapy. 100 dogs with CTVT entered this prospective study (85 females and 15 males). The tumor mass location was out of genital sites in two cases, the average weight of the dogs was 13,2 kg and the mean age was 4,4 years. They received 0,025 mg of vincristine sulphate weekly up to complete macroscopic remission. The animals were treated with vincristine sulphate (0.025 mg/kg) at weekly intervals until the tumor had macroscopically disappeared. We recorded the time until complete remission. A multivariate Cox regression model indicated that larger tumor masses, increased age and therapy during hot months were independent significant unfavourable predicate factors retarding complete clinical remission, whereas sex, weight, status as owned dog or breed were of no predictive relevance.

Among the data from cellular sociology obtained by syntactic structure analysis tested in the multivariate Cox regression model, the average of the minimum angle was predictive to the cure, considering that the increased minimum angle was favorable to TVTC clinical remission.

TVTC	Tumor venéreo transmissível canino
TGF - β	Fator de transformação do crescimento
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
AES	Análise da estrutura sintática
MST	Minimum spanning tree
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CCZ-T	Centro de Controle de Zoonoses de Taubaté
HE	Eosina e hematoxilina
UFERSA	Universidade Federal da Região do Semi-Árido
FASE-S	Fase Estática
FASE-P	Fase Progressiva
FASE-R	Fase de Regressão
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

Figura 1	Como desenhar um polígono de Voronoi	27
Figura 2	Diagrama de Voronoi mostrando a formação de <i>clusters</i>	27
Figura 3	Sobreposição do diagrama de Voronoi e Delaunay.....	28
Figura 4	Demonstração da triangulação de Delaunay.....	28
Figura 5	Demonstração do Minimum Spanning Tree	29
Figura 6	Corte histológico do TVTC.....	37
Figura 7	Corte histológico do TVTC com núcleos marcados.....	38
Figura 8	Corte histológico do TVTC com sobreposição da triangulação de Delaunay e do MST.....	39
Figura 9	Pontos da triangulação de Delaunay.....	39
Figura 10	Demonstração dos maiores ângulos da triangulação de Delaunay	40
Figura 11	Demonstração do menor ângulo de um triângulo.....	40
Figura 12	Demonstração dos pontos adjacentes a “A”.....	41
Figura 13	Número de vértices do MST.....	41
Figura 14	TVTC genital em cadela.....	44
Figura 15	TVTC genital em cão.....	44
Figura 16	TVTC em mucosa oral de fêmea idosa.....	45
Figura 17	TVTC antes do tratamento.....	46
Figura 18	TVTC uma semana após o início do tratamento.....	46
Figura 19	Corte histológico de TVTC com presença de céls de defesa.....	47
Figura 20	Remissão clínica do TVTC de acordo com variação sazonal.....	48

Figura 21	Corte histológico do TVTC antes do tratamento.....	49
Figura 22	Corte histológico de TVTC sete dias após o início do tratamento	49
Figura 23	Sobreposição da triangulação e MST com distribuição regular....	51
Figura 24	Sobreposição da triangulação e MST com distribuição irregular..	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tumor Venéreo Transmissível Canino

O tumor venéreo transmissível canino (TVTC) é um tumor contagioso encontrado em cães domésticos (*Canis familiaris*) e potencialmente em outros canídeos sociais como o lobo (*Canis lupus*) e o coiote (*Canis latrans*) (vonHoldt e Ostrander, 2006).

Foi descrito pela primeira vez por Jean-Baptiste Huzard no ano de 1820 (Lombard e Cabaine, 1967), porém foi Novinsky, em 1876, quem transplantou com sucesso pela primeira vez esse tumor, comprovando seu caráter transmissível. No final do século XIX e início do século XX, acreditava-se que o TVTC tivesse um caráter infeccioso, o que impulsionou diversas investigações sobre essa neoplasia. Um dos pesquisadores que mais se dedicou a esses estudos, visando principalmente o caráter imunológico do TVTC, foi Sticker, que em 1904 o definiu como um linfoma transmissível (Cohen, 1985). A neoplasia passou a ser também chamada de sarcoma de Sticker (Gobello e Corrada, 2002; Murgia et al., 2006; vonHoldt e Ostrander, 2006).

1.1.1. Epidemiologia

O TVTC é um dos tumores que mais acomete a espécie canina, apresentando uma predominância em animais jovens, não-domiciliados e sexualmente ativos. A presença do TVT foi assinalada em todos os continentes, com maior prevalência nas zonas de clima tropical e subtropical (Silva et al., 2007) tornando-se um grande problema em países em que o acasalamento de cães não é controlado (Nak et al., 2005).

1.1.2. Origem

Sua origem é histiocitária, como foi comprovado por estudos imunoistoquímicos pela expressão de marcadores como a lisosina, vimentina e alfa-1-antitripsina (Mozos et al., 1996). Até mesmo com as buscas de uma possível causa viral, na transmissão do TVTC, partículas virais foram encontradas em células desse tipo de tumor (Rogers, 1997). Há ainda o relato de um caso da presença do protozoário *Leishmania infantum* no citoplasma das células de TVT de um cão, que reforçam a idéia da histogênese a partir do histiócito (Albanese et al., 2002).

A extrema semelhança do genótipo das células de TVTC de diferentes partes do mundo confirma a origem comum de todas essas células (Chu et al., 2001). Murgia et al. (2006), por meio de um modelo de micro-satélites e pela análise de antígenos de leucócito de cão, concluiu que a célula atual do TVT teve origem em um lobo ou em uma raça asiática antiga, entre 200 e 2500 anos atrás.

1.1.3. Mecanismo de Transmissão

O mecanismo de transmissão do TVT ocorre pelo contato de células tumorais de um animal infectado com as mucosas de um outro animal. É transmitido mais facilmente se houver abrasões ou ferimentos na superfície da mucosa. Devido ao coito típico dos cães, ocorrem injúrias tanto na mucosa peniana como na vaginal, proporcionando assim as condições para a transplantação tumoral (Cohen, 1985; Rogers, 1997). Também pode haver ocorrência primária de TVT em mucosa nasal, bucal e ocular devido ao comportamento dos cães de cheirar, lambem e morder. Também há relatos de TVT primário na pele que pode ser ocasionado por mordidas causando lesão na pele e contato com as células tumorais nesse local (Cohen, 1985; Mozos et al., 1996; Ferreira et al., 2000; Albanese et al., 2002).

Suposições preliminares do caráter infeccioso (viral) não foram fundamentadas (Harmelin et al., 2002). Por outro lado, a hipótese de que o TVT seja um enxerto que é disseminado entre a população canina por um animal transplantando-o diretamente a outro, principalmente no momento do coito (vonHoldt e Ostrander, 2006), é fundamentada pelos seguintes achados:

- ◇ o TVT só pode ser transplantado experimentalmente usando-se células vivas e não com filtrados de células ou células mortas (Metcalf et al., 1997; vonHoldt e Ostrander, 2006);
- ◇ o cariótipo do tumor é aneuplóide, mas com marcadores cromossômicos característicos, em tumores de diferentes regiões geográficas (Murgia et al., 2006; vonHoldt e Ostrander, 2006);
- ◇ todos os tumores (TVT) são marcados pela presença de um longo e diversificado elemento nuclear, LINE-1 (*long interspersed nuclear element*)

que funciona como um “transposon” inserido próximo ao gene c-myc (Chu et al., 2001, Mukaratirwa e Gruys, 2003; Murgia et al., 2006);

- ◇ TVTs de diferentes regiões do mundo têm o mesmo número de cromossomos, 59, e a mesma frequência de cromossomos metacêntricos. Na célula somática normal do cão (*Canis familiaris*), o número de cromossomos é 78, sendo 76 cromossomos acrocêntricos e 2 cromossomos sexuais que são metacêntricos (Amariglio et al., 1991; Chu et al., 2001, Mukaratirwa e Gruys, 2003; Murgia et al., 2006).

1.1.4. Sítios de Localização

A localização principal do tumor venéreo transmissível é a genitália externa de canídeos. No macho, é geralmente localizado na porção caudal do pênis, podendo avançar por todo o órgão e até pelo prepúcio, em estágios mais avançados. Na fêmea, a neoplasia localiza-se na porção posterior da vagina, freqüentemente na junção com o vestíbulo. Algumas vezes cerca o orifício da uretra e, conforme cresce, pode ser exposto pela vulva tomando-a também (Cohen, 1985; Das e Das, 2000). Algumas vezes, o TVT pode se desenvolver em sítios extragenitais, mesmo quando não há lesão genital, como cavidade nasal, pele, boca (Parent et al., 1983; Pérez et al., 1994; Nak et al., 2005).

Metástases são pouco freqüentes no TVT, podendo ocorrer em menos de 5% dos casos. Foram reportadas metástases na pele, linfonodos regionais, olhos, cérebro, pituitária, região mamária, torácica e abdominal (Nak et al., 2005).

1.1.5. Evolução Natural

Segundo Mukaratirwa et al. (2006), tanto nos casos de ocorrência natural quanto nos experimentais, o TVTC primeiro cresce rapidamente (fase progressiva), logo após a transmissão, seguido por um crescimento mais lento (fase estática) e posterior regressão espontânea (fase de regressão). O TVTC tem sido estudado experimentalmente como modelo de imunidade tumoral, mas existem poucas descrições de características microscópicas da regressão natural (Gonzales et al., 2000).

A ocorrência de TVT em outros canídeos como a raposa, o chacal, o lobo e o coiote e mesmo sua presença e evolução como um parasita, em um hospedeiro canino sadio, deve-se ao fato de que o TVT, secreta TGF- β , que inibe as atividades do antígeno de histocompatibilidade principal (MHC), classe I, reduzindo sua ação, e os MHC, classe II, ficam completamente inativos. Também inibe a atividade das células *natural killers* (Hsiao et al., 2002; Murgia et al., 2006; Liu et al., 2008).

1.1.6. Características macroscópicas

Nos sítios primários, o TVT tem muitas vezes aspecto de *couve-flor*, pode ser pedunculado, nodular, papilar ou multilobulado. À palpação, o TVT é um tumor de consistência firme, mas friável e hemorrágico e a superfície quase sempre exhibe ulcerações (Amaral et al., 2004).

1.1.7. Características microscópicas

Citologia: o tumor constitui-se de células ovóides ou redondas em abundância, com citoplasma levemente basofílico ou pálido, com vacúolos espalhados aleatoriamente. A cromatina nuclear é grosseiramente agregada com um nucléolo proeminente; a proporção entre núcleo e citoplasma é relativamente alta; há ocorrência de mitoses; dá-se a presença de células inflamatórias, predominantemente linfócitos (Papazoglou et al., 2001; Amaral et al., 2004).

Histologia: as células redondas, ovais ou poliédricas estão arranjadas em massas compactas intercaladas por filamentos de tecido fibrovascular ou em cordões com aspecto trabecular (Papazoglou et al., 2001).

Ao exame ultra-estrutural, células típicas de TVTC têm núcleo arredondado ou ovalado, 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, polirribossomos, 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).

1.1.8. Diagnóstico

O diagnóstico deve ser baseado em aspectos clínicos como lambedura excessiva da vulva ou do pênis, relatos da ocorrência de hemorragias e pesquisa do estilo de vida do animal. É necessária a confirmação por exame citológico e/ou histológico (Nak et al., 2005).

1.1.9. Tratamento

Os tratamentos podem ser: cirurgia, imunoterapia, radioterapia e quimioterapia, sendo a recorrência do TVT após cirurgia muito frequente (Das e Das, 2000).

Resultados positivos para a cura com a imunoterapia têm sido esporádicos (Rogers, 1997).

Radioterapia tem sido efetiva contra o TVT, mas a imobilização do animal requer o uso de agentes químicos tranquilizantes, o que a torna menos prática.

A quimioterapia também dá bons resultados (Bueno et al., 2003) e um grande número de agentes quimioterápicos e protocolos têm sido usados. Agentes anti-mitóticos como a ciclofosfamida, metotrexate, vincristina, vimblastina ou a doxirubicina podem ser empregados. A terapia única com vincristina é a mais efetiva. A dose recomendada é 0,5 mg/m² de superfície corporal, o que equivale a 0,025 mg/kg de peso vivo, em aplicações intravenosas semanalmente até a remissão total (Rogers, 1997; Das e Das, 2000; Papazoglou et al., 2001; Nak et al., 2005).

A vincristina é um alcalóide extraído da planta *Cataranthus roseus*. Mesmo sendo a vincristina um fármaco antigo, seu mecanismo de ação ainda está sob investigação. A ação mais provável está relacionada com a inibição da formação de microtúbulos no fuso mitótico, pela ligação da vincristina especificamente à tubulina e bloqueio da capacidade desta proteína de se polimerizar em microtúbulos, resultando em parada da divisão celular na metáfase. Nos cães a liberação da vincristina depois da administração é bifásica. A meia-vida da distribuição do quimioterápico é 15 minutos e a meia-vida da eliminação é de 75 minutos. A concentração

máxima nos tecidos acontece em uma hora, mas sua penetração no sistema nervoso central é mínima. A droga é metabolizada pelo fígado. Sua liberação é feita pela bile, e é eliminada pelas fezes. O efeito anti-neoplásico da droga é resultado de sua habilidade em manter a célula na metáfase. Ela interage com os microtúbulos com a proteína citoplasmática, inibindo a formação dos fusos (Golden e Langston, 1988; Gidding et al., 1999).

1.2. Análise da Estrutura Sintática e a Sociologia celular

O primeiro pesquisador a definir a sociologia celular foi *Rosine Chandebois*, que em 1977 observou que a individualidade de cada célula é imposta pela sua localização entre as outras, um fenômeno chamado de “*efeito da posição*”, que é o resultado de controles supra e extra-celulares, impondo características específicas a cada célula e conseqüentemente, definindo o padrão externo.

Portanto, a sociologia celular é o fenômeno da interação entre as células e da influência que cada célula exerce sobre a outra (Bigras et al., 1996; Sudbo, 2000; Matos et al., 2002). Essa interação ocorre desde a diferenciação celular até a morte por apoptose, no organismo sadio, refletindo-se na morfologia dos tecidos (Morel et al., 2001).

Assim como na fisiologia, a troca de informações entre as células ocorre na patologia dos tecidos, com alterações arquiteturais (Morel et al., 2001; Matos et al., 2002; Palmer et al., 2008). Assim, diante das indicações da importância do comportamento social da célula, vários estudos foram realizados, utilizando esse conhecimento, para sistematizar o diagnóstico em patologia e obter prognósticos compatíveis com a realidade (Weyn et al., 1999; Raby et al., 2001; Kayser et al., 2002; Matos et al., 2002; Sudbo et al., 2000).

1.2.1. Sistemas Especializados Quantitativos

Sabe-se que o diagnóstico histológico convencional conta com a interpretação visual, que sofre pela subjetividade e pela limitação da reprodutibilidade (Keenan et al., 2000; Waldemarin et al., 2004). Essa questão ainda é um desafio para os patologistas (Sudbo et al., 2000a). Portanto, da necessidade de ferramentas diagnósticas, gerando resultados reproduzíveis, surgem os sistemas especializados quantitativos, que são dispositivos automáticos, desenvolvidos

por meio de algoritmos (Guillaud et al., 1997; Wein et al., 1998; Matos et al., 2002), com o propósito de atribuir valores numéricos à morfologia dos tecidos. Devido à precisão, esses sistemas atingem padrões de qualidade que são difíceis de obter em procedimentos diagnósticos feitos pelo patologista (Wein et al., 1998; Geusebroek, 2000).

Os sistemas especializados quantitativos são divididos em dois grandes grupos: o primeiro que avalia características citométricas ou morfométricas do núcleo celular individualmente, mensurando forma, dimensões, contorno (Adam et al., 2004; Waldemarin et al., 2004; Ferreira et al., 2006; Adam, 2006; Valladão, 2007) e o segundo grupo que avalia o contexto ou análise da estrutura sintática (AES), que quantifica o arranjo ou rearranjo das células no tecido (Darro et al., 1993; Numahara et al., 2000). Por meio da sobreposição de figuras gráficas, aos cortes de tecidos, com base na posição dos núcleos celulares, é possível verificar diferentes padrões de distribuição celular, compondo uma importante ferramenta no diagnóstico e prognóstico em patologia (Darro et al., 1993; Guillaud et al., 1997; Duyckaerts e Godefroy, 2000).

1.2.2. Análise da Estrutura Sintática

A distribuição espacial das células, pode ser caracterizada e quantificada usando-se programas constituídos por algoritmos que se utilizem da sociologia celular, como foi feito por Weyn et al., 1999; Raby et al. 2001; Morel et al., 2002; Matos et al., 2002, usando três modelos geométricos chamados diagrama de Voronoi, diagrama de Delaunay e *minimum spanning tree* (MST). Esses métodos aplicados ao tecido estudado fornecem informações úteis sobre a distribuição espacial e as relações de vizinhança das células. A partir das coordenadas dos elementos da imagem podemos calcular a distribuição espacial da população celular (Matos et al., 2002).

O diagrama de *Voronoi* (figura 1) é composto por um mosaico de polígonos. Cada lado desse polígono está à meia distância das células vizinhas. Esse diagrama fornece informações sobre a distribuição espacial; as áreas dos polígonos não variam muito quando a distribuição celular é regular, ao contrário, polígonos pequenos e grandes são encontrados quando há formação de *clusters* (figura 2).

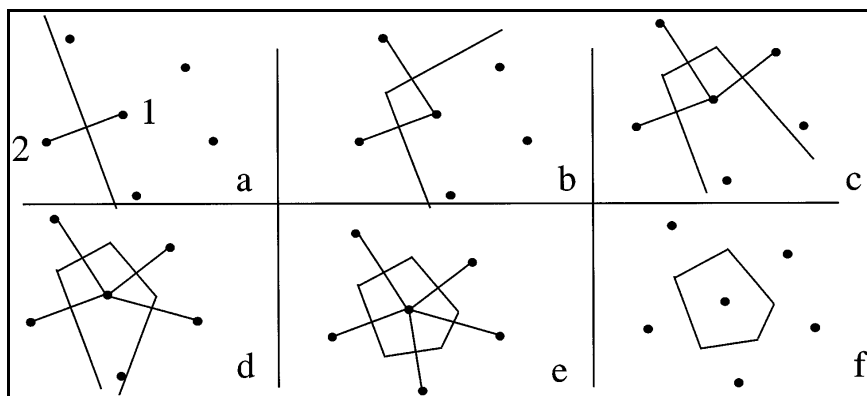


Figura 1: Como desenhar um polígono de Voronoi.

Seis pontos são representados. Em “a” o polígono de Voronoi do ponto denominado 1, é construído seqüencialmente. Uma linha é desenhada, localizada a meia distância entre 1 e 2 e perpendicular à linha entre 1 e 2 é traçada uma mediana. Em “b”, o mesmo é feito. As duas medianas desenhadas terminam em sua intersecção (c) e um terceiro lado é desenhado agora. Em “d” e em “e” o polígono é completado. As linhas desenhadas entre 1 e cada um de seus vizinhos são apagadas, em “f” vemos o polígono de Voronoi. O ponto não fica necessariamente no centro do polígono. Pela definição, há somente um ponto por polígono (modificado a partir de Duyckaerts e Godefroy, 2000).

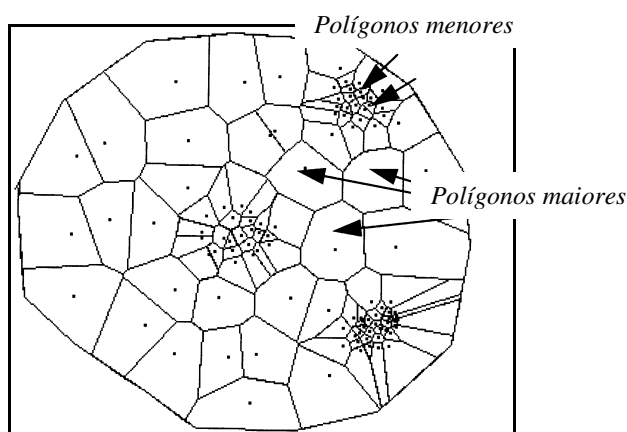
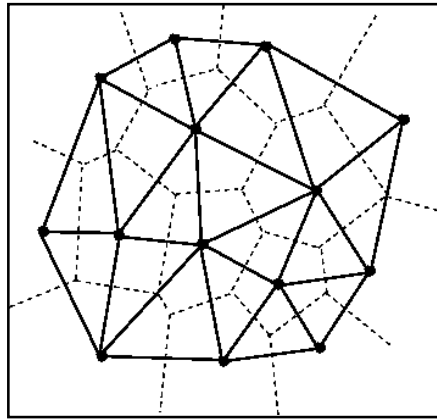


Figura 2: “Clusters”. Este é um diagrama de três clusters, que mostra que os polígonos são menores nos clusters e maiores entre eles (modificado a partir de Duyckaerts e Godefroy, 2000).

A triangulação de *Delaunay* e o *minimum spanning tree* são derivados do diagrama de *Voronoi*, sendo a triangulação de *Delaunay* o dual (figura 3) do diagrama de *Voronoi* (Sudbo et al.,; 2000).



Fonte: <http://www.comp.lancs.ac.uk/~kristof/research/notes/voronoi>

Figura 3: diagrama de *Voronoi* (linha tracejada) sobreposto à triangulação de *Delaunay* (linha cheia).

Triangulação de *Delaunay* (figura 4):

Em um grupo de pontos, são formados triângulos entre os vizinhos mais próximos, sendo que os vértices dos triângulos são os pontos, e que nenhum outro ponto poderá estar contido no círculo traçado entre os três vértices de cada triângulo de *Delaunay* (Meijer et al., 1997).

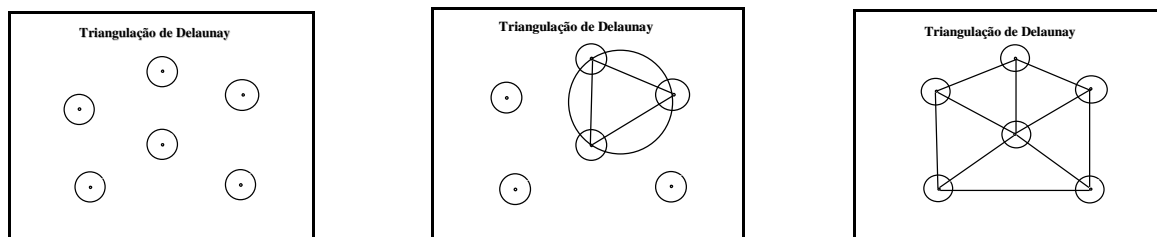


Figura 4: demonstração da triangulação de *Delaunay* (modificado a partir de Meijer et al., 1997).

O *minimum spanning tree* (MST) ou árvore geradora mínima (figura 5) é a árvore que conecta todos os objetos em uma população, de forma que a soma do comprimento das linhas seja mínimo (Weyn et al., 1999; Palmer et al., 2008).

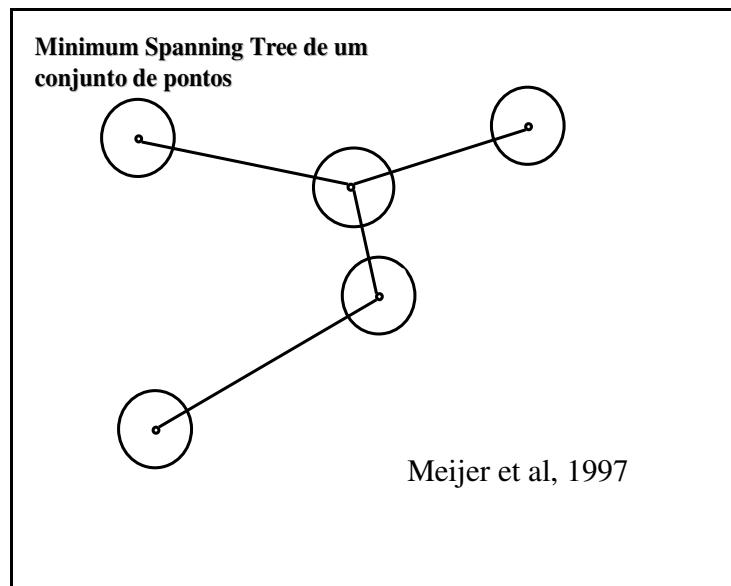


Figura 5: Demonstração do M.S.T.

A análise da estrutura sintática mostrou ser ferramenta útil no diagnóstico de glioma maligno, diferenciando-o do tecido normal e de tecido com reação inflamatória benigna (Demir et al., 2005).

Na comparação da distribuição de células nervosas no córtex cerebral de pacientes com epilepsia e grupo controle, variáveis como a média da distância entre vizinhos mostraram que, em amostras de pessoas com epilepsia há uma maior concentração de células nervosas que no tecido normal (Eriksson et al., 2003).

Bigras et al. (1996), com a utilização do diagrama de Voronoi e do MST, diferenciou carcinóide típico, carcinóide atípico e carcinoma de células pequenas do pulmão, observando variáveis como média de arredondamento do polígono e comprimento das retas do MST.

Weyn et al., (1999) comparou adenocarcinoma com mesotelioma e tecido hiperplásico com mesotelioma, de ocorrência em pacientes humanos e nas duas situações a aplicação dos grafos gerou variáveis significativas no diagnóstico do mesotelioma, como a média da entropia entre as retas do MST, média da área dos polígonos de Voronoi e distância do vizinho mais próximo.

Raby et al., (2001) obtiveram parâmetros para identificar a agressividade da célula tumoral pela verificação de sua capacidade invasiva com a AES. Também o comportamento proliferativo e migratório das células tumorais de epitélio brônquico *in vitro* foi detalhadamente observado por meio da análise da sociologia celular (Matos et al., 2002).

Variáveis obtidas pelo MST, como distância entre células tumorais vizinhas, distância entre células tumorais e outras células e formação de agrupamentos, deram a indicação do grau de entropia, tornando possível identificar características capazes de prever o comportamento clínico de carcinoma cólon-retal e a ocorrência de metástases pulmonares (Kayser et al, 2002).

Por meio da AES, foram obtidos fatores prognósticos e preditivos, em carcinoma de ovário em mulheres, como as variáveis: média do comprimento do MST, comprimento mínimo do MST e comprimento máximo (Palmer et al., 2008).

Portanto a análise da estrutura sintática, como ferramenta para medir a sociologia celular, pode ser usada para diagnóstico e para avaliação do prognóstico de inúmeras doenças.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

2.1. Objetivos Gerais

Este estudo almeja a associação de dados clínicos a parâmetros da sociologia celular, a fim de obtermos resultados que possam prever o comportamento do TVTC tratado com sulfato de vincristina.

2.2. Objetivos Específicos:

Com base nos objetivos gerais, destacamos os seguintes objetivos específicos:

- A. observar o desempenho de 100 animais com TVT submetidos à terapia com sulfato de vincristina;
- B. documentar a extensão do TVT nos 100 animais;
- C. observar se os dados clínicos são preditivos do comportamento do TVTC nos animais estudados;
- D. avaliar parâmetros da sociologia celular aplicados às biópsias dos tumores estudados;
- E. verificar se os parâmetros obtidos pela sociologia celular são preditivos da cura do TVT nos animais estudados;

2.3. Hipóteses

Ho: Os dados clínicos e os parâmetros da sociologia celular, obtidos por meio da análise da estrutura sintática dos tecidos, não fornecem variáveis prognósticas ou preditivas do tempo de cura no tumor venéreo transmissível canino.

H₁: Os dados clínicos e os parâmetros da sociologia celular, obtidos por meio da análise da estrutura sintática dos tecidos, fornecem variáveis prognósticas ou preditivas do tempo de cura no tumor venéreo transmissível canino.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

Os procedimentos realizados nesta pesquisa estão de acordo com as normas de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (1988) e foram aprovados pela Comissão de Ética de Pesquisa em Animais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo nº 731-2 em anexo).

3.2. Diagnóstico e Parâmetros Clínicos

Foram incluídos neste estudo prospectivo, 100 animais diagnosticados clinicamente com tumor venéreo transmissível canino, de ocorrência natural. Desses animais, 53 foram recolhidos da rua pelo Centro de Controle de Zoonoses de Taubaté (CCZ-T), e permaneceram nesse órgão durante a pesquisa. Os outros 47 tinham proprietário e eram levados semanalmente para o tratamento. Todos os animais tinham um estilo de vida livre, com acesso à rua, antes do diagnóstico.

A seleção dos animais com TVT foi feita de Julho de 2003 a Junho de 2006, de forma consecutiva.

Os animais que permaneceram no CCZ-T eram alimentados com ração comercial, própria para a espécie, recebiam água fresca e permaneciam abrigados em canis. Os proprietários dos outros animais eram orientados quanto ao alimento e ao manejo adequados.

Quando havia uma suspeita de TVTC, o animal era examinado por duas médicas veterinárias que faziam diagnóstico clínico da presença do tumor. Após o diagnóstico, outros parâmetros eram observados, como a idade estimada, o peso, a cor do animal e o estado clínico.

Para a estimativa da idade dos animais eram seguidos critérios como observação da dentição (presença de canino decíduo, presença de tártaro e sinais de desgaste), presença de pêlos brancos no focinho e/ou corpo, tônus muscular e flacidez da pele. A idade era estipulada com a concordância de duas veterinárias.

As datas do início do tratamento e de todas as aplicações também eram anotadas, o que nos proporcionou observar a variável *estação do ano*. Na região em que se situou a pesquisa o clima é subtropical, mas entre junho e agosto, ondas de frio diminuem consideravelmente a temperatura. Esse período foi chamado de *meses frios* (média da temperatura mínima mensal:

9,9°C ± 3,8°C; média da temperatura máxima mensal: 25,5°C ± 3,1°C). Em contraste com os outros meses do ano definidos como *meses quentes* (média da temperatura mínima mensal: 15,5°C ± 3,1°C; média da temperatura máxima mensal: 27,4°C ± 2,8°C).

Os animais recebiam 0,1 mg/Kg de sulfato de atropina pela via subcutânea, e 15 (quinze) minutos depois eram anestesiados com 3 mg/Kg de cloridrato de xilazina (agonista adrenérgico) e 15 mg/Kg de cloridrato de ketamina (anestésico cataleptóide e dissociativo), por via intramuscular.

Era então possível a obtenção das medidas da massa tumoral. Três medidas foram tomadas com a utilização do paquímetro (medidas a, b, c) e a partir dela foi calculado o volume do tumor, pela forma do elipsóide $\frac{4}{3}\pi abc$ sendo a,b, c semi-eixos.

Todos os dados obtidos eram anotados na ficha do animal que era numerada e essa numeração servia de referência para a identificação das amostras dos animais.

Durante as semanas de tratamento qualquer ocorrência com a saúde do animal era anotada na ficha. Interrupções no tratamento também eram anotadas. No caso de ocorrência de sintomas de outras doenças, os animais eram medicados de acordo com a necessidade e os protocolos estabelecidos pelo CCZ-T.

Animais que apresentaram complicações ou estavam em sofrimento, sem apresentar resposta ao tratamento foram eutanasiados.

3.3. Coleta de Material e Tratamento

Após serem anestesiados e as massas tumorais medidas os animais recebiam infusão intravenosa de solução fisiológica. Era então coletada uma amostra do tecido tumoral com punch nº 5. Três lâminas com esfregaço citológico eram feitas a partir desse fragmento do tumor e eram armazenadas em álcool 70° e o próprio fragmento mantido em formalina tamponada por 24 horas para posterior processamento. Os materiais produzidos (lâminas de citologia, bloco de parafina e lâminas de histologia) eram identificados com o número do animal e a letra “A”, representando a primeira coleta desse animal.

O quimioterápico escolhido foi o sulfato de vincristina, por ser a droga com os melhores resultados para o tratamento do TVTC, como comprovado na literatura. A dose utilizada foi de 0,6 mg/m² de superfície corporal ou 0,025 mg/kg de peso vivo, seguindo tabela de conversão de peso em metros quadrados para os cães (Bichard e Sherding, 1998).

Sete dias depois, todo o procedimento era repetido para obtermos os dados após uma semana de tratamento (estado clínico do animal, peso, medidas do tumor e coleta de novas amostras). O material era mais uma vez identificado com número do animal e a letra “B” representando a segunda coleta.

O tratamento quimioterápico era administrado e repetido semanalmente, até a cura completa. Nas semanas após a coleta “A” e “B”, no momento do tratamento, os animais eram examinados clinicamente e pesados, nenhum sedativo ou anestésico era administrado e qualquer outro medicamento era feito somente mediante a apresentação de sintomas de outras doenças.

O tratamento prosseguia semanalmente até a remissão clínica completa, quando ainda era aplicada uma dose de segurança.

3.4. Processamento do Material

O processamento histológico das biópsias colhidas consistiu em desidratação numa série de álcoois de concentração crescente (70%, 90% e 3 absolutos), durante 1 (uma) hora cada uma; diafanização em 2 (dois) banhos, de 1 (uma) hora cada um, em xilol e à temperatura de laboratório. Em seguida, foram realizados 2 (dois) banhos de parafina a 60°C, de 1 (uma) hora cada um, e os fragmentos assim processados foram emblocados com identificação. O material impregnado em parafina foi cortado, em espessura aproximada de 4 a 5 µm e fixados em lâmina. Essas lâminas foram coradas com hematoxilina durante 60 (sessenta) segundos. As lâminas então foram passadas, 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, as lâminas com os cortes histológicos foram coradas com eosina durante 30 segundos, desidratadas e cobertas com lamínula.

As lâminas com esfregaço citológico, também foram coradas com hematoxilina e eosina e usadas para diagnóstico.

Todas as lâminas de esfregaços citológicos e histológicos foram preparadas, coradas e cortadas no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental do Laboratório de Anatomia Patológica Experimental, 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.

3.5. Aquisição das Imagens

Imagens provenientes dos cortes histológicos 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 vezes em óleo de imersão, intensidade de luz 5 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.

Dos 100 (cem) casos 94 (noventa e quatro) foram fotografados, seis sofreram problemas de processamento e não puderam ser utilizados devido à qualidade insuficiente.

As lâminas com cortes histológicos (figura 6) foram inspecionadas por inteiro, sendo fotografados todos os campos, exceto aqueles em que havia hemorragia ou necrose. Foi feita uma média de 29 imagens por caso com cerca de 50 núcleos marcados por imagem. O total de imagens digitalizadas foi de 2829. Todas as imagens foram nomeadas automaticamente.

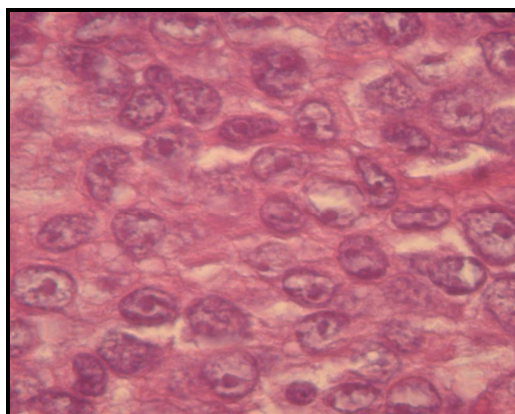


Figura 6: corte histológico de TVTC corado pela hematoxilina e eosina (aumento de 100 vezes).

3.6. Processamento das Imagens

Para obtenção das variáveis da sociologia celular as imagens foram inseridas no aplicativo "Sociology" (programa a ser registrado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, desenvolvido pelo Dr. Randall Luis Adam, pesquisador colaborador da UNICAMP). Os núcleos de cada célula de TVTC foram marcados manualmente (figura 7).

Com a utilização de algoritmos do próprio programa as imagens geométricas foram automaticamente sobrepostas a partir dos pontos marcados nos núcleos.

Assim foram desenhadas as triangulações de Delaunay e o Minimum Spanning Tree de todas as imagens (figura 8).

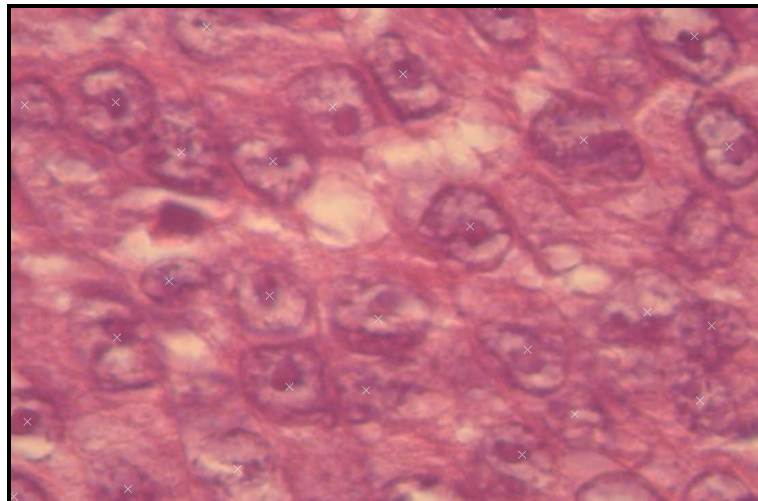


Figura 7: Imagem de corte histológico de TVTC em microscopia óptica no aumento de 100 vezes, com os núcleos marcados manualmente com o auxílio do programa “sociology”.

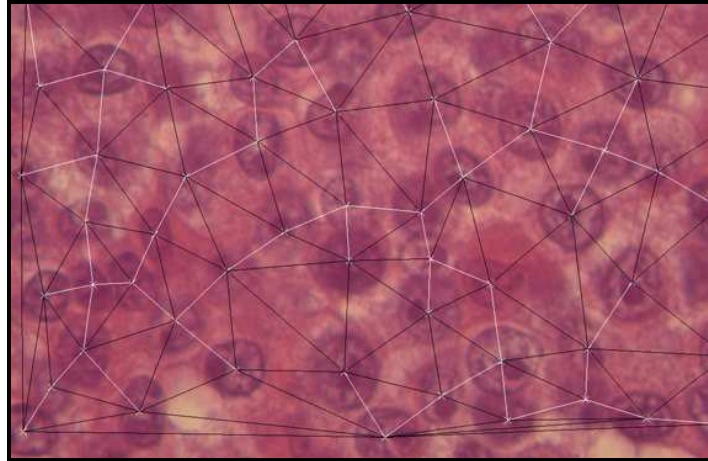


Figura 8: corte histológico de TVTC com a sobreposição da triangulação de Delaunay (todos os triângulos) e do minimum spanning tree (linha branca), a partir dos núcleos celulares marcados.

3.8. Variáveis da Sociologia Celular

As variáveis avaliadas foram:

- ◊ Média do n° de pontos que serão vértices de um triângulo: essa variável mostra quais pontos marcados ou núcleos participarão da triangulação de Delaunay (figura 9).

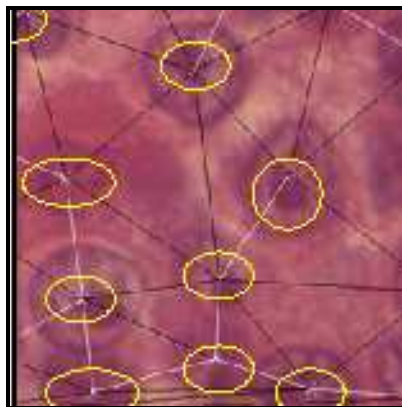


Figura 9: Os pontos circundados fazem parte da triangulação

- ◇ Média da área dos triângulos da triangulação de Delaunay: por meio de um algoritmo, o programa calcula todas as áreas dos triângulos por imagem e nos dá a média
- ◇ Média do ângulo máximo da triangulação de Delaunay: o ângulo máximo é o maior ângulo de cada triângulo (figura 10)

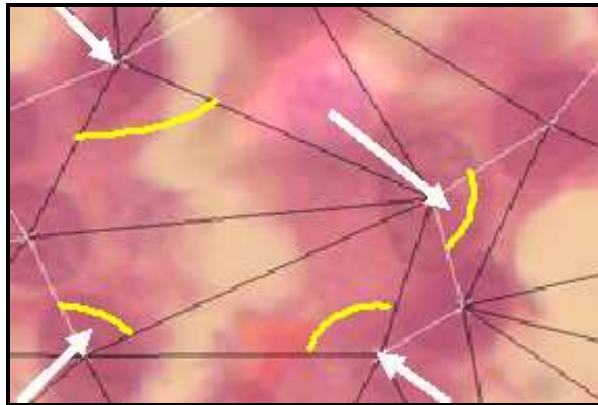


Figura 10: as setas brancas estão apontando os maiores ângulos (em amarelo) dos triângulos mostrados inteiros na imagem.

- ◇ Média do ângulo mínimo da triangulação de Delaunay: o ângulo mínimo é o menor ângulo do triângulo de Delaunay (figura 11)

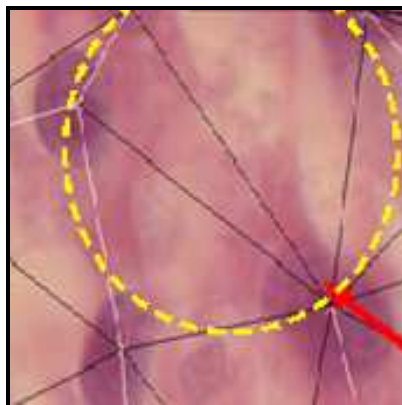


Figura 11: a seta branca mostra o ângulo mínimo do triângulo.

- ◇ Média do perímetro dos triângulos
- ◇ Média do número de pontos adjacentes a cada ponto na triangulação de Delaunay, corresponde ao número de faces do polígono de Voronoi (figura 12)

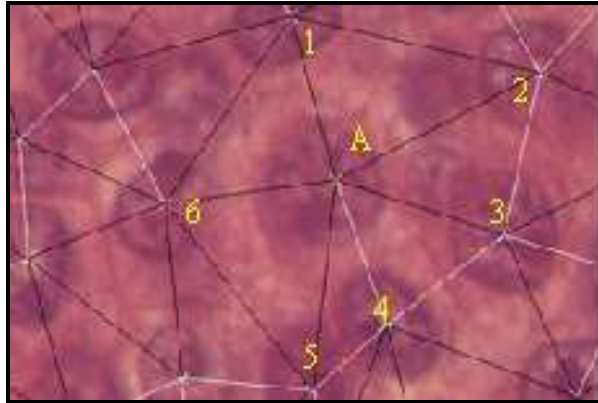


Figura 12: Dado um ponto “A”, os pontos adjacentes a ele são 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

- ◇ Média do número de vértices do Minimum Spanning Tree (figura 13)

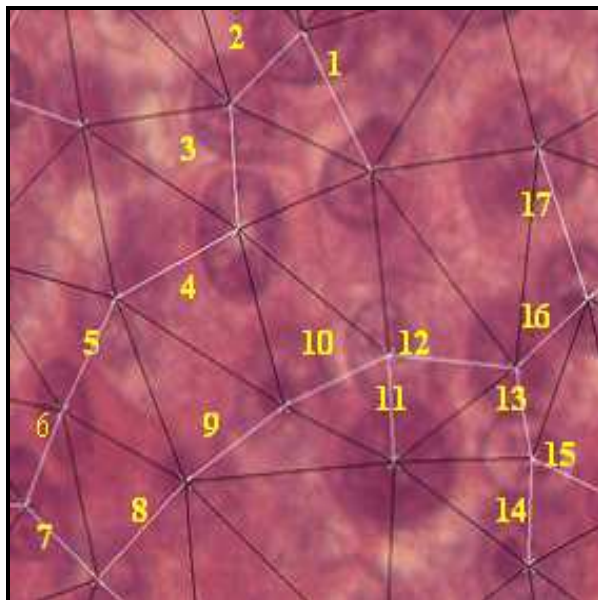


Figura 13: Número de vértices do MST

- ◇ Média da distância do 1º vizinho
- ◇ Média da distância do 2º vizinho (até o 20º vizinho)
- ◇ Média da distribuição normal dos cumprimentos dos vértices do MST.

Foram sempre calculadas as médias por caso, dos valores encontrados em cada imagem.

Para o aplicativo Sociology foram consideradas somente as áreas dos triângulos finitos, com o objetivo de eliminar o efeito de borda onde os pontos marcados poderiam gerar triângulos com área infinita.

3.9. Análises Estatísticas

O tempo de observação foi contado desde o início da terapia até a remissão completa final.

Foram considerados censurados animais que morreram durante a terapia antes de obter remissão clínica, ou quando a terapia foi interrompida. Para efeito de cálculo foi contado o tempo até a ocorrência do evento censura.

Curvas de tempo-evento foram analisadas de acordo com Kaplan-Meier e teste de log-rank, assim como a regressão de Cox univariada.

As variáveis da análise da estrutura sintática e da clínica que obtiveram $p < 0,10$ no modelo univariado da regressão de Cox foram testadas na análise multivariada (Metze, 2000; Adam, 2006).

Todas as análises foram realizadas com os programas Winstat e SPSS 10.0.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo Clínico

Dos 100 casos de TVT ocorridos naturalmente nos cães, 98 eram localizados nos genitais (figuras 15 e 16) e 2 extragenitais, os quais ocorreram na conjuntiva de um macho jovem e mucosa oral de uma fêmea idosa (figura 16).



Figura 14: TVT genital em cadela.



Figura 15 : TVT genital em cão.

Oitenta e cinco (85) fêmeas e 15 machos compuseram o estudo; 88 cães sem raça definida, 12 cães de raças variadas, sendo três (3) da raça Cocker Spaniel, dois (2) da raça Poodle, dois (2) da raça Pinscher, um (1) da raça Boxer, um (1) da raça Pastor Alemão, um (1) da

raça Sheep Dog, um (1) da raça Husky Siberiano, um (1) da raça Duchshund. Dos animais, 54 tinham proprietário.

A partir dos dados obtidos no momento do diagnóstico tivemos que: a média do volume do tumor foi de 23,5 cm³.



Figura 16: TVT em mucosa oral de fêmea idosa.

Os pesos dos animais variavam de 2 a 30 kg, sendo a média do peso corporal de 13,2 kg; as idades estimadas variaram de 1 a 12 anos, ficando a média em 4,4 anos.

4.2. Análise da Estrutura Sintática

A média do número de pontos marcados nas imagens provenientes da coleta A foi 51,8; a média do número de triângulos de Delaunay foi 79,4. A média dos perímetros da triangulação foi 37,3 e a média do comprimento dos vértices do MST foi 8,8. A média do ângulo mínimo foi 47,8, variando de 44,9 a 55,0. A média do ângulo máximo foi de 126,4, variando de 106,9 a 134,9. A média das áreas dos triângulos na primeira coleta foi 64,6.

4.3. Resposta ao Tratamento

A resposta ao tratamento na primeira semana mostrou-se macroscopicamente, com uma mudança do volume médio do tumor de 23,5 cm em A (primeira aplicação) para 10,4 cm em B (segunda aplicação) como exemplificado nas figuras 17 e 18.



Figura 17: TVTC de fêmea (nº 12) antes do tratamento.



Figura 18: TVTC de fêmea (nº 12) uma semana após a primeira aplicação de vincristina.

O número médio de aplicações de vincristina, necessários para obtenção de remissão clínica total, foi 5,4 (variando de 1 a 17).

Um macho, com idade aproximada de 8 anos, não teve remissão total em 17 semanas de tratamento. Após ser submetido a orquiectomia, nenhum sinal macroscópico do TVTC foi observado.

4.3.1. Variáveis clínicas como fator preditivo da cura

As variáveis obtidas ao diagnóstico: gênero ($p=0,13$), peso ($p=0,71$), animal com proprietário ($p=0,95$) e raça ($p=0,71$) não tiveram valores preditivos para a cura.

Portanto, no presente estudo, machos e fêmeas tiveram a mesma resposta ao tratamento, assim como os pesos variáveis entre os diversos animais e ser ou não de raça não influenciou na cura.

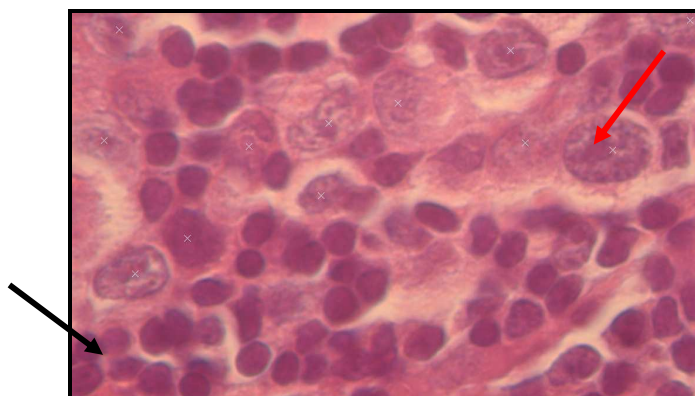


Figura 19: corte histológico de TVT com a presença de células de defesa (seta preta) infiltradas entre as células tumorais (seta vermelha) ilustrando o processo de cura.

Na regressão de Cox univariada um maior volume da massa tumoral ($B= -0,287$ e $p= 0,0039$) e tratamento durante os meses quentes ($B= -0,940$ e $p= 0,0025$) mostraram retardar significativamente a cura do TVTC.

Entre os animais observados, 50% tiveram cura em 3 semanas, quando o tratamento foi iniciado nos meses frios, mas somente em 7 semanas quando iniciado no período de calor (figura 20).

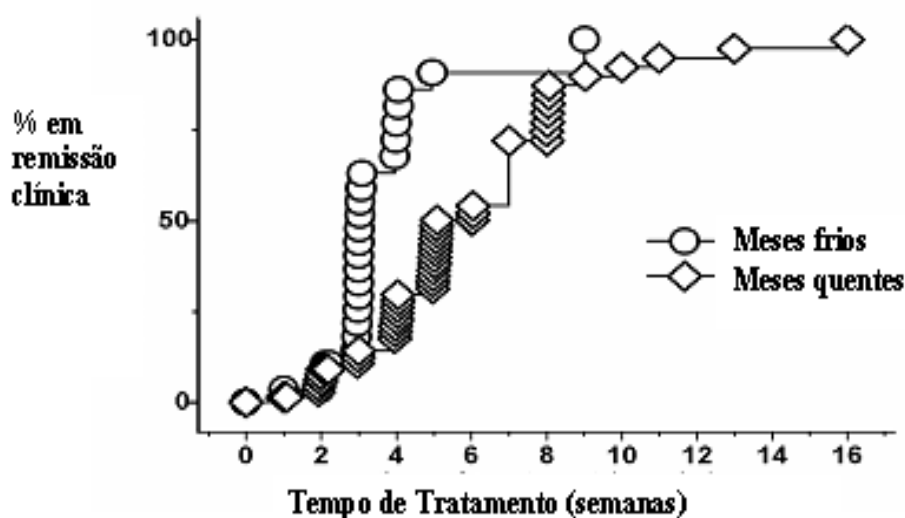


Figura 20 : Remissão clínica de cães com TVT tratados com sulfato de vincristina, de acordo com a variação sazonal.

A variável *idade estimada*, teve como resultado $B = -0,1409$ e $p = 0,05$, na análise univariada da regressão de Cox, indicando influenciar na cura. Portanto participou do modelo multivariado, junto com as outras variáveis significativas.

Como resultados no modelo de Cox multivariado, as variáveis indicando, maior volume do tumor ($B = -0,2159$ e $p = 0,05$), terapia durante os meses quentes ($B = -0,6783$ e $p = 0,05$), e idade avançada ($B = -0,1798$ e $p = 0,02$) foram confirmadas como variáveis independentes desfavoráveis para o tempo de cura. Significando que tumores maiores, temperatura ambiente alta e animais mais velhos precisam de um tratamento mais longo.

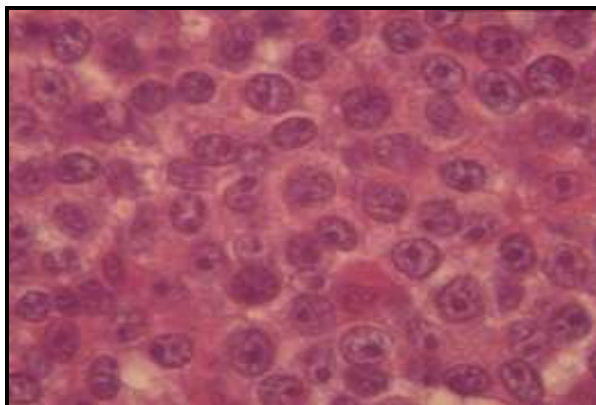


Figura 21: corte histológico de TVTC (n° 89/coleta A) antes do tratamento quimioterápico.

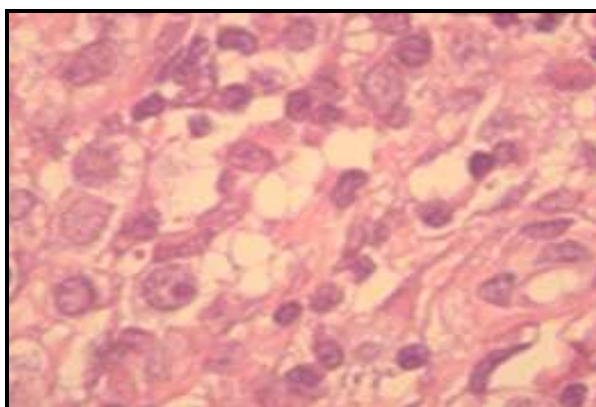


Figura 22: corte histológico de TVTC (n° 89/coleta B) uma semana depois da primeira aplicação de vincristina

4.3.2. Variáveis da análise da estrutura sintática como fator preditivo da cura

O número médio de pontos que são vértices do triângulo, na primeira coleta (coleta A) foi de 51,8 e na segunda coleta (coleta B), a média foi 29,4 e em ambos os casos o valor de p não foi significativo para a previsão do tempo de cura do TVTC.

A média da área dos triângulos da triangulação de Delaunay foi 64,6 mc² na coleta A e 121,2 mc² na coleta B e também não teve significância em prever o comportamento do TVTC.

O perímetro dos triângulos; o número de vértices do MST; o ângulo máximo da triangulação de Delaunay; a distância do 1º vizinho; a distância do 2º vizinho; a distância do 3º vizinho; a distância do 4º vizinho; a distância do 5º vizinho foram testados pelo modelo de cox univariado e não demonstraram qualquer influência no tempo de cura do TVTC tratado com vincristina (tabela 1).

Variável	Média	Significância
PVT	51,8	P= 0,3
AT	64,6 mc ²	P=0,6
NVMST	50,9	P=0,6
PT	37,5	P=0,9
DV1°	7,7 mc	P=0,7
DV2°	10,2 mc	P=0,6
DV3°	12,4 mc	P=0,4
DV4°	14,5 mc	P=0,5
DV5°	16,2 mc	P=0,8
AMT	120,3°	P=0,9

Tabela 1: médias dos valores obtidos das variáveis da análise da estrutura sintática e sua significância onde PVT é o n° de pontos que são vértices de um triângulo; AT é a área dos triângulos; NVMST é o n° de vértices do MST; PT é o perímetro dos triângulos; DV1° a 5° é a distância do primeiro vizinho até o 5° vizinho.

Já o ângulo mínimo da triangulação de Delaunay, com média de $47,8^\circ$, apresentou um valor de $p= 0.004$, com $B= 0.2136$, a média do ângulo mínimo da triangulação de Delaunay mostrou-se significativa em prever a cura, sendo que quanto maior a média dos ângulos mínimos, mais rápida é a resposta ao tratamento quimioterápico, na análise univariada de Cox. O maior ângulo mínimo de um triângulo pode ser 60° , que ocorre no triângulo equilátero. Assim quanto mais próximo de 60° for o ângulo mínimo, mais regular será a distribuição dos núcleos (figura 23).

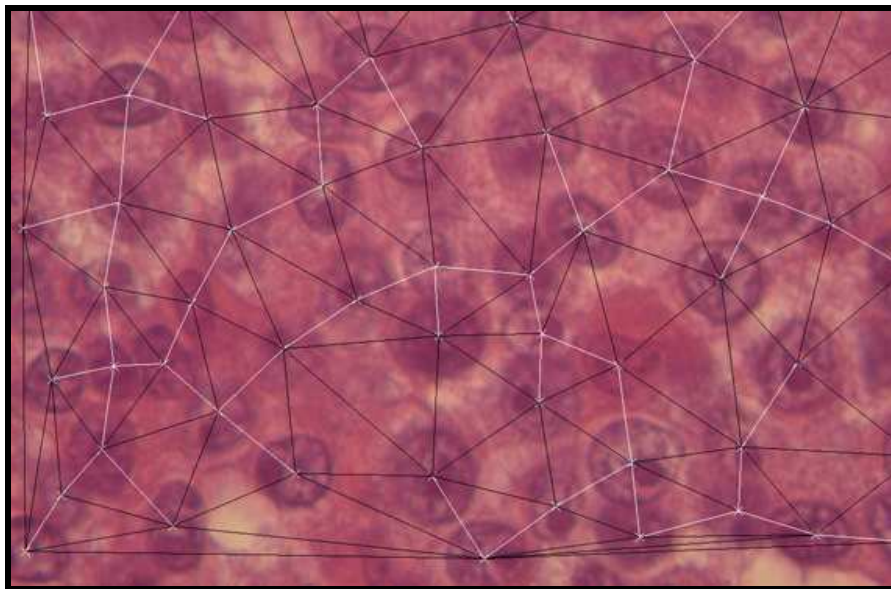


Figura 23: Corte histológico de TVTC, caso 89, coleta A. Sobreposição da triangulação de Delaunay e do MST. Podemos observar uma distribuição regular das células, com tamanhos próximos e a formação de triângulos de Delaunay bem próximos do equilátero.

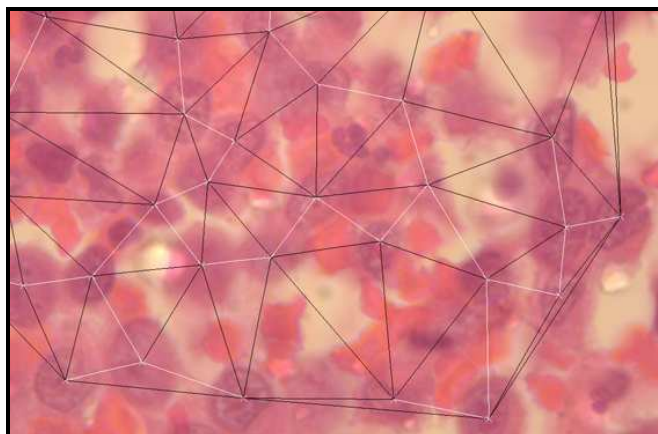


Figura 24: Corte histológico de TVTC, caso 38, coleta A. Sobreposição da triangulação de Delaunay e do MST. Podemos observar uma distribuição celular esparsa, com formações de triângulos irregulares e distância entre os vértices do MST muito variável. Obs: esse animal obteve cura completa somente após a orquiectomia.

A variável *ângulo mínimo da triangulação de delaunay* entrou no cálculo do modelo multivariado de Cox (junto com idade estimada, época do início do tratamento e volume da massa tumoral), apresentando $B = 0,1546$ e $p = 0,05$, mostrou ser preditiva do tempo de cura independentemente. Os resultados significativos são apresentados na tabela a seguir:

Variável	B	P
Idade	- 0,1798	0,0219
Log do Volume	-0,2159	0,0549
Época do Ano	-0,6783	0,0523
Ângulo Mínimo	0,1546	0,0556

Tabela 2: resultados das variáveis *idade*, *logarítimo do volume*, *época do ano* e *ângulo mínimo* testadas no modelo de Cox multivariado.

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspectos gerais

No estudo prospectivo, dos 100 cães com TVTC de ocorrência natural, tivemos 98 casos de ocorrência genital e somente dois extragenitais. A localização desses dois casos foi a mucosa oral de uma cadela e nasal de um cão, sendo esses os prováveis sítios primários do tumor, pois não havia nenhuma outra massa tumoral visível ao exame clínico minucioso. Esses dados foram compatíveis com os encontrados na literatura (Cohen, 1985; Rogers et al., 1998; Papazoglou et al., 2001), onde observamos uma maioria de casos nos quais o sítio primário é genital. O TVTC extragenital ocorre devido ao comportamento social dos cães em lambem e cheirar a si mesmos e entre si (Cohen, 1985; Mozos et al., 1996; Ferreira et al., 2000; Albanese et al., 2002).

A ocorrência do TVTC predominantemente em animais sem raça definida que houve em nosso estudo pode ser explicada pela origem desses animais (CCZ-T). Os *animais sem proprietário*, que foram recolhidos nas ruas, fazem parte da população de animais *não-domiciliados*, dos quais a maioria é sem raça definida. Dos chamados neste estudo de *animais com proprietário*, uma parcela possuía, como característica comum de seu histórico, o fato de terem sido adotados já adultos, portanto viveram nas ruas por um período. Outra parcela era constituída de *animais de comunidade* (Vieira et al., 2006), que permaneciam nas ruas, sob o cuidado de tutores (Vieira et al., 2006), e por fim os que tinham proprietário desde filhote, aos quais era permitido o acesso não-vigiado à rua.

Papazoglou et al. (2001); Ortega-Pacheco et al. (2007) relataram que o TVTC é uma doença de maior ocorrência em regiões onde não há um controle adequado da população canina e onde há animais soltos nas ruas, sendo a maioria desses animais sem raça definida.

Cohen (1985); Rogers et al. (1998) relatam uma maior ocorrência de TVTC em cães de grande porte (mais de 20 kg), pois esses comporiam a típica população de cães de vida livre. Kearns et al., observaram declínio em parâmetros imunológicos em cães de raças grandes, comparados a animais menores. Em nosso estudo os animais em sua maioria eram de médio para pequeno porte, com peso médio de 13,2 kg. Porém, mais uma vez esse fato pode ser explicado pela origem da nossa amostra, que também corresponde ao peso médio dos animais recolhidos pelo CCZ-T. Esse dado está de acordo com Ortega-Pacheco (2007), que fez um estudo

epidemiológico prospectivo sobre doenças reprodutivas em cadelas de rua e, de 300 animais, somente 18 tinham mais de 50 cm de altura, sendo considerados grandes.

Muitos estudos relatam uma ocorrência igual em machos e em fêmeas (Gonzalez et al., 2000; Papazoglou et al., 2001, Amaral et al., 2004). Porém essa é uma contradição que foi encontrada na literatura. Nak et al.,(2005) tiveram em seu estudo 29 fêmeas e nove machos. Silva et al. (2007), em seu estudo retrospectivo observaram maior incidência de fêmeas afetadas e sugeriram como justificativa o comportamento típico das fêmeas, em aceitar um grande número de cães durante o estro, além da fisiologia de seu período fértil que devido à ação dos hormônios, vulva e vagina aumentam de volume e há maior afluxo sangüíneo, favorecendo o enxerto das células do TVTC.

Neste trabalho houve uma maior ocorrência em cadelas (85 fêmeas e 15 machos).

A idade média dos animais que compuseram este estudo foi de 4,4 anos, o que está de acordo com a literatura, que relata uma maior ocorrência do TVTC em animais em idade reprodutiva (Nak et al., 2005; Silva et al., 2007).

5.2. Mecanismos imunológicos no TVTC

O TVTC possui vários mecanismos para escapar da vigilância imunológica do hospedeiro. Ele produz altas concentrações de TGF- β para inibir a expressão do MHC e a atividade dos *natural killers*. Secreta substâncias solúveis que matam as células B. Também prejudica a diferenciação de células dendríticas, inibindo o reconhecimento e apresentação do antígeno. Causa apoptose de monócitos e células dendríticas. Durante a regressão espontânea, a atividade das células dendríticas é substancialmente recuperada. Essa recuperação das células dendríticas é provavelmente um dos fatores mais importantes que levam o tumor à regressão. Esses fatos sugerem que o TVTC é um excelente modelo para o estudo de interações imunológicas entre hospedeiros e células tumorais (Liu et al., 2008).

As células dendríticas têm uma função importante na defesa imunológica do organismo. A redução no número dessas células prejudica ainda mais a resposta do hospedeiro. Elas produzem citocinas que modulam o sistema imunológico, ocorrendo uma diminuição na expressão dos marcadores de superfície, o que altera a capacidade de reconhecimento do antígeno (Murgia et al., 2006; Liu et al., 2008).

A ocorrência desses mecanismos imunológicos embasou a averiguação de possíveis influências externas como a temperatura ambiente, deprimindo o sistema de defesa dos animais pesquisados, e influenciando na cura.

Não foram relatados bons resultados da imunoterapia em animais com TVTC (Rogers, 1997; Das e Das, 2000), o que é contraditório pois há diversos estudos (Harmelin et al., 2002; Mukaratirwa et al., 2006) que falam em regressão espontânea do TVTC, porém foram realizados com tumores implantados artificialmente. Portanto não há estudo com uma amostragem significativa de TVTC de ocorrência natural, que prove que a regressão espontânea tenha importância clínica ao ponto de que possamos abolir o tratamento. Rogers (1997) relata um estudo em que seis (6) cães com TVTC, de ocorrência natural, foram observados por um (1) ano, sem o uso de nenhuma terapia. Houve progressão em todos os casos.

5.3. Variáveis clínicas como fator preditivo da cura

5.3.1. Gênero

Esta variável obtida ao diagnóstico não teve valor preditivo para a cura. Machos e fêmeas parecem ter o mesmo potencial de resposta ao tratamento com vincristina. O mesmo foi verificado pelo estudo retrospectivo de Silva et al., (2007), que avaliou a população canina atendida no Hospital Veterinário da UFERSA, em Mossoró, no período de Janeiro de 2000 a Dezembro de 2004. Dos 88 animais avaliados, 43 eram machos e 45 fêmeas e os resultados ao tratamento com o mesmo quimioterápico não mostraram diferenças entre os sexos.

5.3.2. Peso

Os pesos dos animais acompanhados neste trabalho, foram muito variáveis, indo de 2 a 30 kg, sendo que a média foi de 13,2 kg. Com $p=0,71$ o peso dos animais não foi preditivo da cura. No estudo de Valladão (2007) o peso mostrou-se preditivo da sobrevivência dos animais com TVTC tratados com vincristina. Kearns et al. (1999) observaram que cães da raça Labrador (grande porte) apresentavam menor resposta imune a antígenos do que cães da raça Fox Terrier

(pequeno porte). Apesar do caráter imunológico do TVTC, em nosso estudo, os animais de diferentes tamanhos e pesos responderam igualmente ao tratamento.

5.3.3. Animal com proprietário

Ao contrário do que se poderia esperar, os animais com proprietário tiveram a mesma resposta e predisposição à cura dos animais sem proprietário.

O mecanismo imunológico da implantação, progressão e regressão dessa doença (Gonzalez et al., 2000; Hsiao et al., 2002; Liu et al., 2008) poderia nos fazer esperar uma resposta pior ao tratamento dos animais sem proprietário, pois, como Mosier (1988) relatou, condições nutricionais, ambientais e estresse podem interferir em todos os sistemas do cão, inclusive no imunológico.

É esperado que os animais sem proprietário estejam expostos a condições ambientais adversas, ao estresse e a suprimento nutricional deficiente, mais que os animais com proprietário. Porém como esses animais ficaram alojados no CCZ-T e receberam o manejo adequado, essas circunstâncias podem ter sido supridas no decorrer do tratamento, o que sugere que possíveis prejuízos imunológicos, decorrentes da situação descrita, não refletiram na cura do TVTC.

5.3.4. Raça

Com $p=0,71$ a raça não foi fator preditivo da cura. Espera-se uma maior prevalência do TVTC em animais sem raça definida, devido a fatores sócio-econômicos e culturais, que predis põem esses animais a uma maior chance de contágio. Porém, depois de adquirido o TVTC, a resposta parece ser a mesma, independente da raça. Nossos resultados estão de acordo com Cohen et al. (1985) e Rogers et al (1997).

5.3.4. Volume da massa tumoral

Com $B = -0,287$ e $p = 0,0039$, observamos que quanto maior a massa tumoral mais tempo demora a cura, no tratamento do TVTC com vincristina.

As fases do TVTC, progressiva (P), estática (E) e regressiva (R), foram estudadas e foi observado que quando ocorre a transmissão natural, há um crescimento rápido inicial e a fase progressiva perdura, podendo durar de dois meses há um ano (Murakatwirwa et al., 2006). É esperado que, em um tumor maior, a expressão de TGF- β e das substâncias que suprimem a resposta imunológica do hospedeiro seja proporcional ao tamanho do tumor, promovendo então uma forte diminuição das células dendríticas, monócitos e linfócitos B e a inibição do MHC I e II.

Segundo Murakartiwa et al.(2006), na fase progressiva do tumor, há grande vascularização e há um maior número de células tumorais em relação às células de defesa. Há maior índice de mitoses e um maior número de mastócitos na frente invasiva do tumor, provavelmente envolvidos com angiogênese, que é maior também na frente invasiva de tumores em fase de progressão. Na fase de regressão, os mastócitos estão difundidos por todo o tumor, há mais apoptose e muitos linfócitos infiltrados.

5.3.5. Época do início do tratamento

Essa variável teve $B = -0,940$ e $p = 0,0025$, portanto os meses quentes mostraram significância para um retardamento da cura.

Nos animais que iniciaram seu tratamento, na época do ano que foi classificada como *meses quentes*, devido às maiores temperaturas, em contraste com os poucos meses de temperatura mais fria, a predisposição para a cura foi menor.

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. Metze et al. (1994) ressaltaram a influência climática em doença reumática também na região sudeste do país. 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.

Na literatura é relatada uma maior ocorrência do TVTC em regiões onde o clima é quente e úmido (Papazoglou et al., 2001; Nak et al., 2005). Cohen (1985) fala que a prevalência

do TVTC nos Estados Unidos é inversamente relacionada com a latitude geográfica e diretamente relacionada com o aumento das temperaturas médias anuais e das chuvas.

Segundo Ortega-Pacheco (2007), há uma maior ocorrência de cadelas na fase do estro e cadelas gestantes nos meses quentes e úmidos. Portanto, pode-se suspeitar que um contágio maior do TVTC ocorre também nessa época, quando ele deverá iniciar as fases de implantação e progressão, com sua forte relação com o sistema imunológico do animal.

Se for estabelecida uma relação entre as informações dos trabalhos mencionados e o observado neste estudo, quanto ao retardamento da cura nos meses quentes, é possível sugerir que o mecanismo de supressão imunológica do TVTC seja mais bem sucedido nesse período, por uma possível diminuição da resposta imunológica dos cães, devido às altas temperaturas.

5.3.6. Idade

Com $B=-0,1798$ e $p=0,02$, uma resposta ao tratamento mais demorada é esperada em animais idosos, o que pode ser embasado pelos achados do declínio da defesa humoral e celular em cães idosos, observados nos estudos de Mosier (1989) e Kearns et al. (1999). A idade avançada influencia tanto na imunidade humoral quanto na celular, assim como na produção de citocinas. Conseqüentemente o declínio da resposta imunológica pode contribuir para o aumento de infecções e do câncer (Kearns et al, 1999).

Uma propriedade comum ao envelhecimento de todos os sistemas são as mudanças progressivas e irreversíveis, que podem ser influenciadas pelos efeitos de doenças, estresse, nutrição, exercícios, genética e meio ambiente (Mosier, 1989).

5.4. Variáveis da análise da estrutura sintática como fator preditivo da cura

Obtivemos um resultado preditivo de cura, com a variável ângulo mínimo da triangulação de Delaunay, sendo que, quanto maior for a medida do ângulo mínimo, mais rápida é a resposta ao tratamento com vincristina.

O maior ângulo mínimo de um triângulo ocorre no triângulo equilátero, onde todos os ângulos têm 60° . Se fizermos uma triangulação de Delaunay, com triângulos próximos do equilátero, teremos uma distribuição dos vértices desses triângulos com aspecto regular e organizado. Os vértices da triangulação de Delaunay, sobreposta aos cortes histológicos, são os núcleos celulares. Portanto, nesse caso, teremos uma distribuição celular regular.

A irregularidade morfológica, que é reflexo do pleomorfismo, da perda da polaridade celular, do aumento de mitoses e da alteração da morfologia nuclear, é uma das características da malignidade de um tumor (Kumar et al., 2005).

Portanto, o resultado obtido com a variável *ângulo mínimo*, reflete que, quanto mais organizada for a distribuição celular do TVTC no momento do diagnóstico, melhor ele responderá ao tratamento com vincristina.

Weyn et al. (1999) utilizaram a análise da estrutura sintática, para fazer diagnóstico diferencial de mesotelioma maligno com mesotélio hiperplásico e adenocarcinoma, em seres humanos. O mesotelioma é derivado do mesoderma e não é bem identificado por métodos imunoistoquímicos. Os parâmetros avaliados foram área e forma dos polígonos de Voronoi e número de núcleos, comprimento total, comprimento das retas, número de retas e distância dos vizinhos mais próximos do MST. Todos os parâmetros foram significativos. Eles revelaram as distâncias entre os núcleos que são muito difíceis de estimar visualmente. Os melhores resultados foram obtidos do número de vizinhos, área e forma das células, que estão associados com o grau de regularidade do tecido.

Bigras et al. (1996) em um estudo humano, com o uso da sociologia celular, observaram que o carcinoma de pequenas células do pulmão tem uma alta densidade celular e uma baixa polarização arquitetural, o que o diferencia dos outros tumores neuro-endócrinos do pulmão. Portanto, a análise da estrutura sintática pôde definir a malignidade desses tumores, pois a baixa polaridade é sinônimo de irregularidade morfológica e uma alta densidade celular pode indicar proliferação celular exagerada.

Palmer et al. (2008), observaram o valor prognóstico e preditivo da análise da estrutura sintática em carcinoma de ovário de mulheres sob quimioterapia. Foram avaliados o comprimento do MST, comprimento mínimo do MST, comprimento máximo do MST, desvio padrão do MST e conectividade de 1, 2, 3, 4 e 5 vizinhos próximos. A variável conectividade de 2 vizinhos próximos foi significativa para a resposta ao tratamento quimioterápico. Pela análise

univariada, a distância entre os núcleos foi capaz de prever a sobrevida e o tempo de vida livre da doença, assim como a resposta à quimioterapia. Pela análise multivariada, o desvio padrão do MST sugere que a variabilidade no arranjo nuclear é o mais importante fator para prever a sobrevida.

Outros estudos foram feitos dentro dos *sistemas especializados quantitativos* em tumor venéreo transmissível canino, como o de Waldemarin et al. (2004) que, por meio de análises morfométricas, diferenciou histiocitoma, mastocitoma e TVTC em cães. Também Valladão (2007) verificou a cura e a sobrevida de cães com TVTC, usando parâmetros clínicos e morfométricos.

O uso de ferramentas precisas, obtidas por meio de sistemas especializados quantitativos, como a análise da estrutura sintática que foi utilizada neste estudo, para prever o comportamento do TVTC, tem demonstrado precisão e potencial de reprodutibilidade, ocupando um espaço importante na histopatologia.

A diversidade do arranjo intercelular pode ser um sinal importante para o diagnóstico da malignidade e, portanto, para prever o comportamento do câncer. Pela quantificação da arquitetura dos tecidos, padrões observados, podem ser significativos de muitos aspectos da doença.

O TVTC demonstrou arquiteturalmente diferenças de padrões, que podem ser comparadas com as diferenças de comportamento clínico. Esse tumor tem uma taxa de crescimento muito grande (fase progressiva com muitas mitoses), por isso invade os tecidos de forma irregular, podendo formar uma grande massa em seu sítio primário. As metástases, apesar de pouco freqüentes, podem ocorrer. Porém a Análise da Estrutura Sintática demonstrou que a regularidade no padrão arquitetural da distribuição celular desse tumor e de outros previamente citados parece prever um melhor prognóstico.

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir que o sulfato de vincristina foi um quimioterápico eficiente no tratamento dos tumores venéreos transmissíveis dos 100 animais, com um tempo médio de cura de 5,4 semanas.

A resposta ao tratamento logo após a primeira administração de sulfato de vincristina promoveu em média uma diminuição do volume do tumor de 66%.

As variáveis clínicas: época do início do tratamento, idade, tamanho da massa tumoral têm independentemente, valor preditivo para a cura dos animais com tumor venéreo transmissível canino, tratados com sulfato de vincristina, já no momento do diagnóstico.

Os resultados das variáveis do estudo clínico parecem relacionar a capacidade de resposta imunológica ao tempo de cura do TVTC tratado com vincristina.

A variável: ângulo mínimo da triangulação de Delaunay, obtida por meio da análise da estrutura sintática, tem valor preditivo para a cura dos animais com tumor venéreo transmissível canino, tratados com sulfato de vincristina também no momento do diagnóstico.

Confirmamos estudos anteriores no campo da *sociologia celular*, sugerindo que a *Análise Estrutura Sintática* pode ser uma importante ferramenta preditiva e prognóstica, que, usada sozinha ou em conjunto com parâmetros clínicos, pode ajudar nas escolhas adequadas de tratamento para pacientes animais e humanos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

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

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.

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

Bueno MG, Haipok 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.

Chandebois R. Cell sociology: a way of reconsidering the current concepts of morphogenesis. *Acta Biother*. 1976; 25(2-3) : 71-102.

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.

Cohen, D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. *Adv Cancer Res.* 1985; 43: 75-112.

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.

Darro F, Krukczynski A, Etievant C, Martinez J, Pasteels JL, Kiss R. Characterization of the differentiation of human colorectal cancer cell lines by means of Voronoi diagrams. *Cytometry.* 1993; 14: 783-92.

Das U, Das A K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Vet Res Commun.* 2000; 24: 545-56.

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

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

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 diferencial diagnosis of thyroid follicular neoplasias. *Cell Oncol.* 2006; 28: 331-3.

Geusebroek JM. Segmentation of tissue architecture by distance graph matching. In: *Color and geometrical structure in images. Aplication in microscopy.* Janssen Research Foundation. Beerse: ASCI dissertation series 54; 2000.p. 91-113.

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.

Gobello C, Corrada Y. Effects of vincristine treatment on sêmen quality in a dog with transmissible venereal tumor. J Small Animal Practice. 2002; 43: 416-7.

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.

Guillaud M, Matthews JB, Harrison A, MacAulay C, Skov K. A novel image cytometric method for quantification of immunohistochemical staining of cytoplasmatic antigens. Anal Cell Pathol. 1997; 14: 87-99.

Guvenc T, Haligur M, Orman M N, Hazirolu R. Mitosis and apoptosis in canine cutaneous histiocytoma and transmissible venereal tumour. Acta Vet Hung. 2002; 50 (3): 315-21.

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.

Hazgui S, Bonnet N, Cutrona J, Raby BN, Polette M, Chouchane L et al. 3D culture model and computer-assisted videomicroscopy to analyze migratory behavior of noninvasive and invasive bronchial epithelial cells. Am J Physiol. 2005; 289: 1547-52.

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.

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 metástases: 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.

Kearns RJ, Hayek MG, Turek JJ, Meydani M, Burr, Greene RJ, Marshall CA et al..Effect of age, breed and dietary omega-6 (n-6): omega-3 (n-3) fatty acid ratio on immune function, eicosanoid production, and lipid peroxidation in young and aged dogs. *Veterinary Immunology and immunopathology*. 1999; 69: 165-83.

Keenan S J, Diamond J, McCluggage W G, Bharucha H, Thompson D, Bartels P H, Hamilton W P. An automated machine vision system for the histological grading of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *J Pathol*. 2000; 192: 351-362.

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.

Liu C C, Wang S Y, Lin Y C, Chuang T F, Liao K W, Chi K H et al. Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in a in vivo canine model of transmissible venereal tumor. *Cancer Immunol Immunother*. 2008; 57: 479-91.

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.

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

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.

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

Metcalfe SS, Osborne DA, MacFarlane RA. Canine transmissible venereal tumour. *Aust Vet Practit* 1997; 27(4): 186-92.

Metze, K., Lobo, A.M., Lorand-Metze, I. Nucleolus organizer regions (AgNORs) and total tumor mass are independent prognostic parameters for treatment-free period in chronic lymphocytic leukemia. *International Journal of Cancer.* 2000; 89: 440-443.

Metze, K, Meves, R, Moreira, PRS. Seasonal-variation in rheumatic heart-disease. *International Journal of Cardiology* 1994; 38:101-102.

Morel D, Marcelpoil R, Brugal G. A proliferation control network model: the simulation of two-dimensional epithelial homeostasis. *Acta Biotheor.* 2001; 49: 219-34.

Mosier JE. Effect of aging on body systems in the dog. *Vet. Clin. North Am. Small Animal Practice* 1989, 19: 1-12.

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

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, Chiwome T, Chitanga S, Bhebhe E. Canine Transmissible Venereal tumour: assessment of mast cell numbers as indicators of the growth phase. *Veterinary Research Communications.* 2006; 30: 613-21.

- 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.
- Numahara T, Tanemura M, Nakagawa T, Takaiwa T. Spatial data analysis by epidermal Langerhans cells reveals an elegant system. *J. Dermatol. Sci.* 2001; 25 (219-28).
- 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.
- Ortega-Pacheco A, Correa J C S, Coelho M J, Forsberg C L. Reproductive patterns and reproductive pathologies of stray bitches in the tropics. *Theriogenology.* 2007; 67: 382-90.
- Palmer JE, Cassia LJS, Irwin CJ, Morris AG, Janssen EAM, Baak JP, et al. The prognostic and predictive value of syntactic structure analysis in serous carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Pathol.* 2008; 27(2): 191-8.
- 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, 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.
- 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.

Rogers K S. Transmissible Venereal Tumor. *The Compendium*. 1997; 19(9): 1036-45.

Silva MCV, Barbosa RR, Santos RC, Chagas RSN, Costa WP. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no hospital veterinário da UFERSA. *Acta Vet Bras*. 2007; 1: 28-32.

Sudbo J, Bankfalv A, Bryne M, Marcelpoil 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.

Sudbo J, Marcelpoil R, Reith A. New algorithms base don the Voronoi diagram applied in a pilot study on normal mucosa and carcinomas. *Anal Cell Pathol*. 2000; 21: 71-86.

Valladão MLCR. Dados clínicos, morfometria e textura nuclear como fatores prognósticos e preditivos no tumor venéreo transmissível canino. (Dissertação) Campinas (SP): UNICAMP; 2007.

Vieira A M L, Magnabosco C, Ferreira J C P, Luna S L P, Brant de Carvalho J L, Gomes L H, et al. Programa de controle de populações de cães e gatos do Estado de São Paulo Módulo III — Recolhimento de animais. *BEPA*. 2005; 2 (20).

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.

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

8. ANEXO



**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

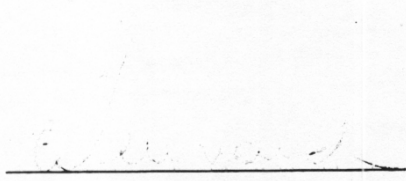
C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **731-2**, sobre "**TEXTURA MICROSCÓPICA DE CÉLULAS NEOPLÁSTICAS COMO FATOR PROGNÓSTICO EM TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO**" sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Konradin Metze / Karime Cury Scarpelli** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04 de novembro de 2004.

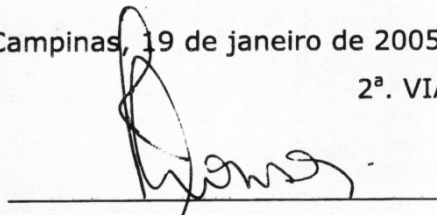
C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **731-2**, entitled "**TEXTURE OF NEOPLASTIC CELLS AS PROGNOSTIC FACTOR IN CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on November 4, 2004.

Campinas, 19 de janeiro de 2005.
2ª. VIA



Prof. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP



Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP