UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA, CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE, EXPRESSÃO GÊNICA DE *C-MYC* E IMUNOISTOQUÍMICA DE C-MYC, p53, p21 E p27 NO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO

Caroline Rocha de Oliveira Lima
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura

GOIÂNIA
2013

sistema de bibliotecas ufg

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[ ] Dissertação** **[X] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Caroline Rocha de Oliveira Lima				
E-mail:	carolrochavet@hotmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? [X]Sim [ ] Não					
Vínculo empregatício do autor		Agência Goiana de Defesa Agropecuária			
Agência de fomento:				Sigla:	
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:	Classificação morfológica, critérios de malignidade, expressão gênica de *C-MYC* e imunoistoquímica de C-MYC, p53, p21 e p27 no tumor venéreo transmissível canino.				
Palavras-chave:	aloenxerto, apoptose, cães, ciclo celular, citologia, neoplasia, reação em cadeia da polimerase.				
Título em outra língua:	Morphological classification, malignancy criteria, gene expression of c-myc and immunohistochemical of c-myc, p53, p21 and p27 in canine transmissible venereal tumor.				
Palavras-chave em outra língua:	allograft, apoptosis, cell cycle, cytology, dogs, neoplasm, polymerase chain reaction.				
Área de concentração:	Clínica, Cirurgia e Patologia Animal				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	19/07/2013				
Programa de Pós-Graduação:	Ciência Animal				
Orientador (a):	Profª. Drª. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura				
E-mail:	vdmoura@vet.ufg.br				
Co-orientador (a):*	Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito				
E-mail:	luizaugustobrito@hotmail.com				
Co-orientador (a):*	Profª. Drª. Moema Pacheco Chediak Matos				
E-mail:	mpcm@vet.ufg.br				

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Caroline Rocha de Oliveira Lima

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 10 / 09 / 2013

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

CAROLINE ROCHA DE OLIVEIRA LIMA

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA, CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE, EXPRESSÃO GÊNICA DE *C-MYC* E IMUNOISTOQUÍMICA DE C-MYC, p53, p21 E p27 NO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO

Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:
Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientadora:
Prof.ª Dr.ª Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito - EVZ/UFG
Prof.ª Dr.ª Moema Pacheco Chediak Matos - EVZ/UFG

GOIÂNIA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Lima, Caroline Rocha de Oliveira Lima

Classificação morfológica, critérios de malignidade, expressão gênica de *C-MYC* e imunoistoquímica de C-MYC, p53, p21 e p27 no tumor venéreo transmissível canino [manuscrito] / Caroline Rocha de Oliveira Lima. – 2013.

103 f. : figs, tabs.

Orientador (a): Prof[a]. Dr[a]. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2013.

Bibliografia.

CAROLINE ROCHA DE OLIVEIRA LIMA

Tese defendida e aprovada em **19/07/2013** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura
(ORIENTADOR (A))

Prof. Dr. Marciano Régis Rubini - UnB/DF

Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani - UFG/Jataí

Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno (memoria)

Profa. Dra. Ana Paula Iglesias Santin - DMV/EVZ/UFG

DEDICATÓRIA

À minha família! À minha amada família! Minha essência, minha verdade, minha alegria, minha razão de existir! Meus pais, Leopoldo e Alzira, minha composição, meu alicerce, meu modelo! Minha filha, Letícia, minha fé, minha batalha, meu amor incondicional! Meu esposo, Rogério, meu amor verdadeiro, meu complemento, meu porto seguro! Sem vocês eu nada seria.

Minha dedicatória e meu amor sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus! Agradeço por mais uma dádiva concedida. Minha vida sempre foi marcada por muitas vitórias porque tenho Deus em primeiro lugar! Obrigada Mestre por me conduzir e perdão por minhas fraquezas, por todas as vezes que fui injusta, durante os momentos de dificuldade ou de cansaço. Obrigada por me proteger e abençoar a toda a trajetória da minha existência!

Aos meus pais, Alzira e Leopoldo, por fazerem do meu sonho o próprio sonho de vocês. Por toda a dedicação, o empenho e toda a força e entusiasmo que tiveram para buscar esse título comigo! Espero que essa conquista possa representar um “pouquinho”, minha retribuição ao amor e à confiança que vocês ativeram em mim sempre!

A minha joia perfeita, minha gota cristalina! A minha pequena, sempre e simplesmente Letícia! Obrigada filhinha querida por amar e cuidar da mamãe que “nem gente grande”! Obrigada por me proporcionar o amor eterno, sublime, incondicional! Obrigada por trazer um sentimento tão puro e verdadeiro ao meu coração. Meu amor eterno!

Ao meu esposo querido, Rogério. Obrigada por sempre tornar minha vida mais simples, mais gostosa de viver. Por ironia ou não, há muito tempo escrevi em páginas, como estas, que eu queria você, para sempre ao meu lado... Um anjo disse amém e Deus aprovou esse pedido. E foi além... Transformou nossas vidas em uma só vida nos unindo, como eu havia pedido, tão verdadeiramente. Que seja para sempre, que seja sempre! Obrigada por toda a compreensão, abdicação e sabedoria que tiveste para que a conclusão desse sonho fosse real.

A minha irmã, Cíntya. Mulher doce, meiga, verdadeira! Agradeço a Deus por ter me presenteado por toda a vida com uma amiga especial. Agradeço a você e ao Jozenias por me receberem, sempre de portas abertas e com um sorriso no rosto, no lar de vocês, sempre me proporcionando um ambiente agradável e tranquilo, contribuindo sumariamente para que o encerramento desse trabalho fosse possível.

A queridíssima tia Augusta. Minha tia querida, amorosa e que sempre se dedicou a nossa família incondicionalmente. Obrigada tia por estar sempre

presente, nas etapas ímpares e também nas mais simples passagens da minha vida!

Agradeço à família querida do meu esposo, que ganhei como presente de Deus. Senhora Dulce Machado Rabelo, senhor Elias Rabelo, e meus cunhados queridos Romero e Gislei... Obrigada pelas orações e por toda preocupação que sempre tiveram com nossa família.

Agradecimento muito especial a minha querida orientadora “Veri” – Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura. Obrigada professora por ter me acolhido como uma “mãezona” “na patologia”. Obrigada por ter depositado sua inteira confiança a mim e aceitado me orientar em um momento tão ímpar de minha vida. Obrigada por toda a consideração e por todo o respeito que sempre teve em relação a minha vida pessoal e profissional. Obrigada por ser tão amiga e compreensiva em todos esses anos de convivência. E que essa convivência não se perca ao virarmos essa página. Com certeza, você será para sempre minha orientadora do coração e a grande estrela que quero seguir!

Agradecimento especial aos meus co-orientadores Luiz Augusto Batista Brito e Moema Pacheco Chediak Matos, que aceitaram a missão de vir a somar em minha pesquisa e contribuiram sumariamente para que este capítulo da minha história fosse encerrado a chave de ouro.

Agradeço a você, querida amiga Mariana Batista Faleiro. Muito mais que uma colega de pós-graduação foi um exemplo de dedicação, esforço, esmero e comprometimento para comigo e com minha pesquisa. Sei que já disse diversas vezes, mas não me canso de repetir: “Amiga, minha pesquisa só foi possível graças ao seu apoio incondicional”. Essa conquista é nossa “Marizinha”!

Agradeço ao Setor de Patologia Animal e a Escola de Veterinária e Zootecnica da Universidade Federal de Goiás que, durante esses últimos seis anos, foi o cenário de uma trajetória de muito trabalho, esforço, estudo, crescimento profissional e pessoal e conquistas enigmáticas. Valores esses aqui conquistados e que, com certeza, me acompanharão por toda minha existência. Espero, um dia, ter a oportunidade de contribuir com a formação de outros profissionais, expandindo esse desejo de colaborar para que muitos também consigam trilhar um caminho de muito sucesso.

Agradeço à Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí – Unidade Jatobá pela abertura com que me receberam e receberam minha pesquisa. Agradeço em especial ao Setor de Cirurgia de Grandes Animais (SCGA) e a todos os membros da grande família SCGA, que por vezes se dedicaram a minha pesquisa particular, perdendo dias de aula, fins-de-semana, dia dos namorados, cuidando para que a conclusão deste trabalho se tornasse realidade.

Agradeço ao professor e grande amigo Valcinir Aloisio Scalla Vulcani, profissional jovem, inteligente, perspicaz, por toda contribuição prestada ao meu trabalho. Com certeza, a conclusão deste trabalho somente se tornou possível em virtude de seu apoio incondicional. Espero que nossa parceria continue para que possamos aperfeiçoar cada vez mais o caminho de nossas pesquisas científicas.

Agradeço ao professor Fabiano José Ferreira de Sant'Ana que abriu as portas do laboratório de patologia da UFG/Campus Jataí permitindo que eu utilizasse esta estrutura para realização das análises citopatológicas.

Agradeço ao professor Marco Antônio de Oliveira Viu pela contribuição ímpar e por todos os esclarecimentos prestados em relação às análises estatísticas, somando mérito científico incontestável a este trabalho.

Agradeço à Universidade de Brasília, em particular ao Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, a possibilidade de execução das análises moleculares. Meu agradecimento especial ao professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres por ter aberto as portas dessa intituição e ter recebido nossa pesquisa com tamanha alegria e prontidão. Agradeço ainda ao Dr. Marciano Régis Rubini por todo o empenho e dedicação na execução das análises de PCR, tentando, sempre de forma alegre e gentil, me fazer compreender um pouco mais sobre a temerosa biologia molecular!

Agradeço ao professor Adilson Donizeti Damasceno que assumiu a árdua função de avaliar por duas vezes meu trabalho, quando aceitou ser o membro memória da minha banca de doutorado.

Agradeço a querida Yandra que aceitou ser membro da banca de qualificação e colaborou de forma efetiva no aperfeiçoamento do meu trabalho.

Agradeço a *lady* professora Ana Paula Iglésias Santin pela brilhante participação em minha banca de defesa de doutorado, trazendo o aperfeiçoamento deste trabalho por meio de sua experiência profissional.

Agradeço a Agência Goiana de Defesa Agropecuária (AGRODEFESA), em especial a todos os colegas e amigos dos municípios que compõem a Regional Alto Araguaia. De Aparecida do Rio Doce a Serranópolis, senti nesses últimos dias o carinho, a compreensão acerca da minha ausência, bem como a torcida e a vibração positiva para que minha conquista fosse possível. Muito Obrigada!

Agradeço a todos os meus familiares e amigos queridos, que sempre torceram por mim, sempre preocupados com meus passos e minhas conquistas! Obrigada por todas as orações, vibrações positivas e palavras de incentivo que por vezes possibilitaram meu amadurecimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida durante quase três anos e contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa!

Poderia ficar horas, dias ou semanas tecendo agradecimentos. Mas com certeza, nunca seria suficiente, nunca seria justo o bastante para agradecer a todos aqueles que colaboraram de alguma forma para que eu chegasse até aqui, conquistando esse título tão sonhado, tão almejado. Por isso, findo meus agradecimentos deixando um abraço carinhoso aos que por um lamentável equívoco deixaram de ser mencionados nessas páginas simbólicas, e contem sempre com a certeza de que tiveram contribuição salutar no ensejo desse capítulo de minha história!

***MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS*!**

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS 3

1 INTRODUÇÃO 3

2 TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO (TVT) 5

2.1 Histórico, epidemiologia e citogênese do TVT 5

2.2 TVT experimentalmente transplantado e de ocorrência natural .. 9

2.3 Imunologia tumoral 12

2.3.1 Bloqueio do sistema imune no TVT por supressão ativa da resposta imune **..... 13**

2.3.2 Bloqueio do sistema imune no TVT pelo fenômeno do imunoestágio **16**

2.4 Métodos de diagnóstico do TVT 17

2.4.1 Sinais clínicos e aspectos macroscópicos **..... 18**

2.4.2 Análises citopatológica, histopatológica e características fenotípicas **21**

2.4.3 Características ultraestruturais, imunoistoquímica e expressão gênica do TVT **..... 29**

2.4.3.1 Ciclo celular **..... 33**

2.4.3.2 Gene P53 e proteína p53 **..... 34**

2.4.3.3 Genes P21 e P27 e proteínas p21 e p27 **..... 36**

2.4.3.4 Gene *C-MYC* e proteínas C-MYC (MYC-1, MYC-2 e MYC-3) **..... 37**

2.4.3.5 Elemento LINE-1 **..... 40**

2.5 Terapia 41

REFERÊNCIAS 44

SUMÁRIO (Cont.)

CAPÍTULO 2 - MORPHOLOGICAL PATTERNS AND MALIGNANCY CRITERIA OF TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR IN CYTOPATHOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EXAMS 58

SUMMARY 59

RESUMO 59

1 INTRODUCTION 60

2 MATERIAL AND METHODS 60

3 RESULTS 62

4 DISCUSSION 64

5 CONCLUSIONS 66

6 REFERENCES 67

CAPÍTULO 3 – INSERÇÃO DO ELEMENTO LINE 1 NO GENE C-MYC E IMUNORREATIVIDADE DAS PROTEÍNAS C-MYC, P53, P21 E P27 NOS DIFERENTES PADRÕES MORFOLÓGICOS DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO 76

RESUMO 76

1 INTRODUÇÃO 77

2 MATERIAL E MÉTODOS 79

3 RESULTADOS 85

4 DISCUSSÃO 90

5 CONCLUSÕES..... 95

6 REFERÊNCIAS 96

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS 101

ANEXOS 103

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 Ocorrência de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no TVT de localização genital. A) Amostra citológica - células redondas, citoplasma basofílico, vacúolos intracitoplasmáticos claros e núcleo excêntrico; amastigotas de *Leishmania* sp. no citoplasma da célula tumoral (seta). Giemsa, 200x. B) Hibridização do rRNA de *Leishmania* sp. apresenta marcação escura, indicando amastigotas no citoplasma de um macrófago marcado para Mac387 em vermelho (ponta de seta) e também no interior de uma célula neoplásica negativa para Mac387 (seta). Hibridização *in situ* e imunoistoquímica - 200x..... 8

Figura 2 Evasão imune nas fases de progressão e regressão do TVT canino. A) Na progressão, as células tumorais não secretam MHC classe I e II e o tumor secreta TGF-β_1, uma citocina que inibe o linfócito tumor-infiltrante citotóxico, incluindo as células NKs. As células tumorais também podem inibir as células apresentadoras de antígenos. B) Na regressão há aumento dos linfócitos tumor-infiltrante citotóxicos, que secretam IFN-γ e IL-6 que, em associação, reprimem os efeitos do TGF-β_1 derivado do tumor e induz a expressão do MHC classe I e II nas células tumorais 14

Figura 3 Fotomicrografia do TVT experimentalmente transplantado em cão. A) (CD79+), B) (CD4+) e C) (CD8+) - progressão tumoral. D) (CD79+), E) (CD4+) e F) (CD8+) - regressão tumoral. A marcação para linfócitos B (CD79+) é menor na progressão (A) em relação à regressão (D). Já a marcação para linfócitos T (CD4+ e CD8+) predomina na progressão (B e C) em relação à regressão (E e F) 16

Figura 4 Aspecto macroscópico do TVT canino em diferentes localizações anatômicas. A) Pênis e prepúcio. B) Vulva. C) Globo ocular direito. D) Cavidade oral 21

Figura 5 Fotomicrografias de TVT canino. A) Técnica citológica (Giemsa) e B) histológica (HE) em amostras do mesmo animal. Características celulares melhor preservadas e evidenciadas em A em relação a B 23

LISTA DE FIGURAS (cont.)

CAPÍTULO 1

Figura 6 Fotomicrografia de TVT canino. Amostra citológica de alta celularidade, com células redondas, de núcleos grandes, nucléolo proeminente e citoplasma ligeiramente eosinofílico, com vacúolos intracitoplasmáticos. Giemsa 24

Figura 7 Aspectos microscópicos das fases da evolução do TVT. A) Progressão, em que se observa alta celularidade, mitoses e tecido conjuntivo escasso. B) Estabilidade tumoral, transição entre as fases de progressão e regressão. C) Final da regressão tumoral na qual o parênquima tumoral colapsado é substituído por tecido fibroso. HE..... 25

Figura 8 Aspectos morfológicos do TVT canino. A e B) Esquema citomorfológico dos tipos linfocitoide e plasmocitoide, respectivamente. C) Fotomicrografia de CAAF de TVT apresentando padrão morfológico linfocitoide (seta preta) e plasmocitoide (seta branca) concomitante. Giemsa 26

Figura 9 Fases do ciclo celular. Quando uma célula é estimulada a se multiplicar, ocorre ativação do ciclo celular. Inicialmente a célula passa por três fases preliminares, G1, S e G2, essenciais para garantir que a correta e completa duplicação do material genético. Em seguida o ciclo evolui para fase M, com a divisão celular da célula-mãe em duas células filhas. A fase G0 reflete um estado de quiescência, ficando a célula em repouso enquanto não existir atividade relacionada à mitose 34

Figura 10 Representação parcial e simplificada da atuação do *C-MYC* nas vias moleculares reguladoras do ciclo celular em organismos superiores 39

Figura 11 Mecanismo de inibição do ciclo celular via fator de crescimento transformador beta (TGF-β), que estimula a transcrição de *C-MYC* e P53 para interromper o ciclo celular via ativação das CDKIS p21, p27 e p15 40

LISTA DE FIGURAS (cont.)

CAPÍTULO 2

Figura 1 Microscopic features of canine transmissible venereal tumor (TVT). Better quality and preservation of the cellular morphology in the cytological sample with respect to the histological sample (A) Cytopathological exam, Giemsa, 40x objective. (B) Histopathological exam, HE, 40x objective..... 74

Figura 2 Morphological standards of the transmissible venereal tumor in cytopathological exam. A) Lymphocytoid standard. Round cells with large nucleus and scanty cytoplasm, similar to lymphocytes. B) Plasmacytoid standard. The cells present more abundant cytoplasm and eccentric nucleus, with lower nucleus/cytoplasm ratio. C) Mixed standard. Lymphocytoid and plasmacytoid morphology cells. Giemsa, 20x objective … 75

CAPÍTULO 3

Figura 1 Fotomicrografias de células de TVT canino. (A) amostra citopatológica corada com Giemsa. (B) amostra histopatológica corada com HE. 400x 85

Figura 2 Fotomicrografias dos padrões morfológicos de células de TVT canino ao exame citopatológico. A) Padrão linfocitoide. Células redondas, com núcleo grande e citoplasma escasso, semelhantes a linfócitos (seta preta). B) Padrão plasmocitoide. Células com citoplasma mais abundante e núcleo excêntrico, com menor relação núcleo/citoplasma (seta vermelha). C) Padrão misto. Células de morfologia linfocitoide (seta preta) e plasmocitoide (seta vermelha). Giemsa, 400x 86

Figura 3 Diagnóstico molecular do tumor venéreo transmissível canino (TVT) por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR). A eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,3µg/mL de brometo de etídeo ilustra o perfil característico do DNA genômico no TVT relativo ao rearranjo LINE1/*C-MYC*. A coluna M representa o marcador de massa molecular Gene Ruler 1kb Plus. As colunas de um a 19 demonstram o produto da amplificação a partir do

LISTA DE FIGURAS (cont.)

CAPÍTULO 3

Figura 3 DNA genômico do TVT para o fragmento de aproximadamente 340pb que caracteriza a inserção do elemento LINE-1 no gene *C-MYC* e para o fragmento de aproximadamente 480pb que caracteriza o controle interno positivo da reação. A coluna 20 demonstra a amplificação do DNA genômico do mastocitoma, amplificando apenas o fragmento de 480pb, representado com seta azul claro. As colunas 21 e 22 representam a amplificação do DNA em amostras de sangue total de cães saudáveis, com ausência de amplificação para o rearranjo LINE-1/*C-MYC* e presença de reação para o gene da hemoglobina humana, marcadas com as setas em amarelo e vermelho, respectivamente. A coluna 23, seta verde, representa o controle interno negativo da PCR (ausência de DNA) em que se observa ausência total de amplificação 87

Figura 4 Fotomicrografias de reações imunistoquímicas no TVT canino. A) C-MYC. Marcação citoplasmática nos escores I3 e C4 para intensidade de marcação e percentual de células marcadas. B) p53. Marcação nuclear nos escores I3 e C4 para intensidade de marcação e percentual de células marcadas. C) p21. Marcação nuclear nos escores I2 e C4 para intensidade de marcação e percentual de células marcadas. D) p27. Marcação nuclear nos escores I2 e C1 para intensidade de marcação e percentual de células marcadas. IHC, 250x 88

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 Relação dos principais genes e proteínas estudados no TVT canino, método de avaliação empregado para a identificação molecular, síntese dos resultados e referências 32

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Criteria to the cytomorphological classification of TVT at cytopathological and histopathological exams. Jataí, Brazil, 2012 …….. 70

Tabela 2 Frequency of cases of TVT according to sex, age and breed. Jataí, Brazil, 2012 …… 71

Tabela 3 Distribution of the number of samples of the criteria general, cytoplasmic and nuclear malignancy according to the scores and the morphological, lymphocytoid, plasmacytoid and mixed types of the TVT. Jataí, Brazil, 2012 72

Tabela 4 Ratio between the number of chemotherapy sessions and the morphological standard prevalent in dogs with the TVT. Jataí, Brazil, 2012 …… 73

CAPÍTULO 3

Tabela 1 Correlação entre as proteínas C-MYC e p53 nos padrões morfológicos linfocitoide, plasmocitoide e misto do TVT canino 89

Tabela 2 Correlação entre a proteína C-MYC e as proteínas p21 e p27 nos padrões morfológicos linfocitoide, plasmocitoide e misto do TVT canino 89

Tabela 3 Correlação entre a proteína p53 e as proteínas p21 e p27 nos padrões morfológicos linfocitoide, plasmocitoide e misto do TVT canino 89

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1 Características do TVT canino experimentalmente transplantado de acordo com as fases evolutivas de progressão, estabilidade e regressão tumoral 10

Quadro 2 Características do TVT genital em relação ao sexo 20

Quadro 3 Critérios gerais, citoplasmáticos e nucleares de malignidade tumoral 28

CAPÍTULO 3

Quadro 1 Classificação do padrão morfológico predominante no TVT ... 80

Quadro 2 Escores de intensidade de coloração atribuídos à análise da marcação dos anticorpos C-MYC, p53, $p21^{WAF1/Cip1}$ e $p27^{Kip1}$ no TVT canino 83

LISTA DE ABREVIATURAS

anti-CD4	Anticorpo anti-linfócito T auxiliar
anti-CD79	Anticorpo pan linfocitário B
anti-CD8	Anticorpo anti-linfócito T citotóxico
AT1	Fragmento 1
AT2	Fragmento 2
AT3	Fragmento 3
BAX	Proteína BAX
BCL-2	Família de genes BCL-2
B-MYC	Gene *B-MYC*
BSA	Albumina bovina
CAAF	Citologia aspirativa por agulha fina
CD4+	Anticorpo anti-linfócito T auxiliar positivo
CD79+	Anticorpo pan linfocitário B positivo
CD8+	Anticorpo anti-linfocitário T citotóxico positivo
CDK	Gene quinase dependente de ciclina
CDKI	Gene inibidor de quinase dependente de ciclina
CDKs	Genes quinases dependentes de ciclina
CDKIs	Genes inibidores de quinase dependente de ciclina
CIP/KIP	Genes inibidores de quinases da família CIP/KIP
CM1	Anticorpo monoclonal anti-p53
C-MYC	Gene *C-MYC*
C-MYC	Proteína C-MYC
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CREB1	Gene CREB1
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Ácido dimetilsulfóxido
DNA	Ácido dexorribonucleico

LISTA DE ABREVIATURAS (Cont.)

E2F	Proteína de regulação gênica
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fig. 1	Figura 1
G	Polegadas
G0	Fase de quiescência (*Gap* 0)
G1	Fase de intérfase (*Gap* 1)
G2	Fase de intérfase (*Gap* 2)
G6PD	Enzima glicose 6-fosfato desidrogenase
HE	Hematoxilina-Eosina
HSPD1	Antígeno HSPD1
HSPD70	Antígeno HSPD70
HSPD90	Antígeno HSPD90
IFN-γ	Interferon γ
IFγ	Interferon γ
IgG anti-TVT	Anticorpo Imunoglobulina G anti-TVT
IHC	Imunoistoquímica
IL-15	Interleucina 15
IL-6	Interleucina 6
IRF1	Fator de transcrição regulatório Interferon 1
LB	Linfócito B
LINE-1	Elemento LINE 1
L-MYC	Gene *L-MYC*
M	Mitose
Mac387	Anticorpo anti-macrófago MAC387
mg/kg	Miligrama/quilo
MHC I e II	Complexo principal de histocompatibilidade I e II
MK 167	Antígeno MK167

LISTA DE ABREVIATURAS (Cont.)

MYC	Gene *MYC*
MYC	Proteína MYC
MYC-1	Proteína MYC-1
MYC-2	Proteína MYC-2
MYC-3	Proteína MYC-3
MYC-S	Proteína MYC-S
NAN3	Ázida sódica
$NF_K\beta_1$	Fator nuclear Kappa β_1
NKs	Célula *natural killer*
N-MYC	Gene *N-MYC*
p15	Proteína p15
p19	Proteína p19
P21	Gene P21
p21	Proteína p21
P27	Gene P27
p27	Proteína p27
P53	Gene P53
p53	Proteína p53
p64	Proteína p64
p67	Proteína p67
pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RPPH1	Gene RPPH1
qT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
rRNA	RNA ribossomal

LISTA DE ABREVIATURAS (Cont.)

S	Fase de síntese (S)
sp.	Espécie
STAT1	Transdutor de sinal e transdutor de ativação 1
STAT3	Transdutor de sinal e transdutor de ativação 3
SV40	*Simian virus vacuolating* 40
Tab	Tabela
TERT	Gene TERT
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
TGF-β_1	Fator de crescimento transformador β_1
TMA	*Tissue microarray* – técnica do microarranjo tecidual
TNC	Antígeno TNC
TRAP	Antígeno TRAP
TVT	Tumor venéreo transmissível
VIM	Gene vimentina
V-MYC	Gene *V-MYC*

RESUMO

O conceito atual sobre carcinogênese refere que células normais se transformam em tumorais por mutações que modificam proto-oncogenes transformando-os em oncogenes, inibem genes supressores tumorais ou que disparam instabilidades genéticas. No entanto, estudos sugerem que alguns tipos neoplásicos podem se comportar como agentes infecciosos e ser transmitidos de um hospedeiro a outro, a exemplo do que ocorre com o tumor venéreo transmissível canino (TVT). A histogênese do TVT não é totalmente conhecida, pois os estudos são controversos e não trazem resultados elucidativos quanto à linhagem celular que caracterizou a neoplasia. Entretanto, as pesquisas continuam com o objetivo de elucidar essa questão e identificar o ancestral genético do TVT. Recentemente, uma classificação citomorfológica foi proposta para o TVT, incluindo os tipos plasmocitoide, linfocitoide e misto. Apesar disso, muitas características de desenvolvimento e comportamento dessa neoplasia transmissível dos cães ainda são pouco entendidas. Nesse sentido, foram avaliados os diferentes padrões morfológicos do tumor, os aspectos macroscópicos, os critérios de malignidade, a identificação molecular da neoplasia, por meio da inserção do elemento LINE-1 no gene *C-MYC*, a expressão imunoistoquímica das proteínas C-MYC, p53, p21 e p27, e a relação entre as proteínas C-MYC, p53, p21 e p27, o bloqueio do ciclo celular e a apoptose das células tumorais. Os resultados indicam que o exame citopatológico permite melhor caracterização dos padrões citomorfológicos e critérios de malignidade do TVT em relação ao exame histopatológico, sendo possível identificar os tipos plasmocitoide, linfocitoide e misto. Constatou-se ainda que o TVT apresenta particularidades morfológicas que podem interferir no comportamento tumoral e na resposta à quimioterapia, especialmente aquelas relacionadas à maior agressividade e que foram observadas no TVT plasmocitoide, tipo citomorfológico mais comum da neoplasia. A identificação do rearranjo molecular LINE1/*C-MYC* caracteriza alteração molecular específica do TVT e pode ser utilizada como método diagnóstico complementar da neoplasia, principalmente em tumores indiferenciados. A análise imunoistoquímica e a relação entre C-MYC, p53, p21 e p27 indicam anormalidades funcionais nessas proteínas, interferindo nos eventos biológicos de controle do ciclo celular e da apoptose, podendo, dessa forma, contribuir nos processos de crescimento e progressão do TVT.

Palavras-chave: aloenxerto, apoptose, cães, ciclo celular, citologia, neoplasia, reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

The present concept about carcinogenesis is that normal cells are transformed into tumor by mutations that activate oncogenes, inhibit tumor suppressor genes or trigger genetic instability. However, studies suggest that some neoplastic types can behave like infectious agents and be transmitted from one host to another, similar to what occurs with the canine transmissible venereal tumor (TVT). The TVT histogenesis is not fully known, because the studies are controversial and do not bring about the results elucidating cell line that characterized the neoplasm. However, research continues in order to elucidate this question and identify the ancestral genetic TVT. Recently, a cytomorphological classification was proposed for the TVT, including plasmacytoid types, linfocitoide and mixed. Nevertheless, many features of the development and behavior of this dogs transmissible neoplasm are still poorly understood. Accordingly, we evaluated the different morphological patterns of the tumor, the macroscopic aspects, the criteria of malignancy, the molecular identification of the tumor, by inserting the element LINE-1 in the *C-MYC* gene, the immunohistochemical expression of the C-MYC, p53, p21 and p27, and the relationship between the proteins C-MYC, p53, p21 and p27, the block of the cell cycle and apoptosis of tumor cells. The results indicate that the cytological examination allows better characterization of patterns and cytomorphologic criteria of malignancy of TVT compared to histological examination, which can identify the types plasmacytoid, linfocitoide and mixed. It was further observed that the TVT presents morphological peculiarities that may interfere with tumor behavior and response to chemotherapy, especially those related to more aggressive and have been observed in plasmacytoid TVT, cytomorphological most common type of this tumor. The identification of molecular rearrangement LINE-1/*C-MYC* features specific molecular changes for TVT that may be introduced as supplementary diagnostic method of cancer, especially in highly undifferentiated tumors. Immunohistochemical analysis and the relationship between C-MYC, p53, p21 and p27 revealed functional abnormalities in these proteins, interfering with biological events in cell cycle control and apoptosis, and may thus contribute to the genesis and neoplastic progression.

Keywords: allograft, apoptosis, cell cycle, cytology, dogs, neoplasm, polymerase chain reaction.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível canino (TVT) é uma neoplasia de células redondas, localizada primariamente na genitália de cães e cuja histogênese ainda é tema controverso. Atualmente uma classificação do TVT tem sido proposta, com base nas características citomorfológicas da neoplasia, sendo reconhecidos os tipos linfocitoide, plasmocitoide e misto (FLORÉZ et al., 2012).

Características marcantes do TVT são a fácil transplantação e o crescimento rápido, que proporcionam oportunidade de estudos envolvendo marcadores de proliferação celular e a cinética tumoral. A regressão espontânea em alguns casos também abre perspectiva para o estudo da morte celular por apoptose e da interação entre a imunidade do hospedeiro e o crescimento tumoral. Adicionalmente, algumas similaridades têm sido apontadas entre o TVT canino e o sarcoma de Kaposi humano no que se refere ao modo de transmissão, estabelecendo o TVT como modelo experimental para o estudo do sarcoma humano (MURCHISON, 2009; STOCKMAN et al., 2011).

O conhecimento dos aspectos epidemiológicos, sinais clínicos, macroscópicos e microscópicos, critérios de malignidade e origem citogenética, assim como a compreensão do comportamento biológico, da imunologia tumoral e das bases moleculares envolvidas no processo neoplásico, ou seja, dos biomecanismos desencadeados por genes reguladores do crescimento, reparo e morte celular, constituem elementos chave para a compreensão das alterações envolvidas na gênese neoplásica (PASSAGLIA & ZAHA, 2003).

Nesse contexto, o TVT desperta a atenção de pesquisadores do mundo todo, os quais tem buscado elucidar a histogênese da neoplasia, bem como identificar possíveis particularidades relacionadas aos diferentes padrões morfológicos que possam justificar predisposição à malignidade, resistência à terapia e prognóstico desfavorável. Dessa forma, a presente pesquisa teve por objetivo principal estudar o TVT canino à luz dos diferentes padrões citomorfológicos da neoplasia. Para isso, seguiram-se os objetivos específicos:

1 Avaliar os padrões citomorfológicos e os principais critérios de malignidade do TVT, utilizando a classificação morfológica, aos exames citopatológico e histopatológico, e relacionar essas características à evolução clínica e à resposta a quimioterapia com sulfato de vincristina;

2 Identificar a inserção do elemento LINE-1 no gene *C-MYC*, verificar a imunorreatividade das proteínas C-MYC, p53, p21 e p27, e avaliar quanto a possível interferência das proteínas C-MYC e p53 nos mecanismos de bloqueio do ciclo celular e apoptose das células neoplásicas, a partir dos diferentes padrões citomorfológicos do TVT canino.

2 TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO (TVT)

2.1 Histórico, epidemiologia e citogênese do TVT

No conceito atual sobre carcinogênese, os tumores originam-se a partir de uma série de mutações genéticas, sejam estas relacionadas à ativação dos oncogenes, à inibição dos genes supressores tumorais ou à ocorrência de instabilidades genéticas que se acumulam em um determinado tecido (DINGLI & NOWAK, 2006; LOBO, 2008). No entanto, alguns tipos neoplásicos fogem a essa regra e podem se comportar como agentes infecciosos, não requerendo a transformação das células do hospedeiro, a exemplo do que ocorre com o TVT canino, que possui importância na rotina clínica veterinária e é alvo de estudos de muitos pesquisadores (MURGIA et al., 2006; PEARSE & SWIFT, 2006).

Há referência sobre outro tipo neoplásico transmissível que acomete a face de marsupiais carnívoros conhecidos popularmente como demônio da Tasmânia (*Sarcophilus harrisii*) (OWEN & PEMBERTON, 2006; UJVARI et al., 2013). No entanto, o TVT apresenta distinto mérito científico por ser o primeiro tumor transmissível experimentalmente descrito na história. Essa descoberta excêntrica despertou amplo interesse dos pesquisadores em todo o mundo e tornou-se novo ponto de partida para o estudo da oncologia (MURGIA et al., 2006).

O TVT, inicialmente chamado sarcoma ou tumor de Sticker, linfossarcoma infeccioso, granuloma venéreo, condiloma canino e tumor de células reticulares, pertence ao grupo das neoplasias de células redondas e sua histogênese ainda é tema controverso (DALECK et al., 2009; STOCKMANN et al., 2011). Considerado um aloenxerto de ocorrência natural, sua linhagem de células cancerígenas é transmitida a cães (*Canis familiaris*) e, ocasionalmente, a outros canídeos susceptíveis, pela transplantação de células tumorais viáveis (DAS & DAS, 2000).

A neoplasia acomete primariamente a genitália externa de cães susceptíveis, a partir da transferência das células cancerígenas por ocasião do coito. Embora diagnosticado com maior frequência nos órgãos genitais, há relatos de localização extragenital primária na pele, glândula mamária, cavidade oral, olho, focinho, tecido subcutâneo e membros (PARK et al., 2006; AMARAL et al., 2012).

O TVT foi caracterizado pelo pesquisador NOVINSKY (1876), há mais de 130 anos, quando conseguiu promover o transplante das células tumorais de um cão portador, por meio do contato direto do tecido neoplásico com a mucosa genital de um cão saudável. Em seguida, o pesquisador Anton Sticker (1906) descreveu o tumor detalhadamente, definindo-o como neoplasia transmissível de localização genital predominante. Em homenagem à contribuição desse pesquisador, o TVT passou a ser referenciado como sarcoma de Sticker (MURCHISON, 2009; STOCKMANN et al., 2011). A partir dessa época, inúmeras pesquisas têm sido realizadas com o intuito de melhor explicar os mecanismos envolvidos no comportamento do TVT como um aloenxerto de ocorrência natural (COHEN, 1985; DASS et al., 1986; LIAO et al., 2003; DINGLI & NOWAK, 2006).

REBBECK et al. (2009) investigaram o ancestral genético do TVT e concluíram que a neoplasia provavelmente tenha se originado a partir de alterações clonais em um único lobo (*Canis lupus*), que viveu entre 7.800 e 78.000 anos atrás, sendo transmitida posteriormente a cães. No entanto, para MURCHISON (2009), apesar dos grandes avanços e descobertas, muitas características acerca dessa neoplasia transmissível ainda são pouco compreendidas.

O TVT apresenta distribuição mundial, mas é comum em regiões tropicais e subtropicais, de clima temperado (LIAO et al., 2003; SANTOS et al., 2005). Considerando essa característica, HAYES et al. (1983) encontraram correlação positiva entre a prevalência do TVT e a temperatura média anual, ao passo que em relação a latitude a correlação foi negativa.

Ainda que a incidência do TVT não seja estimada em muitos países, a presença desse tipo tumoral já foi relatada nos cinco continentes. No Brasil, a neoplasia é endêmica e considerada a terceira mais diagnosticada em cães (ERÜNAL-MARAL et al., 2000). Em estudo retrospectivo realizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, DE NARDI et al.(2002) ao avaliarem 333 cães portadores de neoplasias, verificaram prevalência de 45,64%, 11,7% e 3,3% para neoplasias mamárias, mastocitomas e TVT, respectivamente.

Quanto à predisposição ao sexo, a raça ou idade não há padrão específico (DALECK et al., 2009). Ainda, embora MURCHISON (2009) tenha descrito que a biologia reprodutiva dos cães influencia a transmissão do TVT, pesquisas demonstraram padrão variável quanto à ocorrência nos diferentes sexos.

Nesse sentido, há estudos que apontam maior ocorrência nas cadelas (BRANDÃO et al., 2002) enquanto outros referem os machos como os mais acometidos (AMARAL et al., 2004).

Embora a maioria das investigações não aponte a ocorrência de predisposição racial, SOUSA et al. (2000) e BRANDÃO et al. (2002) descreveram que o TVT é comumente diagnosticado em cães sem raça definida (SRD) e atribuem esse histórico à maior quantidade desses cães e à desvalorização racial. A desvalorização racial pode ser considerada fator social, visto que, de modo geral, os animais mestiços estão inseridos no cenário da comunidade de baixa renda. Assim, a ausência de controle reprodutivo, o acesso às ruas e o abandono são situações corriqueiras que contribuem para maior número de cães errantes mestiços. Em relação à idade, pesquisadores descrevem que o TVT ocorre comumente durante o período de maior atividade reprodutiva dos cães, em média entre dois e cinco anos de idade (VARASCHIN et al., 2001; AMARAL et al., 2012). Dessa forma, as condições do meio ambiente, com ênfase aos hábitos de vida, a convivência em aglomerações, a ausência de controle reprodutivo e a higidez comprometida interferem na ocorrência da enfermidade (DAS & DAS, 2000).

Não há relatos acerca da possibilidade de transmissão hereditária do TVT. No entanto, BROOKS et al. (2003) descreveram que a herança do elemento LINE-1 próxima ao gene *C-MYC* na linhagem germinativa pode representar predisposição ao desenvolvimento do TVT após exposição ao agente oncogênico, semelhante à inserção mendeliana do LINE-1 no gene fator IX, que resulta na expressão da hemofilia B em cães.

A histogênese do TVT não é totalmente conhecida, os estudos são controversos e não trazem resultados elucidativos quanto à linhagem celular que caracterizou a neoplasia (LIAO et al., 2003; SANTOS et al., 2005; MURGIA et al., 2006; PARK et al., 2006; MURCHISON, 2009; BELOV, 2011). Nesse cenário, BLOOM et al. (1951) propuseram inicialmente a classificação do TVT como uma neoplasia indiferenciada de origem reticuloendotelial. Já no século XXI, MACEWEN (2001) classificou o TVT como neoplasia indiferenciada de células redondas, com provável origem reticuloendotelial. KEGLER et al. (2012) e MARINO et al. (2012) apontaram para a origem mesenquimal e histocítica, sendo que KEGLER et al. (2012) encontraram formas amastigotas de *Leishmania* sp. em células tumorais de

TVT (Figura 1), achado comum em neoplasias histiocíticas e que indicaria a provável origem histiocítica desse tumor.

Pesquisas com resultados imprecisos deixavam os estudiosos intrigados na busca de uma resposta confiável e conclusiva quanto à origem do TVT. Entretanto, a partir das descobertas de NOVINSKY (1876), os estudos indicaram que a oncologia estava diante de uma neoplasia completamente atípica, oriunda de um clone tumoral (MURGIA et al., 2006). Nesse contexto, acredita-se que o primeiro clone de células tenha se originado de mutações induzidas por vírus, substâncias químicas ou radiações em células linfo-histiocíticas, e se disseminado entre a espécie canina por meio de implantação alógena (SANTOS et al., 2005).

Estudos citogenéticos que conferem respaldo científico à hipótese da transmissão clonal revelaram que o cariótipo do TVT não equivale ao da espécie canina, que consiste de 78 cromossomos, sendo 76 autossomos acrocêntricos e um par sexual metacêntrico. No TVT, o cariótipo apresenta de 57 a 59 cromossomos. Destes, 15 ou 16 são metacêntricos e 42 ou 43 acrocêntricos. Acrescente-se que essas alterações em relação ao cariótipo são constantes e estáveis nesse tipo tumoral (SANTOS et al., 2005; REBBECK et al., 2009).

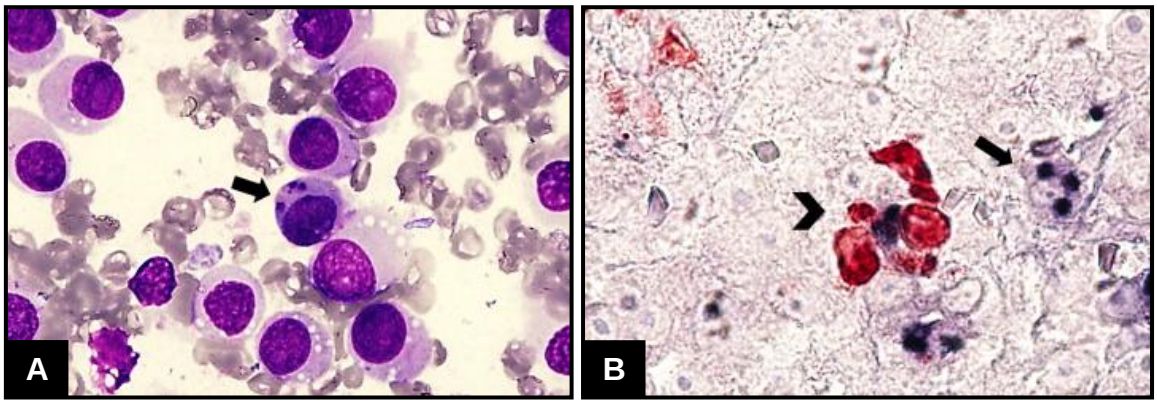


FIGURA 1 - Ocorrência de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no TVT de localização genital. A) Amostra citológica - células redondas, citoplasma basofílico, vacúolos intracitoplasmáticos claros e núcleo excêntrico; amastigotas de *Leishmania* sp. no citoplasma da célula tumoral (seta). Giemsa, 200x. B) Hibridização do rRNA de *Leishmania* sp. apresenta marcação escura, indicando amastigotas no citoplasma de um macrófago marcado para Mac387 em vermelho (ponta de seta) e também no interior de uma célula neoplásica negativa para Mac387 (seta). Hibridização *in situ* e imunoistoquímica - 200x

Fonte: KEGLER et al. (2012)

Embora o número de cromossomos encontrado nas células do TVT seja menor que o das células normais do cão, a quantidade total de DNA e o número de braços dos cromossomos da célula normal aproximam-se daqueles encontrados nas células tumorais. Portanto, há aberração notável no número e na morfologia dos cromossomos do TVT, reforçando o conceito de que as células neoplásicas sucedem de anormalidades citogenéticas da linhagem celular precursora (MUKARATIRWA & GRUYS, 2003).

A partir desses achados, MURGIA et al. (2006) e REBBECK et al. (2009) utilizaram a técnica de genotipagem por microsatélite para confirmar a transmissão clonal do TVT. Ambos os pesquisadores descobriram que o padrão dos polimorfismos encontrados em diferentes regiões do mundo demonstrava evidências de origem monofilética, sendo esses tumores intimamente relacionados e geneticamente diferentes das células normais do cão hospedeiro.

Quanto ao rearranjo genômico obtido pela inserção do elemento LINE-1 no gene *C-MYC*, atualmente utilizado como ferramenta diagnóstica para a identificação molecular do TVT, sugere-se que tal característica tenha se formado na linhagem germinativa do agente precursor da neoplasia. Em seguida, o rearranjo teria se multiplicado somaticamente, com posterior disseminação global (LIAO et al., 2003; MURCHISON, 2009; SPIN et al., 2010).

Apesar da origem comum do TVT, amostras tumorais de diferentes regiões geográficas podem ser geneticamente subdivididas, sugerindo que novas seleções genéticas foram adquiridas após a clonagem da neoplasia original (VÁSQUEZ-MOTA et al., 2008).

2.2 TVT experimentalmente transplantado e de ocorrência natural

A transmissão do TVT ocorre principalmente durante o ato sexual entre cães. No entanto, a disseminação tumoral também acontece em virtude de hábitos sociais como cheirar, lamber e morder, inerentes à espécie (PEARSE & SWIFT, 2006). A autoinfecção por lambedura do tumor genital também deve ser considerada em cães portadores de TVT, principalmente em casos em que há envolvimento nasal, oral ou conjuntival (AMARAL, 2005; GASPAR, 2005). Ainda, o contágio

sexual é influenciado pelo tempo de exposição da neoplasia ao trato genital receptor, bem como pela ocorrência de lesões provocadas na mucosa genital durante o coito, o que proporciona um ambiente favorável à implantação tumoral (COHEN, 1985).

Além dos sítios de implantação, também se pode compreender o comportamento do TVT com base no crescimento da neoplasia. Tumores experimentalmente transplantados apresentam três fases de evolução distintas, a saber: crescimento ou progressão, estabilidade e regressão (CHU et al., 2001), sendo suas respectivas características descritas no Quadro 1. Alternativamente, o TVT experimentalmente transplantado pode não evoluir em consonância às referidas as fases. Nessa condição, os tumores entram em uma segunda fase de progressão, cursando com evolução metastática (EPSTEIN & BENNETT, 1974).

Com frequência, a regressão tumoral associa-se à presença de edema, hemorragia, infiltração de linfócitos e plasmócitos. Além desses parâmetros, necrose, apoptose e fibrose também foram evidenciados por STEWART et al. (1958) e SANTOS et al. (2008) no estágio final da regressão. Segundo SANTOS et al. (2008), apoptose é um achado consistente e representa importante papel na regressão do TVT experimentalmente transplantado. Esses pesquisadores comprovaram ainda que a apoptose depende da ativação do gene supressor tumoral P53. Já SIDDLE & KAUFMAN (2013) demonstraram que a regressão tumoral, por vezes, é seguida por imunidade tumoral.

QUADRO 1 - Características do TVT canino experimentalmente transplantado de acordo com as fases evolutivas de progressão, estabilidade e regressão tumoral

Características observadas	**Fases evolutivas do TVT**		
	Progressão	**Estabilidade**	**Regressão**
Tempo de duração	Palpável entre 10-20 dias pós-implantação, permanecendo durante algumas semanas	Aproximadamente 20 dias, mas pode perdurar por meses ou se estender indefinidamente	Entre duas e 12 semanas pós-fase de estabilidade tumoral
Crescimento	Rápido	Lento	Células morrem até o desaparecimento completo da neoplasia
% perda celular	50%	80-90%	100%

Fonte: Adaptado de CHU et al. (2001) e MURCHISON (2009)

De outra parte, o TVT de ocorrência natural apresenta evolução diferenciada em relação àquele experimentalmente induzido (O'NEILL, 2011). Inicialmente parecem ocorrer as fases de crescimento e estabilidade, mas a regressão tumoral não tem sido bem documentada nesses tumores. Contudo, algumas pesquisas descrevem que o TVT de ocorrência natural evolui à regressão quando estabelecido em cães imunologicamente responsivos (LIAO et al., 2003; PARK et al., 2006; MURCHISON, 2009).

Reforçando a ideia de que o TVT de ocorrência natural tende a não evoluir com a fase de regressão, BRANDÃO et al. (2002) referiram que numerosos estudos clínicos não têm registrado a regressão espontânea do tumor. Ainda, acredita-se que a presença crônica da neoplasia seja contrária à teoria da regressão espontânea do TVT, conforme descrevem BOSCOS et al. (1999).

Metástase consiste em um processo complexo de propagação das células tumorais em diferentes regiões do organismo quando a resposta imune do hospedeiro não é suficiente para eliminar o tumor, e pode estar presente no TVT (MUKARATIRWA & GRUYS, 2003; PEARSE & SWIFT, 2006; STOCKMANN et al., 2011; SIDDLE & KAUFMAN, 2013). No entanto, é relativamente rara no TVT, com ocorrência estimada entre 1,5 e 6% (FERREIRA et al., 2000). Porém, MACEWEN (2001) referiram percentual metastático maior, de aproximadamente 17%.

Os cães filhotes e adultos imunossuprimidos são os principais acometidos por metástase (MURCHISON, 2009; STOCKMANN et al., 2011). Contudo, além da disseminação para a pele que, de acordo com DALECK et al. (2009), é o principal sítio de metástase, há relatos de envolvimento subcutâneo, muscular, esplênico, hepático, renal e peritoneal, bem como de linfonodos, língua e mucosas anal e perianal (NDIRITU et al., 1977; KROGER et al., 1991; BATAMUZI & BITTEGEKO, 1991; BRANDÃO et al., 2002; PARK et al., 2006; AMARAL et al., 2007; BATISTA et al., 2007; CASTELO-BRANCO et al., 2008).

Em muitos casos pode haver a extensão do tumor vaginal à cérvix e ao corpo do útero, e também do TVT nasal para os seios maxilares e faringe (AMARAL et al., 2007). Casos de TVT envolvendo o globo ocular foram relatados por BOSCOS et al. (1999), RODRIGUES et al. (2001) e AMARAL et al. (2012), e podem ocorrer por metástase vascular ou implantação. Há referência de que o envolvimento da

câmara ocular anterior esteja associado à disseminação hematógena e ao acometimento da íris e do corpo ciliar (DAS & DAS, 2000; SANTOS et al., 2005).

Metástase cerebral, com acometimento do lobo frontal esquerdo foi relatada por FERREIRA et al. (2000), em um cão macho de quatro anos. Esses autores descrevem que, semelhante à anatomia humana, os seios venosos longitudinais dos cães fornecem caminho para a metástase cerebral a partir de sítios primários localizados nas cavidades pélvica e abdominal. Também pode haver diferenças quanto à ocorrência de metástase entre machos e fêmeas devido a particularidades na drenagem linfática da genitália externa, sendo que, nos machos, o fluxo é direcionado aos linfonodos inguinais superficiais e lombares e, nas fêmeas, a drenagem segue pelos linfonodos ilíacos internos, o que facilitaria o desenvolvimento de metástases viscerais (ODUYE et al., 1973).

2.3 Imunologia tumoral

O desenvolvimento do TVT é mediado pelo sistema imune. Assim, o conhecimento das características dos antígenos tumorais e a compreensão dos mecanismos de resposta imune nos diferentes estágios do TVT são fundamentais para o entendimento da imunidade tumoral e para o desenvolvimento e/ou implementação de terapia eficaz contra o tumor (LIMA et al., 2012a).

Segundo SWANN & SMITH (2007), o sistema imunológico pode impedir o crescimento neoplásico, mediado principalmente pela atividade dos linfócitos T e IFN-γ. Os autores ainda relacionaram a resposta imune adaptativa à manutenção das neoplasias em fase de repouso, quando o organismo está em condições favoráveis. Portanto, a instalação da neoplasia representa seu sucesso sobre o sistema imune do hospedeiro (STOCKMANN et al., 2011; SIDDLE & KAUFMAN, 2013).

As células neoplásicas podem desenvolver mecanismos intrínsecos para bloquear a resposta imune por uma supressão ativa, incluindo a fraca ativação dos linfócitos T devido à baixa expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC I e II), a supressão linfocitária extrínseca por células T

regulatórias e a apresentação insuficiente de peptídeos antigênicos (MURGIA et al., 2006; SIDDLE & KAUFMAN, 2013).

O bloqueio dos efeitos da resposta imune pode ocorrer, alternativamente, pela seleção de variantes neoplásicos não imunogênicos, fenômeno conhecido como imunoestágio ou imunosseleção da neoplasia (ZOU, 2006; ZITVOGEL et al., 2008). Assim, esses mecanismos são capazes de bloquear tanto a coestimulação quanto a produção e a resposta aos fatores supressivos, impedindo a atuação efetiva do sistema imune no microambiente tumoral (ZOU, 2006).

2.3.1 Bloqueio do sistema imune no TVT por supressão ativa da resposta imune

O TVT experimentalmente transplantado apresenta diferentes eventos biológicos durante as fases de progressão, estabilidade e supressão tumoral, os quais representam a tradução clínica da ação do sistema imune no microambiente tumoral (MUKARATIRWA & GRUYS, 2003; PEARSE & SWIFT, 2006; MURCHISON, 2009; LIMA et al., 2012a).

Considerando a imunobiologia do TVT, após o transplante, as células neoplásicas em progressão apresentam-se refratárias ao reconhecimento imune, sendo esse processo desencadeado por dois mecanismos. Inicialmente as células produzem o fator de crescimento tumoral β_1 (TGF-β_1), uma citocina que promove a supressão das células *natural killer* (NK) e impede a infiltração linfocitária (HSIAO et al., 2004). O segundo mecanismo ocorre devido a essa ausência de linfócitos. Dessa forma, não há produção de interleucina-6 (IL-6) e IFN- γ, por conseguinte, não há expressão do complexo principal de histocompatibilidade de MCH I e II (Figura 2A) (BELOV, 2011). Ainda, LIAO et al. (2003) referiram que a proporção de linfócitos B (LB) é menor durante a progressão tumoral, e que tal redução ocorre em virtude da apoptose desencadeada por proteínas citotóxicas e substâncias circulantes produzidas pelas células do TVT.

A transição da fase de progressão para a de regressão do TVT é marcada por aumento do infiltrado linfocitário e pela indução da expressão do MHC (SIDDLE & KAUFMAN, 2013). Nesse estágio, os linfócitos T citotóxicos iniciam, gradativamente, o processo de povoamento do microambiente tumoral e produzem a citocina pró-inflamatória IL-6. Quando determinado nível limiar é alcançado, essa

citocina, em associação ao interferon γ (IFN-γ), ativa as moléculas do MHC I e II, tendo início a regressão tumoral. Acrescente-se que, *in vivo*, o MHC é induzido por IL-6 e IL-15 (HSIAO et al., 2004; HSIAO et al., 2008; CHOU et al., 2009; BELOV, 2011).

A regressão se distingue pelo aumento da proporção de células do TVT que expressam MHC e do infiltrado linfocitário, associada à presença de mastócitos, apoptose, mitose, proliferação celular, fibrose e necrose celular (Figura 2B). MUKARATIRWA et al. (2006) apontaram que esses parâmetros devem ser analisados criteriosamente, visto que são indicadores do estágio evolutivo do TVT.

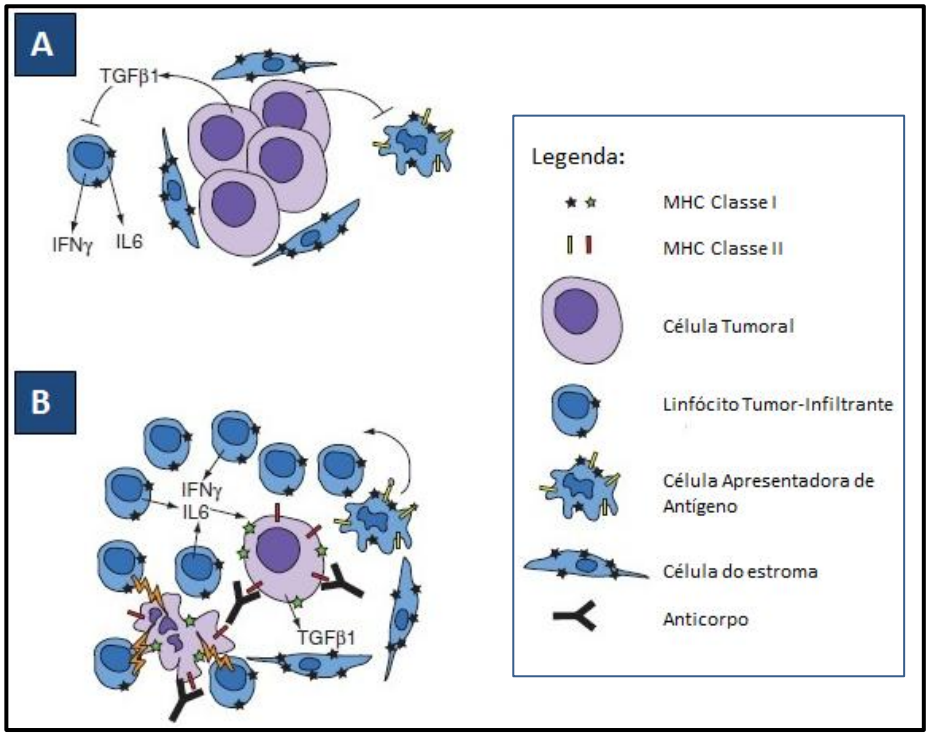


FIGURA 2 - Evasão imune nas fases de progressão e regressão do TVT canino. A) Na progressão, as células tumorais não secretam MHC classe I e II e o tumor secreta TGF-β_1, uma citocina que inibe o linfócito tumor-infiltrante citotóxico, incluindo as células NKs. As células tumorais também podem inibir as células apresentadoras de antígenos. B) Na regressão há aumento dos linfócitos tumor-infiltrante citotóxicos, que secretam IFN-γ e IL-6 que, em associação, reprimem os efeitos do TGF-β_1 derivado do tumor e induz a expressão do MHC classe I e II nas células tumorais

Fonte: MURCHISON, 2009

Acrescente-se que após a regressão, o hospedeiro adquire imunidade subsequente (MURCHISON, 2009). Entretanto, a recidiva do TVT, relatada no estudo de BOSCOS et al. (1999) após dois anos do diagnóstico inicial, demonstrou que a imunidade pode não ser duradoura. Ainda, embora a conquista do sistema imunológico em relação ao TVT possa revelar fragilidade inerente às estratégias de defesa do tumor, sugere-se que a regressão natural possa representar uma adaptação para a manutenção da viabilidade do hospedeiro (MURGIA et al., 2006).

É importante destacar que os linfócitos não expressam o mesmo imunofenótipo durante todo o ciclo celular, ocorrendo mudanças dependentes de estágios de maturação e ativação celular. Além disso, a proporção de linfócitos B e T em determinado local varia em função do tipo de resposta imune, bem como do tipo e extensão da lesão (GONZALEZ et al., 2000). TROMPIERI-SILVEIRA et al. (2009) avaliaram o imunofenótipo do infiltrado linfocitário no TVT experimentalmente transplantado, na região subcutânea e escapular, durante as fases de progressão e regressão, por meio da técnica de imunoistoquímica, com os anticorpos anti-CD79 (pan linfocitário B), anti-CD4 (anti-linfócito T auxiliar) e anti-CD8 (anti-linfócito T citotóxico). Os autores observaram maior quantidade de linfócitos B (CD79+) e T (CD4+ e CD8+) nas fases de regressão e progressão, respectivamente (Figura 3).

Considera-se que o TVT seja antigênico para cães, provocando tanto resposta imune humoral quanto celular. Anticorpos IgG anti-TVT podem ser detectados no soro na maioria dos animais com o tumor, independente do estágio da doença. Embora os anticorpos do TVT não protejam o hospedeiro contra o tumor estabelecido, podem contribuir para o crescimento mais lento do tumor, proteger contra metástases, participar na citotoxicidade das células tumorais durante a fase de regressão e diminuir a susceptibilidade à reinfecção (LIAO et al., 2003).

YANG et al. (1991) encontraram correlação positiva entre os níveis de antígeno tumoral circulante e o volume do tumor. No entanto, EPSTEIN & BENNETT (1974) descreveram que os níveis de anticorpos séricos não se relacionam fortemente com o volume do tumor. Como exemplo, os autores relataram que os anticorpos podem ser indetectáveis no soro de filhotes com metástase de TVT, ao passo que poucas células metastáticas são capazes de expressar anticorpos anti-TVT.

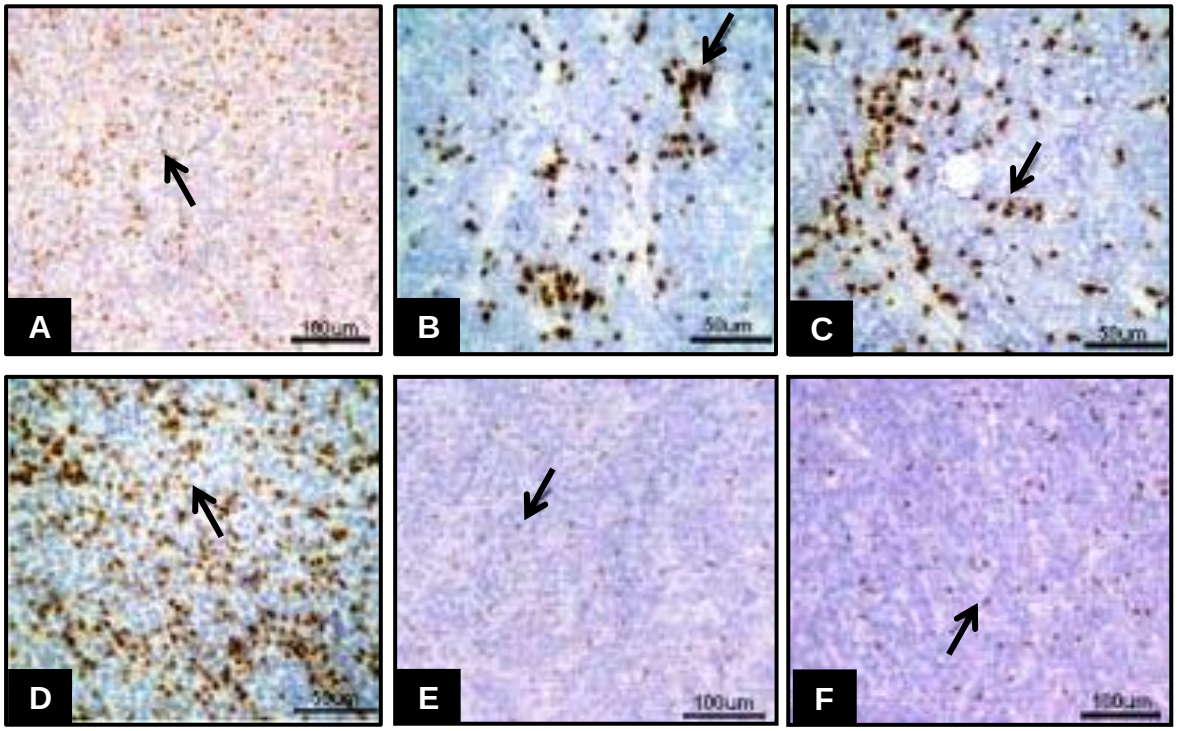


FIGURA 3 - Fotomicrografia do TVT experimentalmente transplantado em cão. A) (CD79+), B) (CD4+) e C) (CD8+) - progressão tumoral. D) (CD79+), E) (CD4+) e F) (CD8+) - regressão tumoral. A marcação para linfócitos B (CD79+) é menor na progressão (A) em relação à regressão (D). Já a marcação para linfócitos T (CD4+ e CD8+) predomina na progressão (B e C) em relação à regressão (E e F)

Fonte: Adaptado de TROMPIERI-SILVEIRA et al. (2009)

2.3.2 Bloqueio do sistema imune no TVT pelo fenômeno do imunoestágio

O imunoestágio é comumente utilizado para explicar o bloqueio do sistema imune no TVT de ocorrência natural que, em muitos casos, permanece continuadamente na fase de progressão, podendo evoluir à metástase (MURCHISON, 2009; LIMA et al., 2012a). DUNN et al. (2004) descreveram o imunoestágio em três fases, incluindo eliminação, equilíbrio e escape.

Na fase de eliminação, as células e proteínas do sistema imune detectam e eliminam células neoplásicas que resultaram da falha de mecanismos intrínsecos de supressão tumoral. Essa fase se completa quando todas as células neoplásicas são eliminadas. No entanto, se a eliminação for parcial, o processo evolui ao segundo estágio (DUNN et al., 2004). Na segunda fase, ocorre equilíbrio temporário entre o sistema imune e o microambiente do tumor, que permanece em dormência

ou evolui lentamente, acumulando mutações no DNA e pleomorfismo na expressão gênica, modulando a expressão dos antígenos tumorais específicos. Nesse momento, o sistema imune exerce pressão seletiva para eliminar células vulneráveis e impedir a expansão clonal, controlando a progressão tumoral (BERGMAN, 2010).

Se a resposta imunológica não for suficiente para eliminar as células que sofreram mutação, o processo evolui e ocorrerá a seleção de variantes de células tumorais resistentes à imunidade antineoplásica, caracterizando assim a fase de escape. Durante essa fase, ocorre uma série de mutações gênicas e a neoplasia geralmente apresenta comportamento biológico maligno, crescendo de forma descontrolada e progressiva, com a possibilidade de infiltrar o sítio primário e alcançar órgãos distantes pelo processo de metástase (ZOU, 2006).

A transmissão do TVT ocorre quando as células modificam o microambiente e se instalam em hospedeiros alogênicos (FASSATI & MITCHISON, 2010). Por vezes, após a fase de crescimento inicial, o tumor regride e desaparece, caracterizando a fase de eliminação, que também inclui a formação de anticorpos contra a neoplasia (SANTOS et al., 2008). Quando não eliminada, a neoplasia evolui ao equilíbrio, apresentando crescimento gradativo e lento, inicialmente visualizado como pápulas hiperêmicas (TROMPIERI-SILVEIRA, 2009). Se o tumor persiste, a evolução se torna rápida e as células neoplásicas apresentam falhas em expressar moléculas do MHC. Dessa forma, células não imunogênicas escapam da resposta imune e a lesão pode se disseminar pelo organismo do hospedeiro, culminando com a morte, especialmente de animais imunossuprimidos (LIAO et al., 2003).

2.4 Métodos de diagnóstico do TVT

As características clínicas geralmente conferem subsídios consistentes ao diagnóstico do TVT. No entanto, em muitos casos, principalmente em tumores de localização extragenital, os exames complementares são determinantes à confirmação diagnóstica (SCARPELLI et al., 2010). Dentre os testes utilizados destacam-se as análises citopatológica, histopatológica, ultraestrutural, imunoistoquímica e gênica (HARMELIN et al., 2002; MURGIA et al., 2006; SPUGNINI et al., 2008; STOCKMANN et al., 2011; FLORÉZ et al., 2012).

2.4.1 Sinais clínicos e aspectos macroscópicos

Na rotina veterinária, a suspeita de TVT surge a partir de sinais clínicos característicos. Uma abordagem sistemática, com considerações sobre o histórico e os hábitos do paciente, somados à análise criteriosa dos aspectos da lesão são condutas essenciais ao correto direcionamento e elucidação do diagnóstico (MEUTEN, 2002; DALECK et al., 2009; McGAVIN & ZACHARY, 2009).

Os sinais clínicos do TVT são distribuídos em gerais e específicos, e relacionados ao local da neoplasia, a higidez e ao sexo. Os sinais gerais incluem aumento de volume visível, deformação da região genital, secreção fluida serossanguinolenta ou hemorrágica, intermitente ou persistente, bem como odor nauseabundo e lambedura excessiva da região. Contudo, a condição física geral do animal é comumente preservada (BATAMUZI & BITTEGEKO, 1991; DAS & DAS, 2000).

O TVT de ocorrência natural pode ser único ou múltiplo e quase sempre localizado na genitália externa. As massas são características e facilmente reconhecidas ao exame clínico, no qual se apresentam firmes, de aspecto friável e coloração branco-acinzentada a avermelhada devido à vascularização. A superfície apresenta sinais constantes de ulceração, inflamação e necrose, além de infecção bacteriana. O tamanho varia de 0,5 a 10 cm de diâmetro, podendo apresentar maior dimensão. Hemorragias são comuns em decorrência da natureza friável da massa tumoral (AMARAL, 2005; PARK et al., 2006; STOCKMANN et al., 2011).

Inicialmente, os tumores na genitália externa, em ambos os sexos, surgem como pequenas pápulas hiperêmicas, progridem para proliferações nodulares, papilares multilobuladas e, posteriormente, adquirem aspecto pedunculado ou de couve-flor (GASPAR, 2005; SANTOS et al., 2005). Entretanto, segundo MEDLEAU & HNILICA (2003), mesmo que em condições raras, o TVT pode apresentar superfície lisa e não hemorrágica, o que dificulta o diagnóstico clínico presuntivo.

A depender da localização e extensão do tumor podem ocorrer hematúria, disúria e obstrução mecânica ao fluxo da urina, conforme relatado por SOUSA et al. (2000). COHEN (1985) relatou policitemia em cães com TVT experimentalmente transplantados, com níveis elevados de eritropoetina sérica e no tumor. Em

contrapartida, TINUCCI-COSTA (1994), ao estudar 40 cães portadores da neoplasia, observou que em 57% dos casos o número de eritrócitos encontrava-se abaixo dos valores normais, fato também confirmado por ROGERS (1997), que afirmou que esses achados não são frequentes no TVT de ocorrência natural.

Em oposição às características do TVT genital, os tumores extragenitais nem sempre apresentam morfologia típica, sendo necessários exames complementares para a conclusão diagnóstica (ODUYE et al., 1973). Esses podem se desenvolver em sítios como pele, tecido subcutâneo, olho, cavidade oral, nasal e perianal (BATAMUZI & BITTEGEKO, 1991; BOSCOS et al., 1999; FERREIRA et al., 2000; AMARAL et al., 2004; AMARAL et al., 2007; CASTELO-BRANCO et al., 2008).

Em relação às neoplasias cutâneas, estudos sugeriram que precedendo a neoformação é necessária a injúria tecidual, como mordidas e arranhões, que são frequentes em cães errantes. Esses tumores costumam ser circunscritos, exibem nodulações isoladas ou múltiplas, medem entre dois e cinco centímetros de diâmetro e apresentam consistência firme e formas nodular, papilar ou multilobulada (DAS & DAS, 2000; AMARAL et al., 2004). Quando ulceradas, as massas apresentam bordas elevadas e coloração brancacenta, cinza ou rosada, avermelhadas ao centro, friáveis e quase sempre associadas à exsudato purulento (CASTELO-BRANCO et al., 2008).

Na cavidade oral (Figua 4) e tonsilas, o TVT apresenta aparência similar à neoplasia genital, porém tende a ser difuso e menos pedunculado ou lobulado. Acrescente-se que na cavidade oral raramente ulceram (DAS & DAS, 2000). Quando a localização se estende ao sítio nasal, usualmente os animais apresentam episódios de espirro, epistaxe, dispneia, respiração estertorosa e deformação facial. Invasão do seio maxilar com lise óssea e perda dentária também são intercorrências relacionadas à expansão nasal do TVT (GASPAR, 2005).

O crescimento periocular do TVT (Figua 4) pode resultar em cegueira e as massas oculares primárias se desenvolvem a partir da conjuntiva, como reportado por BOSCOS et al. (1999). No entanto, são associadas à implantação ou metástase (RODRIGUES et al., 2001; BATISTA et al., 2007). Em um relato na órbita direita, AMARAL et al. (2012) não definiram a exata via de acesso das células neoplásicas ao globo ocular, porém inferiram como provável causa a implantação, visto ser a via de acesso mais frequente do TVT localizado nessa região anatômica.

BATAMUZI & BITTEGEKO (1991) referiram as regiões perianal e anal como sítio do TVT e reportaram um caso genital e anal em que o implante anal possivelmente ocorreu devido a um processo alérgico cutâneo, que teria facilitado a inoculação das células neoplásicas a partir do prurido e da injúria cutânea.

Particularidades do TVT quanto ao sexo do cão são referidas por MACEWEN (2001) e SANTOS et al. (2005) (Quadro 2).

QUADRO 2 - Características do TVT genital canino em relação ao sexo

Machos	**Fêmeas**
Aspecto papular, nodular e multilobular	Aspecto de “couve-flor”
Difícil visualização, sendo frequentemente necessária a exposição peniana	Facilmente visualizado
Localizado na porção caudal do pênis, na área da glande e ocasionalmente no prepúcio	Localizado na porção caudal da vagina, junção vestíbulo-vagina, próximo ao orifício uretral
Secreção pode ser confundida com prostatite	Secreção pode ser confundida com estro, uretrite ou cistite
Intercorrência ocorre por obstrução mecânica ao fluxo da urina, fimose e parafimose	Intercorrência ocorre por obstrução mecânica ao fluxo da urina e parto distócico

Fonte: Adaptado de MACEWEN (2001) e SANTOS et al. (2005)

No entanto, apesar da apresentação clínica peculiar, o diagnóstico definitivo do TVT extragenital e, em determinadas situações, do genital (Figua 4), apenas se confirma com o auxílio dos exames laboratoriais complementares (DALECK et al., 2009).

FIGURA 4 - Aspecto macroscópico do TVT canino em diferentes localizações anatômicas. A) Pênis e prepúcio. B) Vulva. C) Globo ocular direito. D) Cavidade oral

Fonte: A) www.redevet.com.br; B) www.petcare.com.br;
C) compaixaoanimal.blogspot.com. Acesso em: 22 maio.2013.

2.4.2 Análises citopatológica, histopatológica e características fenotípicas

As análises citopatológica e histopatológica são eletivas para a confirmação diagnóstica do TVT e compreendem ferramentas extremamente úteis na rotina em virtude da precocidade diagnóstica, facilidade na execução, baixo custo e risco mínimo (GONZALEZ et al., 2000; GASPAR, 2005; BASSANI-SILVA et al., 2007; TROMPIERI-SILVEIRA et al., 2009; AMARAL et al., 2012).

Devido a alta celularidade nas amostras de TVT, a análise citopatológica tem sido o método de escolha, pelos pesquisadores do tema, frente à histopatologia (SÁNCHEZ-SERVÍN et al., 2009; TROMPIERI-SILVEIRA et al., 2009).

Estudos revelaram que a técnica citopatológica é mais simples, menos invasiva, indolor e produz menor distorção da morfologia celular frente às amostras teciduais fixadas em formaldeído (ERÜNAL-MARAL et al., 2000; AMARAL, 2005). Dentre as técnicas citológicas predominam a citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) e a citologia de impressão ou *imprint* (DAS & DAS, 2000).

A CAAF é um procedimento de obtenção de células de uma lesão alvo por meio de aspiração com agulha de diâmetro entre 22 e 25G ou menor. Dentre as vantagens está o fato de que, virtualmente, qualquer massa palpável ou visível por meio de recursos de imagens pode ser submetida à técnica. Portanto, é grande aliada no diagnóstico de neoplasias de localização intracorpórea, particularmente de lesões neoplásicas metastáticas (AMARAL et al., 2004; DALECK et al., 2009).

A citologia por impressão, também chamada citologia por decalque ou *imprint*, é utilizada para a obtenção de células superficiais por meio de suave compressão de uma lâmina histológica contra a superfície do tecido a ser analisado. Em virtude do alto grau de celularidade do TVT, o *imprint* tem sido o mais utilizado na rotina diagnóstica a partir de fragmentos do tumor ou da secreção genital (ERÜNAL-MARAL et al., 2000; MEUTEN, 2002; BATISTA et al., 2007).

Independente da técnica, as pesquisas demonstraram que em relação ao diagnóstico dos tumores de células redondas de modo geral, as características citológicas são mais definitivas do que as histológicas (Figura 5) (DUNCAN & PRASSE, 1979). Apesar disso, o exame ainda é pouco utilizado em medicina veterinária, principalmente no Brasil (AMARAL et al., 2004).

Microscopicamente, o TVT é composto por células redondas, arranjadas em massas compactas e agrupadas ou dispostas em cordões, entremeadas por delicado estroma conjuntivo vascular (MEUTEN, 2002). O tamanho das células pode variar entre 14 e 30µm de diâmetro. O núcleo geralmente é único, grande, hipercromático, redondo ou oval e localizado centralmente, embora possa apresentar localização excêntrica (WELLMAN, 1990). A cromatina, grosseiramente granular, se apresenta distintamente marginal, com nucléolo proeminente. O citoplasma é moderado, ligeiramente eosinofílico, de limites mal definidos e contém vacúolos distintos, que são múltiplos, pequenos, claros e geralmente acompanham o bordo celular (Figura 6) (HILL et al., 1984; LIAO et al., 2003; PARK et al., 2006).

Entretanto, ROGERS (1997) mencionou que determinadas células de TVT não apresentam vacúolos intracitoplasmáticos.

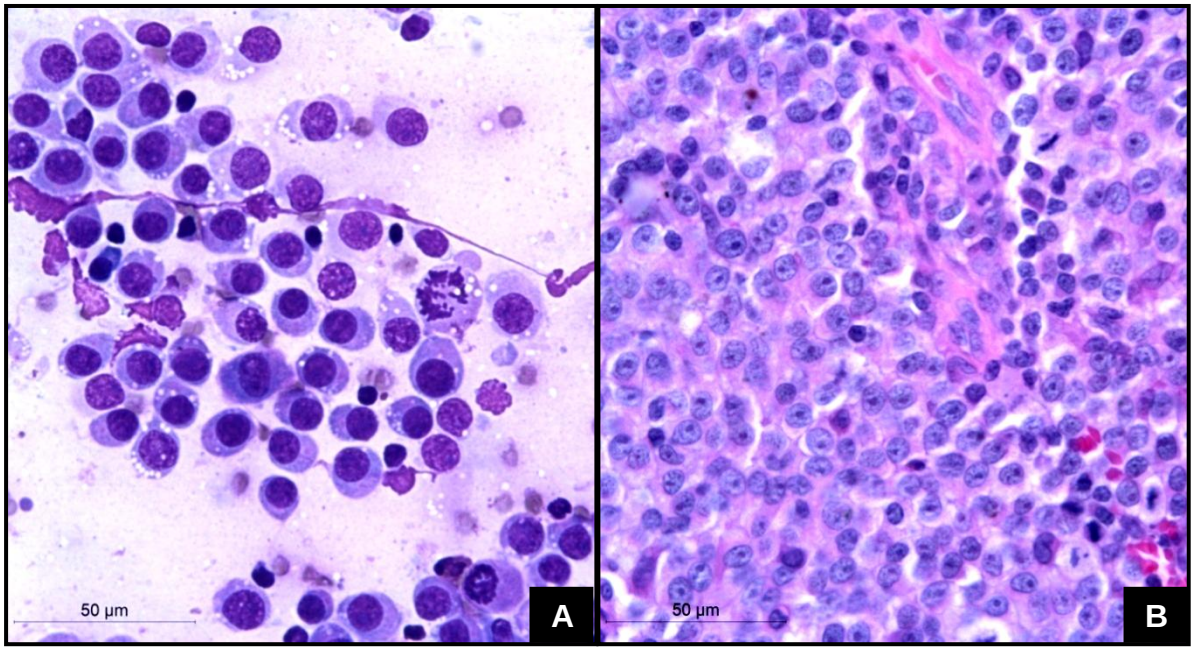


FIGURA 5 - Fotomicrografias de TVT canino. A) Técnica citológica (Giemsa) e B) histológica (HE) em amostras do mesmo animal. Características celulares melhor preservadas e evidenciadas em A em relação a B

As células neoplásicas são dispostas paralelamente a vasos sanguíneos e linfáticos, apresentando alta relação núcleo/citoplasma (ROGERS, 1997; DAS & DAS, 2000; STOCKMANN et al., 2011). No entanto, VARASCHIN et al. (2001) registraram que o TVT de maior potencial maligno apresenta citoplasma abundante. Figuras mitóticas e células inflamatórias, particularmente plasmócitos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos, também são características celulares dessa neoplasia (SANTOS et al., 2001; KEGLER et al., 2012). Já BOSCOS et al. (1999) e SANTOS et al. (2001) observaram que, ao exame citológico, podem ser notadas células com morfologia redonda, oval ou poliédrica, todas com dimensões uniformes.

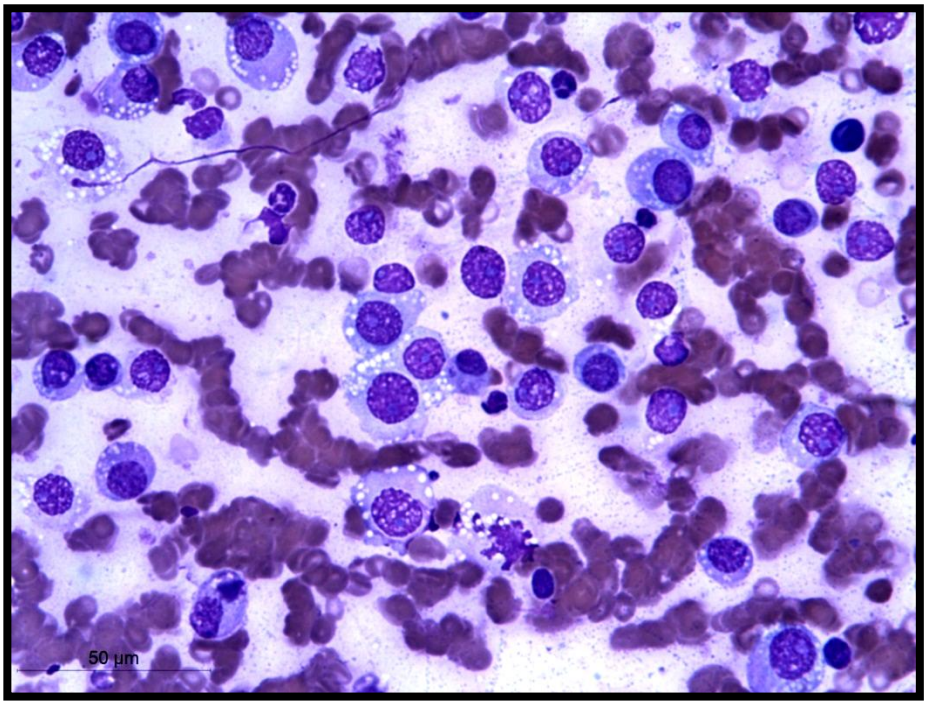


FIGURA 6 - Fotomicrografia de TVT canino. Amostra citológica de alta celularidade, com células redondas, de núcleos grandes, nucléolo proeminente e citoplasma ligeiramente eosinofílico, com vacúolos intracitoplasmáticos. Giemsa

As amostras de TVT apresentaram diferenças morfológicas de acordo com o estágio do tumor, principalmente nos experimentalmente transplantados (AMARAL et al., 2004; BASSANI-SILVA et al., 2007; STOCKMANN et al., 2011). Durante a progressão, as células são arredondadas, dispostas difusamente, intercaladas ao estroma conjuntivo e há figuras de mitose. No período de estabilidade ou transição entre a progressão e a regressão, os linfócitos foram recrutados e se infiltraram no sítio neoplásico, ficando amplamente distribuídos em associação ao estroma conjuntivo. No final da regressão tumoral, o tecido neoplásico estava colapsado, havia corpos apoptóticos e formação de tecido conjuntivo fibroso (Figura 7) (KENNEDY et al., 1977; CHU et al., 2001; HSIAO et al., 2002; AMARAL et al., 2007).

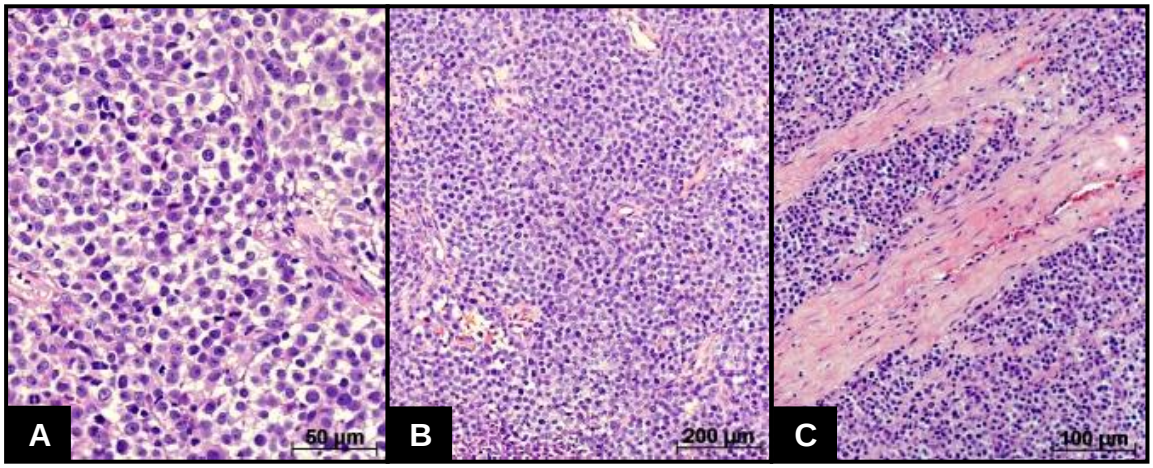


FIGURA 7 - Aspectos microscópicos das fases da evolução do TVT. A) Progressão, em que se observa alta celularidade, mitoses e tecido conjuntivo escasso. B) Estabilidade tumoral, transição entre as fases de progressão e regressão. C) Final da regressão tumoral na qual o parênquima tumoral colapsado é substituído por tecido fibroso. HE

Fonte: STOCKMANN et al. (2011)

As diferenças na morfologia do TVT ainda incluem tipos celulares maiores e ovoides em relação à morfologia típica, e a ausência de vacúolos citoplasmáticos. Muitas vezes o aspecto celular também pode variar entre o tumor primário e a metástase, ou ser atípico nos tumores antigos (ROGERS, 1997; AMARAL, 2005). A hipótese mais consistente para justificar a ocorrência dessas particularidades relaciona-se à existência de diferentes linhagens celulares de TVT que poderiam influenciar o comportamento biológico tumoral, com efeitos sobre a malignidade e a habilidade em produzir eritropoetina ou metástase (GASPAR, 2005).

Desde 1994, fundamentados na hipótese de que os tipos morfológicos do TVT poderiam apresentar comportamentos biológicos distintos frente à quimioterapia e à agressividade neoplásica, um grupo de pesquisadores iniciou o processo de tipificação tumoral. Recentemente e com base nas características citomorfológicas, o grupo propôs a classificação do TVT, que inclui os tipos plasmocitoide, linfocitoide e misto. Trata-se de uma classificação simples e confiável, que visa a padronização do estadiamento do TVT e permite melhor compreensão das variantes da neoplasia, bem como a elaboração de estratégias terapêuticas de acordo com o comportamento biológico de cada tipo citomorfológico (FLORÉZ et al., 2012).

O tipo linfocitoide é caracterizado quando mais de 60% das células são redondas, com citoplasma finamente granular e com poucos vacúolos claros, núcleo redondo localizado centralmente, com padrão de cromatina grosseira e um ou dois nucléolos distintos. O tipo plasmocitoide se distingue quando mais de 60% das células são ovoides, com núcleo localizado excentricamente e citoplasma abundante preenchido por numerosos vacúolos claros. O tipo misto compreende tumor de padrão celular combinado entre as formas plasmocitoide e linfocitoide, e em que nenhum tipo excede o total de 59% (Figura 8) (FLORÉZ et al., 2012).

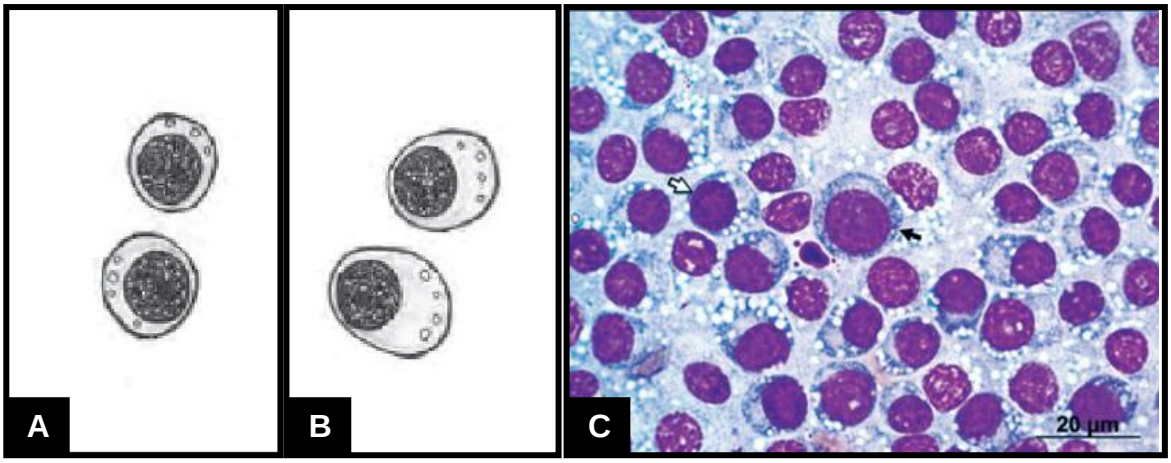


FIGURA 8 - Aspectos morfológicos do TVT canino. A e B) Esquema citomorfológico dos tipos linfocitoide e plasmocitoide, respectivamente. C) Fotomicrografia de CAAF de TVT apresentando padrão morfológico linfocitoide (seta preta) e plasmocitoide (seta branca) concomitante. Giemsa

Fonte: A e B) AMARAL (2005) e C) FLORÉZ et al. (2012)

Embora essa classificação tenha sido apresentada ao meio científico recentemente, pesquisas já foram publicadas utilizando esse sistema, tanto para verificar os padrões morfológicos do TVT quanto a possível relação entre diferentes parâmetros biológicos e os tipos citomorfológicos (AMARAL et al., 2007; GASPAR et al., 2010). A exemplo, BASSANI-SILVA et al. (2003) relataram graus de agressividade e comportamento biológico devido a diferentes linhagens celulares do TVT, o que foi confirmado por MURGIA et al. (2006), ao analisar fragmentos de DNA de cinco amostras de TVT. Esses autores observaram diferenças genéticas entre os tumores e inferiram que o clone ancestral possivelmente foi dividido em duas subclasses, disseminadas a várias regiões geográficas do mundo.

Sabe-se do envolvimento da glicoproteína-p no processo de resistência quimioterápica. Nesse cenário, GASPAR et al. (2010) avaliaram a imunorreatividade dessa proteína nos tipos citomorfológicos do TVT e detectaram maior reatividade no tipo plasmocitoide, apontando que esta linhagem de TVT possivelmente apresenta comportamento maligno mais agressivo em comparação à linfocitoide.

Além da identificação, também é possível descrever o grau de diferenciação do tumor, que em associação às características morfofisiológicas e estruturais revelaram informações valiosas para a orientação da abordagem terapêutica (MEUTEN, 2002; DALECK et al., 2009). O potencial de malignidade pode ser considerado a partir do grau de diferenciação, atipia e índice mitótico de neoplasias. A citopatologia também se aplica à determinação dos critérios de malignidade, contribuindo na estimativa do potencial maligno neoplásico (GREENINGS, 1993).

De acordo com WILKENING et al. (2003), os critérios de morfologia e função estão relacionados, justificando a necessidade de investigar as diferenças citomorfológicas. A presença de três ou mais critérios de malignidade em quantidade significativa pode indicar o potencial maligno de uma neoplasia (DALECK et al., 2009), o que também se aplica ao TVT. Além disso, algumas pesquisas buscam abordar possíveis correlações entre esses critérios e os diferentes padrões morfológicos do TVT, visando, sobretudo, identificar o potencial maligno e a resistência quimioterápica em cada tipo citológico da neoplasia (GASPAR, 2005; SALAMANCA et al., 2008; GASPAR et al., 2010; FLORÉZ et al., 2012).

Os critérios de malignidade são classificados em gerais, citoplasmáticos e nucleares (Quadro 3). Dos gerais, destacam-se anisocitose, anisocariose, macrocariose, basofilia e eosinofilia citoplasmáticas, vacúolos citoplasmáticos e corpos linfoglandulares. Os citoplasmáticos incluem células em fuso e em girino, fagocitose e projeções citoplasmáticas. Já os nucleares referem-se hipercromasia, binucleação, multinucleação, pseudoinclusão e mitose (ERÜNAL-MARAL et al., 2000; MEINKOTH & COWELL, 2002; McKINLEY, 2004; AMARAL, 2005). Ressalte-se que, a análise dos critérios citoplasmáticos deve ser cuidadosamente conduzida devido a muitas alterações dessa ordem também ocorrer em processos degenerativos benignos. De outra parte, os critérios nucleares são os mais

específicos, pois ocorrem com menor frequência em displasias induzidas por inflamações (DALECK et al., 2009; McGAVIN & ZACHARY, 2009).

QUADRO 3 - Critérios gerais, citoplasmáticos e nucleares de malignidade tumoral

CRITÉRIO	DESCRIÇÃO
Critérios Gerais	
Anisocitose e macrocitose	Variação no tamanho de células de mesma origem e células gigantes ≥1,5 vez maior que o normal
Anisocariose e macrocariose	Variação de tamanho nuclear devido ao aumento do DNA sem divisão celular. Geralmente, associada à hipercromasia
Basofilia e eosinofilia citoplasmática	Reflete o estado metabólico da célula. Células imaturas ou altamente ativadas apresentam basofilia. Eosinofilia pode ser apresentada por plasmócitos ricos em imunoglobulinas dissolvidas no citoplasma, denominados de flame cells
Corpos linfoglandulares	Pequenas estruturas citoplasmáticas, destacadas das células
Hipercelularidade	Esfoliação celular abundante pela diminuição da adesão intercelular
Pleomorfismo	Variação de tamanho e forma nucleares e celulares
Vacúolos citoplasmáticos	Estrutura celular presente no citoplasma, limitada por membrana, cujo conteúdo é variável
Critérios Citoplasmáticos	
Célula em fuso	Alteração da forma celular que adquire aspecto em fuso
Célula em girino	Alteração da forma celular que adquire aspecto de girino
Fagocitose	Processo utilizado pela célula para englobar partículas e/ou microorganismos
Projeções citoplasmáticas	Pseudopódes; arranjos característicos, conhecidos como filopodia, que produzem interdigitações entre as células vizinhas
Critérios Nucleares	
Binucleação	Presença de dois núcleos em uma mesma célula não binucleada originalmente
Cromatina nuclear grosseira	Cromatina grosseira, em forma de “corda”
Hipercromasia	Aumento da afinidade tintorial nuclear
Mitose anormal	Divisão celular anormal, formando células tripolares, multipolares, ou com perda de cromossomos
Molde nuclear	Compressão de núcleos de uma mesma célula ou de células adjacentes
Multinucleação	Vários núcleos em uma mesma célula não multinucleada originalmente
Núcleo/citoplasma anormal	Células com relação núcleo/citoplasma de 1:2 e 1:1, com exceção de células de origem linfoide
Nucléolo anormal	Macronucleólise (>5µm), nucléolos angulares e anisonucleólise
Pseudoinclusão	Vacúolos nucleares; invaginação da membrana nuclear

Fonte: Adaptado de MEINKOTH & COWELL, 2002; AMARAL 2005 e DALECK et al. (2009)

AMARAL (2005) avaliou os critérios de malignidade nos diferentes padrões morfológicos de 132 cães portadores de TVT. Dentre os critérios avaliados verificaram-se macrocariose, basofilia e eosinofilia citoplasmática, corpúsculos linfoglandulares, células em girino, hipercromasia, pseudoinclusões nucleares,

mitoses anormais e multinucleação. Diante dos resultados, concluiu-se que as características de malignidade estavam bem caracterizadas no TVT, independente do padrão morfológico, exceto pela presença de células com formato de girino, que foram características nos tumores linfocitoides. Foi relatada ainda a menor propensão do tipo linfocitoide à manifestação de anomalias nucleares que o plasmocitoide, sugerindo maior predisposição à malignidade para este último padrão.

ERÜNAL-MARAL et al. (2000) e McKINLEY (2004) igualmente avaliaram diferentes critérios de malignidade em amostras de TVT e verificaram, dentre outros, hipercromasia e pseudoinclusão. Os pesquisadores associaram esses achados ao aumento do conteúdo de DNA em preparação para a divisão celular, inferindo que esses parâmetros poderiam ser indicativos do elevado índice mitótico do TVT.

2.4.3 Características ultraestruturais, imunoistoquímica e expressão gênica do TVT

As características ultraestruturais das células do TVT são bem padronizadas (MURCHISON, 2009). Observadas em microscopia eletrônica de transmissão, incluem núcleo redondo a oval, com membranas nucleares frequentemente invaginadas por extensões citoplasmáticas, cromatina nuclear homogênea e discreta, nucléolo volumoso e proeminente (HILL et al., 1984). No citoplasma são observados retículos endoplasmáticos granulares, os ribossomos livres, ou como polissomos de distribuição irregular. As mitocôndrias são agrupadas, de morfologia redonda ou oval e com cristas raras. Apresenta complexo de Golgi pouco desenvolvido (HARMELIN et al., 2002; DALECK et al., 2009).

A superfície celular apresenta arranjos característicos de projeções citoplasmáticas, conhecidas como filopodia, que produzem interdigitações entre as células vizinhas (KENNEDY et al., 1977; PLACKE et al., 1987). HILL et al. (1984) inferiram que essas projeções poderiam representar um mecanismo de disseminação do antígeno tumoral, como forma de escape do sistema imunológico do hospedeiro.

Em tumores experimentalmente transplantados inicialmente observaram-se células redondas, frouxamente arranjadas, que se uniam à medida que evoluiam,

devido ao aumento das interdigitações de membrana. Por ocasião da regressão, observaram-se características degenerativas e alteração da morfologia celular, que assumia aspecto similar a fibroblastos, além de apresentar um complexo lamelar de natureza desconhecida (KENNEDY et al., 1977; HARMELIN et al., 2002).

AMBER et al. (1985) descreveram partículas icosaédricas, eletrodensas e de tamanho uniforme no citoplasma das células de TVT degeneradas ou necróticas, sugerindo partículas virais. No entanto, até o momento nenhuma característica ultraestrutural específica compatível com vírus foi identificada (ROGERS, 1997).

Em determinadas circunstâncias, como na grande indiferenciação do tumor, técnicas refinadas, de maior especificidade, são requeridas tanto para a caracterização neoplásica quanto para a identificação de danos ao material genético e particularidades de tradução proteica. As análises gênicas e imunoistoquímicas também são relacionadas para o TVT (DALECK et al., 2009).

A imunoistoquímica constitui ferramenta laboratorial amplamente empregada na medicina e, cada vez mais, na medicina veterinária, como método auxiliar decisivo de identificação, classificação e prognóstico das neoplasias. A técnica possibilitou avanço na definição precisa do tipo celular de neoplasias indiferenciadas ou de origem desconhecida, muitas vezes impraticável à morfologia (TAYLOR & COTE, 1994; AMARAL, 2005; DALECK et al., 2009).

Os anticorpos monoclonais específicos permitem identificar marcadores ou produtos celulares, sendo possível determinar histogênese e antígenos específicos em tecidos. Estudos demonstraram que anticorpos contra antígenos humanos, podem, igualmente, reconhecer epítopos em tumores de cães e gatos (WILLIAMSON & MIDDLETON,1998; MARINO et al., 2012; KEGLER et al., 2012).

Particularmente quanto às neoplasias de células redondas, o imunofenótipo muitas vezes é determinante à conclusão da histogênese tumoral em virtude da similitude morfológica desses tumores. Assim, a imunoistoquímica deve ser considerada para evitar diagnósticos incorretos (MOORE et al., 2000).

Paralelamente à imunoistoquímica, na década de 1970, novas formas de análise das moléculas celulares surgiram no meio científico, o que permitiu o avanço considerável na área da biologia molecular. Dessas técnicas destacam-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), a reação em cadeia da polimerase em tempo real

(q-PCR), a hibridização *in situ*, o sequenciamento de DNA, o *Southern Blot*, o *Northern Blot* e o *Westhern Blot* (PASSAGLIA & ZAHA, 2003).

A PCR consiste em técnica relativamente simples, rápida e sensível, em que moléculas de DNA são amplificadas milhares ou milhões de vezes, a partir de uma quantidade mínima de amostra. Tal característica tem possibilitado a aplicação da técnica não somente na pesquisa básica, mas também na aplicada, abrindo perspectivas em várias áreas do conhecimento (PASSAGLIA & ZAHA, 2003).

A imunoistoquímica e as diferentes técnicas da biologia molecular também são empregadas para a identificação da histogênese do TVT ou ainda para a avaliação de parâmetros e particularidades dessa neoplasia (MURCHISON, 2009). Na Tabela 1 listam-se os principais genes e proteínas estudados no TVT, os métodos laboratoriais utilizados e a síntese dos resultados dessas pesquisas.

Apesar da importância de diferentes genes e proteínas no contexto do TVT, serão abordados nesta pesquisa apenas os conjuntos gene/proteína p53, p21, p27 e C-MYC, e o elemento LINE-1, incluindo seus respectivos aspectos morfológicos, estruturais, de função e atuação no ciclo celular em neoplasias, com ênfase ao TVT, bem como breve revisão sobre o ciclo celular.

TABELA 1 - Relação dos principais genes e proteínas estudados no TVT canino, método de avaliação empregado para a identificação molecular, síntese dos resultados e referências

Gene/Proteína	Método de avaliação	Síntese dos resultados	Referências
MHC classe I	RT-PCR, sequenciamento e IHC	Expresso em 0-4% das células do TVT progressivo, expresso em 32-34% das células do TVT em fase de regressão	EPSTEIN & BENNETT (1974); YANG et al. (1987) HSIAO et al. (2002); MURGIA et al. (2006)
MHC classe II	RT-PCR, sequenciamento e IHC	Expresso em 0-3% das células do TVT progressivo, expresso em ~ 37% das células do TVT em fase de regressão; alelos relacionados aqueles encontrados em lobos e Huskies	EPSTEIN & BENNETT (1974); YANG et al. (1987); MIZUNO et al. (1994);PEREZ et al. (1998); HSIAO et al. (2002); MURGIA et al. (2006)
MYC	PCR, Southern Blot, NorthenBlot, sequenciamento	Rearranjo genômico envolvendo o elemento LINE no primeiro éxon; expresso em TVT; rearranjo do elemento LINE pode promover transcrição	KATZIR et al. (1985); KATZIR et al. (1987); AMARIGLIO et al. (1991); CHOI & KIM (2002)
P53	Sequenciamento	Mutação no gene T963C presente em casos de TVT na Coréia; mutação no gene T963C não está presente em casos de TVT no México	CHOI & KIM (2002); VAZQUÉZ-MOTA et al. (2008)
RPPH1	Sequenciamento	Gene polimórfico nuclear; sequência do TVT idêntica para cães e lobos	REBBECK et al. (2009)
G6PD	IHC	Atividade presente	HERNANDEZ-JAUREGUI et al. (1973)
VIM	IHC	Positivo em 100% das amostras de TVT	SANDUSKY et al. (1987); GIMENO et al. (1995); MOZOS et al. (1996); MARCHAL et al. (1997); MUKARATIRWA et al. (2004)
TNC	IHC	Ausente na fase de progressão e presente em 50% das células de TVT na fase de regressão	MUKARATIRWA et al. (2004)
TERT	TRAP	Positivo para atividade da telomerase em 80% das amostras de TVT (fase de progressão e regressão)	CHU et al. (2001a)
PCNA	IHC	Positivo em 45% das células de TVT na fase de progressão e em 36% na fase de regressão	CHU et al. (2001a)
MK167	IHC	Expresso em alta proporção na fase progressiva; expresso em pequena proporção após regressão induzida por quimioterapia	GONZALEZ et al. (2000)
HSPD1	Western Blot, IHC	Maior na fase de regressão; maior no TVT do que no tecido normal	CHU et al. (2001b)
HSPD70	Western Blot, IHC	Maior no TVT do que no tecido normal	CHU et al. (2001b)
HSP90	Western Blot, IHC	Positivo no TVT	CHU et al. (2001b)
TGFβ1	RT-PCR, Western Blot, IHC, ELISA, bloqueio da atividade por anticorpo	Expresso na maioria das células do TVT nas fases progressiva e de regressão tumoral	HSIAO et al. (2004); HSIAO et al. (2008)
STAT1	Western Blot	Fosfo-Tyr-701 induzido por IL6/IFN-γ e presente em níveis mais elevados na fase de progressão tumoral	HSIAO et al. (2008)
STAT3	Western Blot	Fosfo-Tyr-705 induzido por IL6 e IL6/IFN-γ e presente em níveis mais elevados na fase de progressão tumoral	HSIAO et al. (2008)
CREB1	Análise de DNA/proteína transdutora de sinal	Induzido no TVT por IL6, IFN-γ e IL6/IFN-γ	HSIAO et al. (2008)
IRF1	Análise de DNA/proteína transdutora de sinal	Induzido no TVT por IL6, IFN-γ e IL6/IFN-γ	HSIAO et al. (2008)
$NF_K\beta_1$	Análise de DNA/proteína transdutora de sinal	Induzido no TVT por IFN-γ e IL6/IFN-γ	HSIAO et al. (2008)

Fonte: Adaptado de MURCHISON, 2009

2.4.3.1 Ciclo celular

Nos tecidos normais há equilíbrio entre proliferação celular, diferenciação e apoptose, que ocorre quando os mecanismos de controle do crescimento celular estão em harmonia (LIMA et al., 2012b). O ciclo celular é um fenômeno biológico complexo, altamente organizado, sequencial e iniciado a partir de estímulos mitogênicos em determinado grupo celular. Esse processo visa garantir a correta e completa transmissão do genoma às células descendentes, sendo composto por uma sequência ordenada de fases, a saber, G0 (quiescência), G1, S, G2 (intérfase) e M (mitose) (FARIA & RABENSHORST, 2006; LIMA et al., 2012b).

A fase G0 (*Gap* 0) é predominante quando as células estão em quiescência, em que não ocorre estímulo à divisão celular. Na fase G1 (*Gap* 1), a célula estimulada à multiplicação por fatores de crescimento, ativa os genes quinases dependentes de ciclina (CDKs), que estimulam a progressão do ciclo celular para que ocorra divisão e sejam originadas duas células filhas. Os CDKs promovem a ativação da proteína de regulação gênica (E2F) que, por sua vez, ativa a transcrição de genes responsáveis pela tradução de proteínas que conduzem a célula à fase S. Nesta etapa, denominada síntese, há produção da nova molécula de DNA, sendo o novo cromossomo sintetizado com duas cromátides irmãs, geneticamente idênticas à molécula original. Sequencialmente, o ciclo evolui para a fase G2 (*Gap* 2), em que ocorre síntese de RNA e proteínas necessárias para a organização da cromatina e para o início da divisão celular, ou fase M. Na mitose ocorre um elaborado processo de segregação cromossômica, com formação de duas células filhas portadoras do conjunto completo de informação genética da molécula original (Figura 9) (LODISH et al., 2002; WARD, 2002; ALMEIDA et al., 2005).

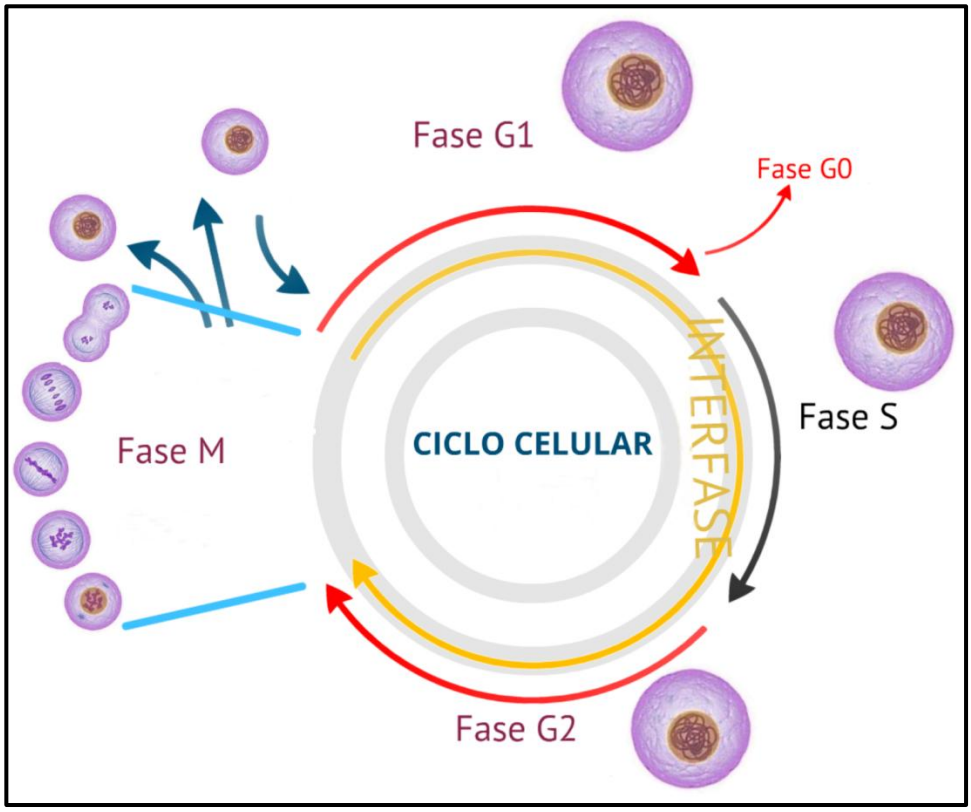


FIGURA 9 – Fases do ciclo celular. Quando uma célula é estimulada a se multiplicar, ocorre ativação do ciclo celular. Inicialmente a célula passa por três fases preliminares, G1, S e G2, essenciais para garantir que a correta e completa duplicação do material genético. Em seguida o ciclo evolui para fase M, com a divisão celular da célula-mãe em duas células filhas. A fase G0 reflete um estado de quiescência, ficando a célula em repouso enquanto não existir atividade relacionada à mitose

Fonte: www.lookfordiagnosis.com. Acesso em: 30 jun. 2013.

2.4.3.2 Gene P53 e proteína p53

A história da proteína p53 remonta ao ano de 1979, quando era vista apenas como supressora tumoral. Foi primeiramente descrita em células transformadas pelo vírus SV40 (*Simian virus vacuolating* 40), associada ao antígeno T (LANE & CRAWFORD, 1979). De acordo com Pierre Hainaut, o gene P53 tem quebrado todas as teorias de definição de um gene tumoral. Segundo o autor, "*não é um oncogene, nem um antioncogene, podendo ser uma mistura dos dois, mas sem dúvida, uma molécula incansável na busca da manutenção da integridade do genoma*" (HAINAUT & HOLLSTEIN, 2000). Localizado no braço

curto do cromossomo 17 (17p13.1), o P53 é composto por onze éxons, responsáveis pela codificação de uma fosfoproteína nuclear de 53kD, que contém 393 aminoácidos, a proteína p53 (KERBAUY, 2008; LEVINE & OREN, 2009).

Atuando no controle do ciclo celular, o conjunto gene/proteína p53 compõe o grupo dos inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDKI). A função primordial consiste em bloquear a fosforilação de proteínas que controlam a atividade do complexo CDK-ciclina, levando à interrupção do ciclo celular (VIALLARD et al., 2001). Adicionalmente, o P53 atua nos pontos de checagem das fases G1, G2 e M, para evitar que células normais se transformem em neoplásicas. Além do P53, há outros conjuntos gene/proteína que atuam em concomitância nos pontos de checagem, como p21 e p27 (PADUA & HANSEN, 2009).

A depender da extensão do dano à molécula de DNA, a p53 pode interromper temporariamente a evolução do ciclo, ativando o mecanismo de quiescência. Também pode interromper o ciclo permanentemente, desencadeando a senescência celular e, em último caso, ativar o mecanismo de morte celular programada ou apoptose (VOUSDEN & LU, 2002; PIETSCH et al., 2006).

Diante da importância da p53 como guardiã do genoma, estudos foram desenvolvidos para compreender as mutações no respectivo gene que, muitas vezes, sustentam a base da formação neoplásica e/ou das complicações em tipos neoplásicos diversos (ECKE et al., 2005; FENG et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

De acordo com STRICKER & KUMAR (2008), o gene supressor de tumor P53 é um dos comumente envolvidos em diferentes processos neoplásicos em seres humanos e mais de 70% dos tumores apresentam determinada mutação nesse gene. Em medicina veterinária, embora esse valor não tenha sido estimado, é possível que a frequência de mutações no P53 ocorra de forma semelhante, considerando os resultados de estudos envolvendo o conjunto gene/proteína p53 (ROELS et al., 2001; SANTOS et al., 2008; MORO et al., 2010).

Em células normais, a proteína p53, denominada tipo selvagem, possui meia vida curta e não se acumula no tecido em níveis detectáveis (MORO et al., 2010). Mutações ou deleções no P53 podem levar à produção alterada da proteína, que deixa de desempenhar sua função e acumula-se no núcleo, podendo ser observada à imunoistoquímica (SCHMITT, 1999; FERNANDEZ & THOMSON, 2005). Dessa forma, a p53 detectada no núcleo celular refere-se a uma proteína

mutante (p53 mutante) e não à superexpressão da p53 tipo selvagem (GINN et al., 2000; MORO et al., 2010).

CHOI & KIM (2002) avaliaram a ocorrência de mutação no P53 de células de TVT de cães asiáticos e verificaram pleomorfismo na posição 963 do gene. Contudo, essa alteração não foi constatada nas amostras de TVT de cães mexicanos analisadas por VÁSQUEZ-MOTA et al. (2008). De forma semelhante, SÁNCHEZ-SERVÍN et al. (2009) avaliaram mutação em nove dos onze éxons do P53 de cães mexicanos e encontraram quatro polimorfismos diferentes. Com isso, concluíram que vários subgrupos de TVT possam ter se formado pela aquisição de novas alterações gênicas, a partir do clone original do TVT.

O imunofenótipo das células neoplásicas foi avaliado em cães portadores de TVT experimentalmente transplantado, por meio da técnica de imunoistoquímica, com o anticorpo monoclonal anti-p53 (CM1). Foram consideradas positivas as amostras com mais de 5% de células marcadas. Observou-se marcação expressiva da p53 nas amostras tumorais, indicando atividade prejudicada da proteína na presença da neoplasia (SANTOS et al., 2008). MORO et al. (2010) também avaliaram a reatividade da p53 no TVT e concluíram que a marcação positiva em todas as amostras do estudo demonstra anormalidade funcional no P53 e, consequentemente, na respectiva proteína.

2.4.3.3 Genes P21 e P27 e proteínas p21 e p27

Os genes P21 e P27, juntamente com o P57, pertencem à família dos inibidores de quinases CIP/KIP. O P21 codifica uma pequena proteína de 21kD, composta por 165 aminoácidos, denominada p21(GOMPEL et al., 2001). O P27, por sua vez, codifica uma proteína de 27kD, denominada p27 (GIL-PEROTIN et al., 2011). Esses genes são classificados como CDKIs universais ou inespecíficos, visto que podem evitar a ativação das quinases dependentes de ciclinas, sem exercer ação seletiva. Dessa forma, evitam a atividade dos complexos CDK, funcionando como reguladores da progressão do ciclo celular em G1, promovendo a interrupção da síntese de DNA e levando à suspensão da progressão do ciclo celular. As

proteínas p21 e p27 podem desempenhar papel regulatório na fase S e no mecanismo de reparo de DNA (FARIA & RABENSHORST, 2006).

Os genes P21 e P27 apresentam sítios de ligação para p53, indicando que a transcrição desses é diretamente regulada pelo P53. Em resposta a um dano de DNA, P53 induz a expressão de P21 e P27, que promovem interrupção na progressão do ciclo celular por impedimento da atividade das CDKs e da transição da fase G1 para S (OSTRAKHOVITCH & CHERIAN, 2004).

Paralelamente, a avaliação da expressão tecidual de p21 e p27 também é considerada forma de avaliação da p53. A p21 media funções de regulação da p53 e bloqueia a progressão do ciclo celular, portanto, sua expressão reflete o estado funcional da p53 e não apenas o acúmulo da proteína (EL-DEIRY et al., 1993; XIONG et al.,1993). Em células tumorais que não expressaram ou expressaram a forma alterada da p53, a p21 está reduzida ou ausente (EL-DEIRY et al., 1993). Já níveis crescentes de p27 resultaram em bloqueio da célula à fase S e, portanto, ao ciclo celular (YANG et al., 1998; FERNANDEZ & THOMSON, 2005). A despeito da importância dessas proteínas na regulação da p53, não foram encontrados na literatura consultada estudos avaliando a correlação entre p21, p27 e p53 no TVT.

A transcrição do P27 também sofre influência do gene *C-MYC*, indicando que a expressão de p27 seja regulada por esse gene, que também poderia inibir a transcrição do supressor tumoral p21 (LUTZ et al., 2002; ACOSTA et al., 2008).

Apesar da demonstração da influência dos genes P53 e *C-MYC* na expressão e atuação de p21 e p27, particularmente em relação à falta de controle da progressão do ciclo celular e consequente proliferação celular desordenada (OSTRAKHOVITCH & CHERIAN, 2004), não foram encontradas na literatura consultada, referências que abordem essa relação no TVT canino.

2.4.3.4 Gene *C-MYC* e proteínas C-MYC (MYC-1, MYC-2 e MYC-3)

O papel do gene *C-MYC* no câncer foi inicialmente apontados por Peyton Rous, em 1911, que verificou que um sarcoma típico de aves poderia ser transmitido por meio de extratos não celulares, sugerindo que algum vírus seria o possível agente etiológico da enfermidade. Estudos subsequentes identificaram o oncogene

V-MYC em amostras de retrovírus causadores de mielocitomatose em aves (PELENGARIS et al., 2002).

Há aproximadamente 20 anos, o *C-MYC* foi caracterizado como homólogo celular desse oncogene retroviral, sendo sua superexpressão demonstrada em muitas neoplasias humanas e animais (DANG et al.,1999). O *C-MYC*, juntamente com os genes *N-MYC, L-MYC, B-MYC* e *S-MYC*, pertence à família dos oncogenes *MYC*. Considerado um proto-oncogene com papel central em múltiplos canais regulatórios, revela potencial impacto de uma única desordem molecular para a promoção neoplásica (FARIA & RABENSHORST, 2006). Está localizado na região cromossômica 8q24.1, com três exons. Codifica duas fosfoproteínas nucleares altamente conservadas, denominadas MYC-1 ou p67 e MYC-2 ou p64, ou simplesmente proteínas C-MYC. O *C-MYC* pode codificar ainda uma terceira isoforma de C-MYC, a MYC-S ou MYC-3 (DANG, 1999; PELENGARIS et al., 2002; FARIA & RABENSHORST, 2006).

No ciclo celular, o *C-MYC* atua como fator de transcrição, e seu maior impacto é atribuído à promoção da transição entre as fases G1 e S, à ativação do complexo ciclina/CDK, à transcrição da proteína de regulação gênica (E2F) e ao crescimento celular. Sugeriu-se que o *C-MYC* também atue inibindo a transcrição de genes supressores tumorais inibidores de quinase, como o P21 e P27 (FARIA & RABENSHORST, 2006) (Figura 10).

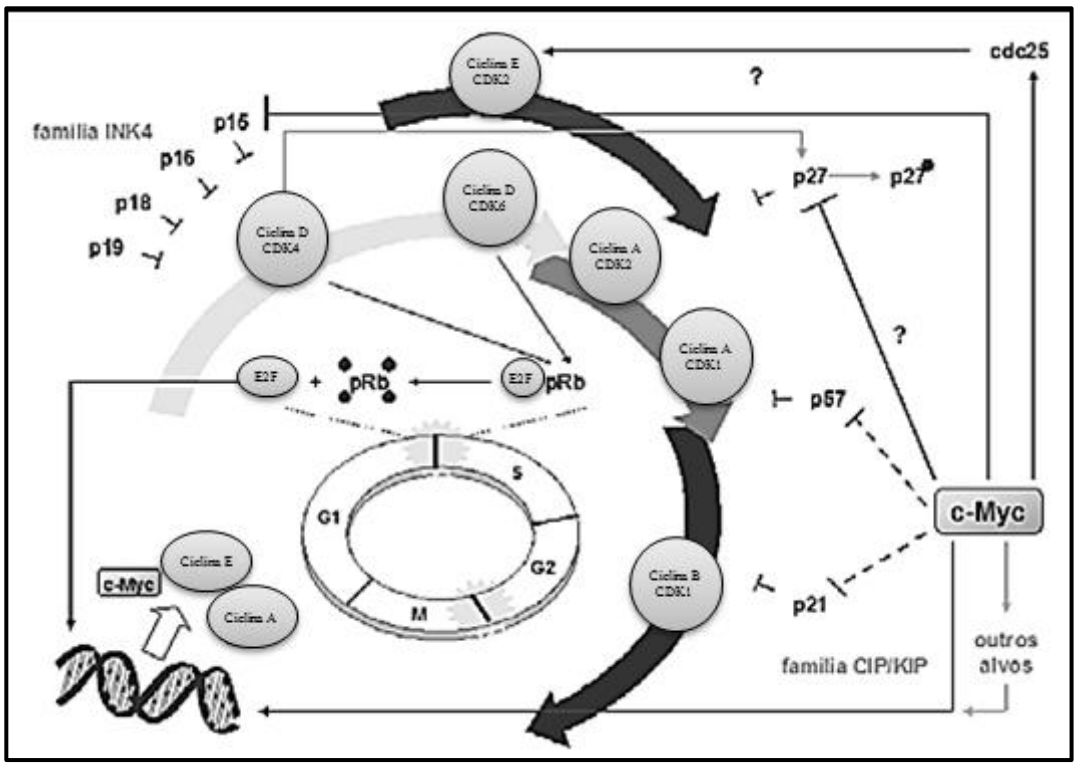


FIGURA 10 - Representação parcial e simplificada da atuação do *C-MYC* nas vias moleculares reguladoras do ciclo celular em organismos superiores

Fonte: Adaptado de FARIA & RABENSHORST, 2006

Adicionalmente, descreveu-se que a morte celular programada tenha uma de suas vias pró-apoptóticas mediadas pelo *C-MYC*, quando em associação com o gene supressor tumoral P53 (PELENGARIS et al., 2002). A apoptose consiste em evento homeostático e participa de vários processos biológicos, como a embriogênese, desenvolvimento e mecanismos de ação do sistema imunológico e controle do ciclo celular, principalmente nos mecanismos de maturação e diferenciação celular. A morte celular é controlada por vários genes relacionados à carcinogênese, incluindo P53, *C-MYC* e BCL-2 (LUTZ et al., 2002).

A interrupção do ciclo também ocorre via fator de crescimento transformador beta (TGF-β), a partir da atividade dos genes *C-MYC* e P53 (Figura 11) (DALECK et al., 2009). Portanto, alterações moleculares nesses genes e, consequentemente, em suas proteínas codificadas (C-MYC e p53), resultam em mecanismos de potencial relevância no processo carcinogênico (LUTZ et al., 2002; NAPOLI et al., 2002).

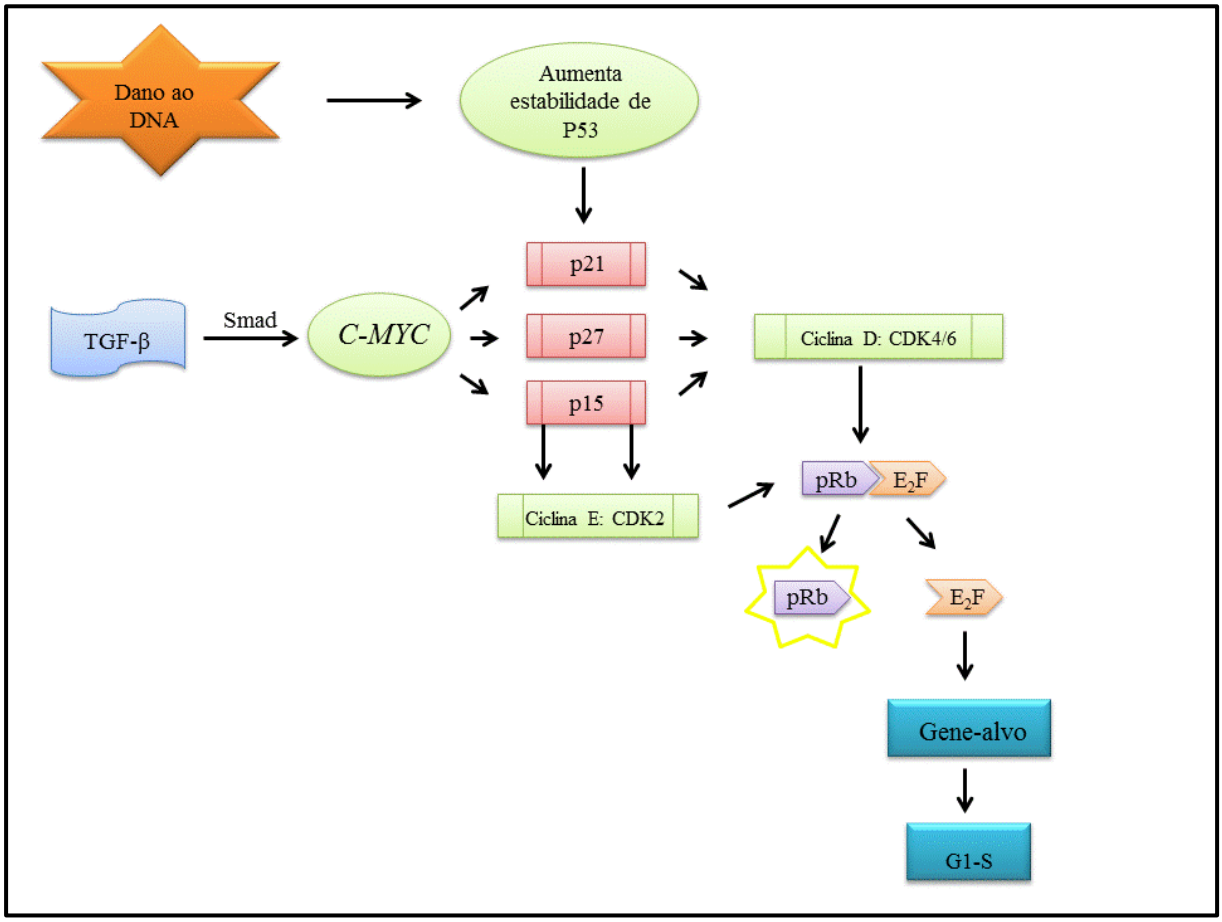


FIGURA 11 - Mecanismo de inibição do ciclo celular via fator de crescimento transformador beta (TGF-β), que estimula a transcrição de *C-MYC* e P53 para interromper o ciclo celular via ativação das CDKIS p21, p27 e p15

Fonte: Adaptado de DALECK et al. (2009)

2.4.3.5 Elemento LINE-1

Os elementos de transposição, também denominados transposons, referem-se a fragmentos de DNA que podem se mover no genoma de um ponto a outro no mesmo cromossomo, além de transitar entre cromossomos ou ainda se transpor do genoma de uma espécie para outra. Estima-se que 80% das mutações espontâneas são oriundas da ação dos transposons, sendo, portanto, importantes fontes de variabilidade genética (REGNER & LORETO, 2003).

Os transposons são divididos em três classes. Na classe I encontram-se os transposons conhecidos como retroposons, que se movem via RNA. Na classe II encontram-se os transposons que se deslocam via DNA. Já, os elementos da classe

III não possuem mecanismo de transposição conhecido (REGNER & LORETO, 2003).

O LINE-1 é um retroelemento da classe I, que possui a capacidade de amplificar para diferentes genes. Em muitas situações, essa migração pode desestabilizar a molécula de DNA e contribuir para a ocorrência de alterações gênicas (ZAMUDIO & BOURC'HIS, 2010; FONSECA et al., 2012).

A inserção do elemento transponível LINE-1 no gene *C-MYC* consiste em um rearranjo molecular identificado na totalidade das amostras de TVT, em diferentes localizações geográficas do mundo. Portanto, a identificação desse rearranjo tem sido utilizada como ferramenta diagnóstica complementar do TVT, sendo a PCR a principal análise molecular empregada para esse fim (KATZIR et al., 1985; LIAO et al., 2003; O'NEILL, 2011; FONSECA et al., 2012).

LIAO et al. (2003) verificaram o elemento LINE-1 inserido no gene *C-MYC* em amostras de TVT por meio da amplificação de um fragmento de 550pb. Os pesquisadores concluíram que apesar de se tratar de uma análise específica para a identificação desse tipo neoplásico, o comprimento total da inserção do LINE-1 não é constante e a identificação de fragmentos com diferentes pesos moleculares também pode ser obtida. Corroborando tal afirmação, SPIN et al. (2010) avaliaram o rearranjo LINE-1/*C-MYC* por PCR em 20 cães com TVT e quatro amostras de sangue total de cães saudáveis. Os pesquisadores verificaram positividade da alteração pela amplificação de uma banda de 340pb em 100% das amostras de TVT ao passo que nas amostras de sangue o rearranjo não foi detectado. Concluíram que a identificação do LINE-1/*C-MYC* é específica e segura para a caracterização do TVT altamente indiferenciado.

2.5 Terapia

A identificação e o conhecimento das características do TVT são importantes na escolha do protocolo terapêutico adequado e eficaz, principalmente nos casos de ocorrência natural. Apesar das diferenças estabelecidas quanto ao potencial maligno, o TVT é singular por sua responsividade a diferentes protocolos terapêuticos (AMARAL, 2005), que incluem excisão cirúrgica, radioterapia,

quimioterapia, terapia fotodinâmica, eletroterapia e imunoterapia (DALECK et al., 2009).

Atualmente, a excisão cirúrgica tem sido utilizada em associação a outros protocolos de tratamento em razão, principalmente, dos muitos relatos de recidivas da neoplasia. AMARAL et al. (2012) promoveram a exenteração do olho direito de um cão portador de TVT, em virtude do grau de acometimento orbital, associando a terapia quimioterápica com sulfato de vincristina. A crioterapia para o tratamento de um cão com TVT genital também foi reportada (RICKARDS, 1983), embora apresente limitações em decorrência da localização anatômica do implante tumoral.

A radioterapia é um método bastante efetivo em casos de tumores solitários, superficiais e também nos resistentes à quimioterapia. No entanto, os custos e a necessidade da aquisição de equipamentos específicos acabam por inviabilizar a adoção da técnica na rotina da clínica veterinária (MEUTEN, 2002).

A quimioterapia citotóxica tem sido amplamente empregada no tratamento do TVT e normalmente os cães respondem satisfatoriamente ao método, sendo raros os casos de TVT refratários ao tratamento quimioterápico (ERÜNAL-MARAL et al., 2000). Dentre os agentes quimioterápicos destacam-se sulfato de vincristina, vimblastina, doxorrubicina e ciclofosfamida (AMARAL et al., 2007).

BRANDÃO et al. (2002) mencionaram que de 70 animais com TVT submetidos a quimioterapia à base de sulfato de vincristina, 77,15% apresentaram resposta satisfatória, com remissão completa do tumor, 20% dos casos evoluíram com remissão parcial, e em 2,86% não houve resposta ao tratamento. DALECK et al. (2009) descreveram que a doxorrubicina pode ser uma alternativa ao tratamento do TVT resistente ao sulfato de vincristina. Os autores acrescentaram, porém, que em determinadas situações, reações adversas podem ocorrer devido a administração de drogas antineoplásicas. Já, SUDJAIDEE et al. (2012) descreveram a associação entre o sulfato de vincristina e L-asparaginase como protocolo terapêutico a cães portadores de TVT quimiorresistente, observando remissão completa das lesões.

Apesar dos efeitos colaterais tóxicos graves, a quimioterapia figura como método eletivo de terapia em pacientes com TVT. Em virtude dos inúmeros relatos de efeitos colaterais em cães submetidos a esse protocolo, pesquisadores avaliaram a ação antitumoral da própolis sobre a agressividade do TVT e verificaram efetiva

atividade antitumoral desta sobre as células neoplásicas, com efeito citotóxico após 48 horas de administração (BASSANI-SILVA et al., 2007).

A terapia fotodinâmica fundamenta-se em uma reação fotoquímica, em que há a irradiação de raios *laser* sobre a região neoplásica, após administração prévia de substância fotossensível. Esta substância, derivada da hematoporfirina ou do ácido aminolevulínico, atua, seletivamente, por meio da oxidação celular em células cancerosas ou pré-cancerosas, preservando as células normais (MACHADO, 2000; DALECK et al., 2009). As células neoplásicas do TVT, experimentalmente transplantadas em modelos experimentais, foram submetidas à terapia fotodinâmica, sendo observada regressão completa das massas tumorais associada a ocorrência de necrose tecidual. Dessa forma, sugeriu-se a adoção desta modalidade terapêutica como método alternativo à quimioterapia convencional, ressaltando, principalmente, a necessidade de um menor número de sessões e menor ocorrência de efeitos colaterais (VILENSKY et al., 2005).

REFERÊNCIAS

1 ACOSTA, J.C.; FERRÁNDIZ, N.; BRETONES, G.; TORRANO, V.; BLANCO, R.; RICHARD, C.; O'CONNELL, B.; SEDIVY, J.; DOLORES DELGADO, M.; LEÓN, J. MYC inhibits p27 induced erythroid differentiation of leucemia cells by reprissing erythroid máster genes without reversing p27-mediated cell cycle arrest. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.28, n.24, p.7286-7295, 2008.

2 ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.1, p.118-129, 2005.

3 AMARAL, A.S. **Tumor venéreo transmissível canino:** critérios de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada à imunocitoquímica e lesões de DNA. 2005. 225f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

4 AMARAL, A.V.C.; OLIVEIRA, R.F.; SILVA, A.P.S. M.; BAYLÃO, M.L.; LUZ, L.C.; SANT'ANA, F.J.F. Tumor Venéreo Transmissível Intra-Ocular em Cão: Relato de Caso. **Veterinária e Zootecnia**, Garça, v.19, n.1, p.79-85, mar. 2012.

5 AMARAL, S.A.; BASSANI-SILVA, S.; FERREIRA, I.; FONSECA, S.L.; ANDRADE, E.H.F.; GASPAR, J.F.L.; ROCHA, S.N. Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.102, p.253-260, 2007.

6 AMARAL, S.A.; GASPAR, L.F.J.; BASSANI-SILVA, S.; ROCHA, N.S. Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.99, n.551, p.167-171, 2004.

7 AMARIGLIO, E.N.; HAKIM, I.; BROK-SIMONI, F.; GROSSMAN, Z.; KATZIR, N.; HARMELIN, A.; RAMOT, B.; RECHAVI, G. Identity of rearranged LINE/*C-MYC* junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington, v.88, p.8136-8139, set. 1991.

8 AMBER, E.I.; ISITOR, G.N.; ADEYANLU, J.B. Viral-like particles associated with naturallu occuring transmissible veneral tumor in two dogs: preliminar report. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.46, p.2613-2615, 1985.

9 BASSANI-SILVA, S.; SFORCIN, J.S.; AMARAL, A.S.; GASPAR, L.F.; ROCHA, N.S. Propolis effect in vitro on canine transmissible venereal tumor cells. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.102, p. 261-265, 2007.

10 BASSANI-SILVA, S.; AMARAL, A.S.; GASPAR, L.F.J.; ROCHA, N.S.; PORTELA, R.F.; JEISON, S.S.; TEIXEIRA, C.R.; SFORCIN, J.M. Tumor venéreo transmissível – revisão. **Revista Pet & Food & Health & Care**, São Paulo, v.2, p.77-82, 2003.

11 BATAMUZI, E.K.; BITTEGEKO, S.B.P. Anal and perianal transmissible veneral tumous in a bitch. **The Veterinary Record**, London, v.129, p.556, 1991.

12 BATISTA, J.S.; SOARES, H.S.; PEREIRA, R.H.M.A.; PETRI, A.A.; SOUSA, F.D.N.; NUNES, F.C.R. Canine transmissible veneral tumor with intra-ocular localization and spleen metastasis. **Acta Veterinária Basílica**, Mossoró, v.1, p.45-48, 2007.

13 BELOV, K. The role of the major histocompatibility complex in the spread of contagious cancers. **Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society,** Nova Iorque, v.22, p.83-90, 2011.

14 BERGMAN, P.J. Cancer Immunotherapy. **Veterinary Medicine: Small Animal Clinician**, Bonner Springs, v.40, p.507-518, 2010.

15 BLOOM, F.; PAFF, G.H.; NOBACK, C.R. The transmissible venereal tumor of the dog: studies indicating that the tumor cells are mature end cells of reticuloendothelial origin. **American Journal of Pathology**, New York, v.27, n.1, p.119-130, 1951.

16 BOSCOS, C.M.; TONTIS, D.K.; SAMARTZI, F.C. Cutaneous involvement of TVT in dogs: a report of two cases. **Canine Practice**, Califórnia, v.24, p.6-11, 1999.

17 BRANDÃO, C.V.; BORGES, A.G.; RANZONI, J.J.T.; RAHAL, S.C.; TEIXEIRA, C.R.; ROCHA, N.S. Tumor venéreo transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). **Revista Educação Continuada - CRMV-SP**, São Paulo, v.5, n.1, p.25-31, 2002.

18 BROOKS, M.B.; GU, W.; BARNAS, J.L.; RAY, J.; RAY, K.A LINE-1 insertion in the factor IX gene segregates with mild hemophilia B in dogs. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society,** New York, v.14, p.788-795, 2003.

19 CASTELO-BRANCO, P.S.M.; SOUZA, S.A.L.; LOPES, F.P.P.L.; CASTRO, V.; SENA, P.; PEREIRA, J. B.; FONSECA, L. M. B.; GUTFILEN, B. Uso da ^{99m}Tc-Timina na identificação de metástases de tumor venéreo transmissível canino com apresentação cutânea. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 8, p. 367-379, 2008.

20 CHOI, Y.K.; KIM, C.J. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and P53 gene in canine transmissible venereal tumor. **Journal of Veterinary Science,** Suwon, v.3, p.285-292, 2002.

21 CHOU, P.C.; CHUANG, T.F.; JAN, T.R.; GION, H.C.; HUANG, Y.C.; LEI, H.J.; CHEN, W.Y.; CHU, R.M. Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, New York, v.130, p.25–34, 2009.

22 CHU, R.M.; LIN, C.Y.; LIU, C.C.; YANG, H.Y.; HSIAO, Y.W.; HUNG, S.W.; PAO, H.N.; LIAO, K.W. Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. **Anticancer Research**, New York, v.21, n.6A, p.4017–4024, 2001a.

23 CHU, R.M.; SUN, T.J.; YANG, H.Y.; WANG, D.G.; LIAO, K.W.; CHUANG, T.F.; LIN, C.H.; LEE, W.C. Heat shock proteins in canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, New York, v.82, p.9-21, 2001b.

24 COHEN, D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. **Advances in Cancer Research**, New York, v. 43, p. 75-112, 1985.

25 DALECK, C.R.; NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos.** São Paulo: Roca, 2009. p.539-556.

26 DANG, C.V. *C-MYC* target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism. **Journal of Molecular Cell Biology**, Cary, v.19, p.1-11, 1999.

27 DAS, U.; DAS, A.K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Veterinary Research Communications,** Amsterdam, v.24, p.545-556, 2000.

28 DASS, L.L., SAHAY, P.N.; KAHN, A.A.; JHA, G.J. Malignant transmissible veneral tumor. **Canine Practice**, Santa Barbara, v.3, n.3, p.15-18, 1986.

29 DE NARDI, A.B; RODASKI, S; SOUSA, R.S; COSTA, T.A; MACEDO, T.R; RODIGHERI, S.M; RIOS, A; PIEKARZ, C.H. Prevalencia de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da universidade do Paraná. **Archives of Veterinary Science,** Curitiba, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

30 DINGLI, D.; NOWAK, M.A. Cancer biology: infectious tumour cells. **Nature Publishing Group**, Boston, v.443, n.7107, p.35-36, 2006.

31 DUNCAN, J.R., PRASSE, K.W. Cytology of canine cutaneous round cell tumors: mast cell tumor, histiocytoma, lymphosarcoma and transmissible venereal tumor. **Veterinary Pathology**, Washington, v.16, n.6, p.673-679, 1979.

32 DUNN, G.P.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. The three Es of cancer immunoediting. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.22, p.329-360, 2004.

33 ECKE, T.H.; LENK, S.V.; SCHLECHTE, H.H.; LOENING, S.A. Mutations of tumour suppressor gene P53 in tumour tissue and cellular urine sediments in urinary bladder cancer. **Gene Therapy and Molecular Biology**, Germany, v.9, p.393-400, nov. 2005.

34 EL-DEIRY, W.S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V.E.; LEVY, D.B.; PARSONS, R.; TRENT, J.M.; LIN, D.; MERCER, W.E.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. *WAF1*, a potential mediator of P53 tumor suppression. **Cell**, Cambridge, v.75, n.4, p.817-825, 1993.

35 EPSTEIN, R.B.; BENNETT, B.T. Histocompatibility typing and course of canine venereal tumors transplanted into unmodified random dogs. **Cancer Research,** Baltimore, v.34, p.788-793, 1974.

36 ERÜNAL-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 Tierarztliesh Wochenschrift**, Hannover, v.107, n.5, p.175-180, 2000.

37 FARIA, M.H.G.; RABENHORST, S.H.B. Impacto do oncogene *C-MYC* no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v.52, n.2, p.165-171, 2006.

38 FASSATI, A.; MITCHISON, N.A. Testing the teory of immune selection in cancers that break the rules of transplantation. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, Heidelberg, v.59, p. 643-651, 2010.

39 FENG, W.; ORLANDI, R.; ZHAO, N.; CARCANGIU, M.L.; TAGLIABUE, E.; XU, J.; BAST JUNIOR, R.C.; YU, Y. Tumor suppressor genes are frequently methylated in lymph node metástases of breast cancers. **BMC Cancer**, London, v.10, n.378, p.1-10, jul. 2010.

40 FERNANDEZ, P.L; THOMSON, T.M. Alterations of Genes and Their Expression in Prostate Carcinoma. In: HAYAT, M.A. **Handbook of Immunohistochemistry and *in situ* Hybridization of Human Carcinomas. Molecular Pathology, Colorectal Carcinoma and Prostate Carcinoma.** 1.ed. New York: Elsevier Academic Press, 2005. v.2. p.307-320.

41 FERREIRA, A.J.A.; JAGGY, A.; VAREJÃO, A.P.; FERREIRA, M.L.P.; CORREIA, J.M.J.; MULAS, J.M.; ALMEIDA, O.; OLIVEIRA, P.; PRADA, J. Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, Gloucester, v.41, p.165-168, 2000.

42 FLORÉZ, M.M.; PEDRAZA, F.; GRANDI, F.; ROCHA, N. S. Cytological subtypes of canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Clinical Pathology**, Madison, v.41, n.1, p.3-5, 2012.

43 FONSECA, L.S.; MOTA, L.S.L.S.; CORDEL, M.M.; FERREIRA, I.; BRANDÃO, C.V.S.; ROCHA, N.S. Spontaneous canine transmissible veneral tumor: association between diferente phenotypes and the insertion LINE-1/*C-MYC*. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Bogotá, v.25, n.3, p.402-408, jul/set. 2012.

44 GASPAR L.F.J. **Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com danos citogenéticos, taxa de proliferação e resposta clínica à quimioterapia**, 2005. 157f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

45 GASPAR, L.F.J.; FERREIRA, I.; COLODEL, M.M.; BRANDÃO, C.V.S.; ROCHA, N.S. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: cell morphology and influence on P-glycoprotein expression. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,** Ankara, v.34, n.5, p.447-454, 2010.

46 GIL-PEROTIN, S.; HAINES, J.D.; KAUR, J.; MARIN-HUSSEGE, M.; SPINETTA, M.J.; KIM, K.H.; DURAN-MORENO, M.; SCHALLERT, T.; ZINDY, F.; ROUSSEL, M.F.; GARCIA-VERDUGO, J.N.; CASACCIA, P. Roles of P53 and P27 ^{Kip1} in the regulation of neurogenesis in the murine adult subventricular zone. **The European Journal of Neuroscience**, Oxford, v.34, n.7, p.1040-1052, 2011.

47 GIMENO, E.J.; MASSONE, A.R.; MARINO, F.P.; IDIART, J.R. Intermediate filament expression and lectin histochemical features of canine transmissible venereal tumour. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Kobenhavn, v.103, p.645-650, 1995.

48 GINN, P.E.; FOX, L.E.; BROWER, J.C.; Gaskin, A.; Kurzman, I.D.; Kubilis, P.S. Immunohistochemical detection of p53 tumorsupressor protein is a poor indicator of prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, Washington, v.37, p.33-39, 2000.

49 GOMPEL, A.; LEVY, D.; CHAOUAT, M.; FORGEZ, P.; ROSTENE, W. Apoptosis and aging: breast cells and apoptosis. **Maturitas**, Bruxelas, v.38, n.1, p.39-44, 2001.

50 GONZALEZ, C.M.; GRIFFEY, S.M.; NAYDAN, D.K.; FLORES, E.; CEPEDA, R.; CATTANEO, R.; MADEWELL, B.R. Canine transmisible veneral tumour: a morphological and immunoistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. **Journal of Comparative Pathology**, Endiburg, v.122, p.241-248, 2000.

51 GREENINGS, S. Clinical cytology and cytotechnology. In: KEEBLER, C.M., SOMRAK, T.S. **The manual of cutotechnology**. 7.ed. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1993. p.5-16.

52 HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. P53 and human cancer: the first ten thousand mutations. **Advances in Cancer Research**, New York, v.77, p.87-137, 2000.

53 HARMELIN, A.; PHINTUS, J.H.; 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. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, New York, v.63, p.245-249, 2002.

54 HAYES, H.M.; BIGGAR, R.J.; PICKLE, L.W.; HOOVER, R.; TOFT, J.D. Canine transmissible venereal tumor: a model for Kaposi´s sarcoma? **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.117, n.1, p.108-109, 1983.

55 HERNANDEZ-JAUREGUI, GONZALEZ-ÂNGULO, A.; DE LA VEJA, G. Ultrastructural and histochemical pattern of regressing canine venereal lymphoma after cyclophosphamide treatment. **Journal of the National Cancer Institute,** Washington, v.51, p.1187-1196, 1973.

56 HILL, D.L., YANG, T.J., WACHTEL, A. Canine transmissible veneral sarcoma: tumor cell and infiltrating leukocyte ultrastructure at different growth stages. **Veterinary Pathology**, Washington, v.21, p.39-45, 1984.

57 HSIAO, Y.W.; LIAO, K.; CHUNG, T.; LIU, C.; HSU, C.; CHU, R. Interactions of host IL-6 and IFN-γ and cancer-derivated TGF-β_1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, Heidelberg, v.57, p.1091-1104, 2008.

58 HSIAO, Y.W.; LIAO, K.W.; HUNG, S.W.; CHU, R.M. Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF-β_1 and restores the lymphokine-activated killing activity. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.172, p.1508-1514, 2004.

59 HSIAO, Y. W.; LIAO, K.W.; CHU, R.M. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, New York, v.87, p.19-27, 2002.

60 KATZIR, N.; ARMAN, E.; COHEN, D.; GIVOL, D.; RECHAVI, G. Common origin of transmissible venereal tumors (TVT) in dogs. **Oncogene**, Basingstoke, v.1, p.445-448, 1987.

61 KATZIR, N.; RECHAVI, G.; COHEN, J.B.; UNGER, T.; SIMONI, F.; SEGAL, S.; COHEN, D.;GIVOL, D. “Retroposon” insertion into the cellular oncogene *C-MYC* in canine transmissible venereal tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.82, p.1054-1058, 1985.

62 KEGLER, K.; HABIERSKI, A.; HAHN, K.; AMARILLA, S.P.; SEEHUSEN, F.; BAUMGARTNER, W. Vaginal canine transmissible venereal tumour associated with intra-tumoural *Leishmania* spp. amastigotes in an asymptomatic female dog. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.11, n.241, p.1-6, 2012.

63 KENNEDY, J.R.; YANG, T.J.; ALLEN, P.L. Canine transmissible venereal sarcoma: electron microscopic changes with time after transplantation. **British Journal of Cancer**, Londres, v.36, n.3, p.375-385, 1977.

64 KERBAUY, F.R. Mutações do gene P53 em linfomas de Burkitt: muito além do gene *C-MYC*. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.30, n.1, p.1-4, jan./fev. 2008.

65 KROGER, D.; GREY, R.M.; BOYD, J.W. An unusual presentation of canine transmissible venereal tumor. **Canine Practice**, Santa Barbara, v.16, n.6, p.17-21, 1991.

66 LANE D.P.; CRAWFORD L.V. T-antingen is bound to host protein in SV40-transformed cells. **Nature**, Paris, v.278, p.261-263, 1979.

67 LEVINE, A.J.; OREN, M. The first 30 years of P53: growing ever more complex. **Nature Reviews**, London, v.9, n.10, p.749-758, out. 2009.

68 LIAO, K.W.; LIAO, K.W.; HUNG, S.W.; HSIAO, Y.W.; BENNETT, M.; CHU, R.M. Canini transmissible veneral tumor cell depletion of B limphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cell. **Vererinary Immunology and Immunophalogy**, Amsterdam, v.92, p.149-162, 2003.

69 LIMA, C.R.O.; MOURA, V.M. B.D.; RABELO, R.E.; VULCANI, V.A.S.; HELRIGEL, P.A.; GUIMARÃES, M.M. Resposta imune e o papel dos linfócitos T e B no microambiente tumoral: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v.9, n.18, p.1-27, 2012a.

70 LIMA, C.R.O.; RABELO, R.E.; VULCANI, V.A.S.; CARDOSO, L.B.; SOUSA, N.L.M.; MOURA, V.M.B.D. P53 Gene: Major mutations in neoplasias and anticancer gene therapy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.5, p.845-853, 2012b.

71 LOBO, I. Thousands of chromosomal aberrations have been discovered in different types of cancer. But how do these various changes all hijack normal cellular processes to promote cancer? **Chromosome Abnormalities and Cancer Cytogenetics,** New York, v.1, n.1, p.35-43, 2008.

72 LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Biologia celular e molecular**. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 1084p.

73 LUTZ, W.; LEON, J.; EILERS, M. Contributions of myc to tumorigenesis. **Acta Biochimica et Biophysica**, Shangai, v.1602, p.61-71, 2002.

74 MACEWEN, E.G. Transmissible Venereal Tumor. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p.651-656.

75 MACHADO, A.E.O.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.2, p.237-243, 2000.

76 MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; KAPLANSKI, C.; RIGAL, D.; MAGNOL. J.P. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** New York, v.57, p.1-11, 1997.

77 MARINO, G.; GAGLIO, G.; ZANGHI, A. Clinicopathological study of canine transmissible venereal tumour in leishmaniotic dogs. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.53, p.323-327, 2012.

78 McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da patologia em veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 2009. 1476p.

79 McKINLEY, E.T. Genereal cytologic principles, In: ATKINSON, B.F. **Atlas of dianostic cytopathology**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 2004. p.1-30.

80 MEDLEAU, L.; HNILICA, K.A. **Dermatologia de pequenos animais - Atlas colorido e guia terapêutico**. São Paulo: Roca, 2003. 353p.

81 MEINKOTH, J.H., COWELL, R.L. Recognition of basic cell types and criteria of malignancy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal**, Maryland Heights, v.32, p.1209-1235, 2002.

82 MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals.** 4.ed. Ames: Lowa Lowa State, 2002. p.547-573.

83 MIZUNO, S.; FUJINAGA, T.; HAGIO, M. Role of lymphocytes in spontaneous regression of experimentally transplanted canine transmissible venereal sarcoma. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.56, p.15-20, 1994.

84 MOORE, P.F., AFFOLTER, V.K., VERNAU, W. Immunophenotyping in the dog. In: BONAGURA, J.D. **Kirk's current veterinary therapy XIII**. Philadelphia: Saunders, 2000. p.505-509.

85 MORO, J.V.; TINUCCI-COSTA, M.; SILVEIRA, A.C.T.; GERARDI, D.G.; ALESSI, A.C. Reactivity of p53 protein canine transmissible venereal tumor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, n.2, p.318-323, abr. 2010.

86 MOZOS, E.; MENDEZ, A.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; MARTINS DE LAS MULAS, J.; PEREZ, J. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Pathology**, Washington, v.33, p.257-263, 1996.

87 MUKARATIRWA, S.; CHIWOME, T.; CHITANGA, S.; BHEBHE, E. Canine transmissible venereal tummour: assessment of mast cell numbers as indicators of the growth phase. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v.30, p.613-621, 2006.

88 MUKARATIRWA, S.; CHIMONYO, M.; OBWOLO, M.; GRUYS, E.; NEDERBRAGT, H. Stromal cells and extracelular matrix componentes in spontaneous canine transmissible tumour at diferente stages of growth. **Histology and Histopathology: Celular and Molecular Biology**, Murcia, v.19, p.1117-1123, 2004.

89 MUKARATIRWA, S.; GRUYS, E. Canine transmissible veneral tumour: cytogenetic, origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. **Veterinary Quarterly**, Londres, v.25, n.3, p.101-111, 2003.

90 MURCHISON, E.P. Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. **Oncogene,** Hampshire, v.27, p.19-30, 2009.

91 MURGIA, C; PRITCHARD, K. J; KIM, I. S; FASSATI, A; WEISS, A. R. Clonal Origin and Evolution of a Transmissible Cancer. **Cell**, Chicago, v.10, n.1016, p.477-487, 2006.

92 NAPOLI, C.; LERMAN, L.O.; NIGRIS, F.; SICA, V. *C-MYC* oncoprotein: a dual pathogenic role in neoplasia and cardiovascular diseases? **Neoplasia**, New York, v.4, n.3, p.185-190, 2002.

93 NDIRITU, C.G.; MBOGWA, S.W.; SAYER, P.D. Extragenitally located transmissible venereal tumor in dogs. **Modern Veterinary Practice**, Illinois, v.98, n.11, p.940-946, 1977.

94 NOVINSKY, M.A. Zur Frage Uber Die Impfung der Krebsigen Geschuwulste. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Berlin, v.14, p.790-791. 1876.

95 O'NEILL, I.D. Concise review: transmissible animal tumors as models of the cancer stem-cell process. **Cancer Stem Cells**, Wisconsin, v.29, n.12, p.1909-1914, 2011.

96 ODUYE, O.O.; IKEDE, B.O.; ESURUOSO, G.O.; AKPOKODJE, J.U. Metastatic transmissible venereal tumour in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, Gloucester, v.14, p.625-637, 1973.

97 OSTRAKHOVITCH, E.A.; CHERIAN, M.G. Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epitelial cells by copper and zinc. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v.423, n.2, p.351-361, 2004.

98 OWEN, D.; PEMBERTON, D. **Tasmanian Devil: a unique and threatened animal.** London: Allen & Unwin. 2006. 225p.

99 PADUA, M.B.; HANSEN, P.J. Changes in expression of cell-cycle-related genes in PC-3 prostate cancer cells caused by ovie uterine serpin. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v.107, n.6, p.1182-1188, ago. 2009.

100 PARK, M.S.; KIM, Y.; KANG, M.S.; OH, S.Y.; CHO, D.Y.; SHIN, N.S.; KIM, D.Y. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Califórnia, v.18, n.1, p.130-133, 2006.

101 PASSAGLIA, L.M.; ZAHA, A. Técnicas de biologia molecular. In: **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. 3.ed. p.379-413.

102 PEARSE, A.M.; SWIFT, K. Transmission of devil facial-tumour disease. **Nature**, Paris v.439, n.549, fev. 2006.

103 PELENGARIS, S.; KAHN, M.; EVAN, G. I. *C-MYC*: more than just a matter of life and death. **Nature Reviews Cancer,** London, v.2, p.764-776, 2002.

104 PEREZ, J.; DAY, M.J.; MOZOS, E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at diferente stages of growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** New York, v.64, p.133-147, 1998.

105 PIETSCH, E.C.; HUMBEY, O.; MURPHY, M.E. Polymorphisms in the P53 pathway. **Oncogene,** Basingstoke, v.25, n.3, p.1602-1611, set. 2006.

106 PLACKE, M.E.; HILL, D.L.; YANG, T.J. Cranial metastasis of canine transmissible veneral sarcoma. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Berlin, v.34, p.125-132, 1987.

107 REBBECK, C.A.; THOMAS, R.; BREEN, M.; LEROI, A.M.; BURT, A. Origins and evolution of a transmissible cancer. **Evolution; International Journal of Organic Evolution**, Lancaster, v.63, p.2340-2349, 2009.

108 REGNER, L.P.; LORETO, E.L.S. Transpososns. In: **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. 3.ed. p.202-229.

109 RICKARDS. D.A. Cryotrherapy on a transmissible venereal tumor in a male dog. **Canine Practice**, Santa Barbara, v.10, n.6, p.37-39, 1983.

110 RODRIGUES, G.N.; ALESSI, A.C.; LAUS, J.L. Intraocular transmissible venereal tumor in a dog. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, p.141-143, 2001.

111 ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. p53 expression and apoptosis in melanomas of dogs and cats. **Research in Veterinary Science**, London, v.70, n.1, p.19-25, fev. 2001.

112 ROGERS, K.S. Transmissible venereal tumor. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, United States, v.19, n.9, p.1036-1045, 1997.

113 SALAMANCA, S.; SANTADER-BAQUERO, A.; TRIANA-GARCÍA, P.A.; ROMERO, S.; RONDÓN- BARRAGÁN, I.S. Tumor venéreo transmisible (TVT) con metastasis pulmonar: reporte de caso. **Orinoquia**, Villavicencio, v.12, n.2, p.162-170, 2008.

114 SÁNCHEZ-SERVÍN, A.; MARTINÉZ, S.; CÓRDOVA-ALARCON, E.; FAJARDO, R. P53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor. **Journal of Veterinary Science**, Henderson, v.10, p.353-355, 2009.

115 SANDUSKY, G.E.; CARLTON, W.W.; WIGHTMAN, K.A. Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. **Veterinary Pathology,** Washington, v.24, p.1610-1613, 1987.

116 SANTOS, F.G.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, J.E.S.; CASSALI, G.D.; PAIXÃO, T.A.; MARTINS, A.S.; SILVA, S.S.; MARTINS, R.F.; MORO, L. Apoptosis in the transplanted canine transmissible venereal tumor during growth and regression phases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.3, p.607-612, 2008.

117 SANTOS, F.G.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, J.E.S.; CASSALI, G.D.; PAIXÃO, T.A.; MORO, L. O tumor venéreo transmissível canino - aspectos gerais e abordagens moleculares (Revisão de Literatura). **Journal of Biosciences**, Bangalore, v.21, n.3, set./dez. p.41-53, 2005.

118 SANTOS, F.G.A.; VASCONCELOS, A.C.; MORO, L.; NUNES, J.E.S.; PAIXÃO, T.A. Apoptose no tumor venéreo transmissível canino: características morfológicas e evidenciação bioquímica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, p.557-562, 2001.

119 SCARPELLI, K.C.; VALLADÃO, M.L.; METZE K. Predictive factors for the regression of canine transmissible venereal tumor during vincristine therapy. **The Journal Veterinary**, London, v.183, n.3, p.362-363, 2010.

120 SCHMITT, F.C. Marcadores prognósticos em carcinomas mamários. In: ALVES, V.A.F. et al. **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999, p.30-46.

121 SIDDLE, H.V.; KAUFMAN, J. A tale of two tumours: comparison of the immune escape strategies of contagious cancer. **Molecular Immunology**, Parkville, v.55, p.190-193, 2013.

122 SOUSA, J.; SAITO, V.; NARDI, A. B.; RODASKI, S.; GUÉRIOS, S.D.; BACILA, M. Características e incidência do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães e eficiência da quimioterapia e outros tratamentos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.5, p.41-48, 2000.

123 SPIN, J.S.; FONSECA, L.S.; MOTA, L.S.L.S.; CASTELLI, E.C.; SILVA, S.B.; FERREIRA, I.; ROCHA, N.S. Detecção molecular do rearranjo LINE-1/*C-MYC* em tumores venéreos transmissíveis caninos espontâneos. **Clínica Veterinária,** São Paulo, v.15, n.89, nov/dez. 2010.

124 SPUGNINI, E.P.; DOTSINSKY, I.; MUDROV, N. Biphasic pulses enhance bleomycin efficacy in a spontaneous canine genital tumor model of chemoresistance: Sticker sarcoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v.26, n.4, p.483-487, 2008.

125 STEWART, R.E.; HURST, E.W.; BORGESE, N.G. Neoplasms in mice inoculated with a tumour agente carried in tissue culture. **Journal of the National Cancer Institute**, Washington, v. 20, p. 1223-1243, 1958.

126 STOCKMANN, D.; FERRARI, H.F.; ANDRADE, A.L.; LOPES, R.A.; CARDOSO, T.C.; LUVIZOTTO, M.C.R. Canine transmissible venereal tumors: aspects related to programmed cell death. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, São Paulo, v.4, n.1, p.65-75, 2011.

127 STRICKER, T.P.; KUMAR, V. Neoplasia. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Robbins Patologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008. p.187-243.

128 SUDJAIDEE, P.; THEEWASTRAKOL, P.; TEEWASTRAKOL, S.; PONGLOWHAPAN, S.; CHATDARONG, K. Treatment of canine transmissible venereal tumour using vincristine sulfate combined with L-Asparaginase in clinical vincristine-resistent cases: a case report. **Thailand Journal of Veterinary Medicine,** Thailand, v.42, n.1, p.117-122, 2012.

129 SWANN, J.B.; SMYTH, M.J. Immune surveillance of tumors. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.117, n.5, p.1137-1146, 2007.

130 TAYLOR, C.R., COTE, R.J. **Immunonecroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist**. 2.ed. Philadelphia: Saundres, 1994. 533p.

131 TINUCCI-COSTA, M. **Utilização do fator de transferência dialisável (TFd) e RNA imune na imunoterapia de cães portadores naturais do tumor venéreo transmissível (TVT).** 1994. 129f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

132 TROMPIERI-SILVEIRA, A. C.; GERARDI, D.; MOURO, J.V.; COSTA, M.T.; ALESSI, A.C. Immunohistochemical expression of B and T-lymphocytes and TGF-β in experimentally transplanted canine venereal tumor. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1148-1154, 2009.

133 UJVARI, B.; PEARSE, A.M.; TAYLOR, R.; PYECROFT, S.; FLANAGAN, C.; GOMBERT, S.; PAPENFUSS, A.T.; MADSEN, T.; BELOV, K. Telomere Dynamics and Homeostasis in a Transmissible Cancer. **Public Library of Science One**, São Francisco, v.7, n.8, 2013.

134 VARASCHIN, M.S.; WOUTERS, F.; BERNINS, V.M.O.; SOARES, T.M.P.; TOKURA, V.N.; DIAS, M.P.L.L. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais: formas de apresentação clínico-patológicas. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 6, p.332-338, 2001.

135 VÁSQUEZ-MOTA, N.; SIMON-MARTÍNEZ, J.; CÓRDOVA-ALARCON, E.; LAGUNES, L.; FAJARDO, R. The T963C Mutations of P53 Gene Does Not Participate In The Clonal Origin of Canine TVT. **Veterinary Research Communication**, Dordrecht, v.32, p.187-191, 2008.

136 VIALLARD, J.F.; LACOMBE, F.; BELLOC, F.; PELLEGRIN, J.L.; REIFFERS, J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. **Cancer Radiotherapie**, França, v.5, n.2, p.109-129, abr. 2001.

137 VILENSKY, J.; KOUDINOVA, N.V.; HARMELIN, A.; SCHERZ, A.; SALOMON, Y. Vascular-targeted photodynamic terapy (VTP) of a canine-transmissible venereal tumour in a murine model with Pd-bacteriopheophorbide (WST09). **Veterinary and Comparative Oncology**, New York, v.3, n.4, p.182-193, 2005.

138 VOUSDEN, K.H.; LU, X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**. London, v.2, p.594-604, ago. 2002.

139 WARD, L.S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, Rio de Janeiro, v.46, n.4, p.351-360, 2002.

140 WELLMAN, M.L. The cytologic diagnosis of neoplasia. **Veterinary Clinics of North America**: **Small Animal Practice**, Philadelphia, v.20, p.919-938, 1990.

141 WILKENING, S., STAHL, F., BADER, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line hep G2 with regard to their biotransformation properties. **Drug Metabolism and Disposition,** Switzerland, v.31, n.8, p.1035-1042, 2003.

142 WILLIAMSON, M.M., MIDDLETON, D.J. Cutaneous soft tissue tumours in dogs: classification, differentiation, and histogenesis. **Veterinary dermatology,** Oxford, v.9, p.43-48, 1998.

143 XIONG, Y.; HANNON, G.J.; ZHANG, H.; CASSO, D.; KOBAYASHI, R.; BEACH, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Nature**, Paris, v.366, n.6456, p.701-704, 1993.

144 YANG, R.M.; NAITOH, J.; MURPHY, M.; WANG, H.J.; PHILLIPSON, J.; DEKERNION, J.B.; LODA, M.; REITER, R.E. Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. **The Journal of Urology**, Baltimore, v.159, n.3, p.941-945, 1998.

145 YANG, T.J.; PALKER, T.J.; HARDING, M.W. Tumor size, leucocyte adherence inhibition and serum levels of tumor antigen in dogs with the canine transmissible venereal sarcoma. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, Heildeberg, v.33, n.4, p.255-262, 1991.

146 YANG, T.J.; CHANDLER, J.P.; DUNNE-ANWAY, S. Growth stage dependent expression of MHC antigens on the canine transmissible venereal sarcoma. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v.55, p.131-134, 1987.

147 ZAMUDIO, N.; BOURC'HIS, D. Transposable elements in the mammalian germline: a comfortable niche or a deadly trap? **Heredity: An International Journal of Genetics**, London, v.105, p.92-104, 2010.

148 ZHANG, X.; ZHANG, Q.; ZHANG, J.; QIU, L.; YAN, S.S.; FENG, J.; SUN, Y.; HUANG, X.; LU, K.H.; LI, Z. FATS is a transcriptional target of p53 and associated with antitumor activity. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v.9, n.244, p.1-7, set. 2010.

149 ZITVOGEL, L.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F.; ANDRÉ, F.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. The Anticancer Immune Response: indispensable for therapeutic success? **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.118, n.6, p.1991- 2001, 2008.

150 ZOU, W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, London, v.6, p.295-397, 2006.

CAPÍTULO 2 - MORPHOLOGICAL PATTERNS AND MALIGNANCY CRITERIA OF TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR IN CYTOPATHOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EXAMS*

Caroline Rocha de Oliveira **LIMA**[1]; Rogério Elias **RABELO**[2]; Valcinir Aloisio Scalla **VULCANI**[2]; Adriana Pereira **FURTADO**[3]; Panmera Almeida **HELRIGEL**[4]; Luiz Augusto Batista **BRITO**[5]; Veridiana Maria Brianezi Dignani de **MOURA**[5]

1. PhD in Animal Science, School of Veterinary Medicine and Animal Science (EVZ), Federal University of Goiás (UFG), State Fiscal Agriculture, Defense Agricultural Protection Agency of Goiás state (AGRODEFESA) Jataí, Goiás, Brazil.♦
2. Department of Veterinary Medicine, Federal University of Goiás (UFG), Campus Jataí, Jataí, Goiás, Brazil.
3. School of Veterinary and Animal Science, Federal University of Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brazil.
4. Federal University of Goiás (UFG), Campus Jataí, Jataí, Goiás, Brazil.
5. Department of Veterinary Medicine, Animal Pathology, School of Veterinary and Animal Science (EVZ), Federal University of Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brazil.

* Artigo submetido à revista ***Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*** para análise do corpo editorial em 02 de abril de 2013.

♦Endereço para correspondência:
Rua 4, n. 160, Residencial Morada do Sol, Jataí-GO, CEP: 75.800-000. E-mail: carolrochavet@hotmail.com

MORPHOLOGICAL PATTERNS AND MALIGNANCY CRITERIA OF TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR IN CYTOPATHOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EXAMS

PADRÕES MORFOLÓGICOS E CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL AOS EXAMES CITOPATOLÓGICO E HISTOPATOLÓGICO

SUMMARY

This study aimed to identify morphological patterns and malignancy criteria of the TVT in cytopathological and histopathological evaluations and relate these characteristics to clinical evolution and response to chemotherapy. Regarding the gender, sixteen dogs were female and four were male. The age of the animals ranged between one and ten years old. Regarding breed, 80% of the dogs were mongrel dogs and 20% were of other breeds. Regarding cytological and histological analyzes, it was found that the cytological samples allowed a better characterization of the cell type. When determining the morphological standard of the TVT, the plasmacytoid type was the most common, followed by the lymphocytoid and mixed standards. Regarding the criteria of malignancy, there was no difference among the scores and the criteria and morphological types of the TVT. In addition, no morphological type of the TVT differed in response to chemotherapy, but the TVT presents morphological peculiarities that may interfere with tumor behavior, especially those related to increased aggressiveness and that are observed in the plasmacytoid TVT. **Uniterms:** dog, round cell tumor, morphology.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo identificar os padrões morfológicos e os critérios de malignidade do TVT aos exames citológico e histopatológico e relacionar essas características à evolução clínica e à resposta à quimioterapia. Em relação ao gênero, dezesseis cães eram fêmeas e quatro machos. A idade dos animais variou entre um e dez anos de idade. Quanto à raça, 80% dos cães eram sem raça definida e 20% de outras raças. Em relação às análises citológica e histológica, constatou-se que as amostras citológicas permitiram melhor caracterização do tipo celular. Quando da determinação do padrão morfológico do TVT, o tipo plasmocitoide foi o de maior ocorrência, seguido pelos padrões linfocitoide e misto. Quanto aos critérios de malignidade, não houve diferença entre os escores estabelecidos para os critérios e os tipos do TVT. Ainda, nenhum tipo morfológico do TVT diferiu quanto à resposta quimioterápica, mas o TVT apresenta particularidades morfológicas que podem interferir no comportamento tumoral, especialmente aquelas relacionadas à maior agressividade, e que são observadas no TVT plasmocitoide. **Unitermos:** cão, neoplasia de células redondas, morfologia.

1. INTRODUCTION

The transmissible venereal tumor (TVT) is characterized as an undifferentiated neoplasia of round cells, whose histological origin is still controversial[1,2]. The TVT presents worldwide distribution and in natural conditions it affects only dogs[3]. However, its occurrence has already been described in phylogenetic related species, as a result of experimental tumor transplantation[4,5]. It is a neoplasia commonly transmitted during copulation, by means of a rare deployment mechanism for viable tumor cells in genital mucosa of dogs, especially when there are tissue injury and discontinuity[6]. The social habits inherent to the dogs, such as sniffing and licking, also favor the primary development of neoplasia in extragenital location[7].

The tumor masses are characteristic and are generally easily recognized by means of clinical examination, in which they exhibit friable aspect, reddish appearance, easy bleeding, constant signs of ulceration and inflammation, and size that ranges from 0.5 to 10cm in diameter[8]. Deformation of the genital region, offensive odor and licking the genital area are also signs frequently pointed. On the other hand, the overall physical condition of the animals is usually preserved[2].

The TVT diagnosis is based on clinical signs, and additional exams are necessary to the diagnostic confirmation[6]. Among the tests employed, cytopathological and histopathological analyzes stand out[8,9,10]. Even though this neoplasia presents peculiar characteristics, studies show morphological differences in cell types that compose the neoplasia. Thus, Amaral et al.[11] Floréz et al.[12] proposed the morphological classification of the TVT in three types, according to the predominant cell pattern, and described the lymphocytoid, plasmacytoid and mixed forms, comprising an intermediate pattern between the first two.

The presence of three or more criteria of malignancy indicates the malignant potential of a neoplasia[13], which also applies to the TVT. Moreover, some studies address the possible correlations among the predominant morphological type, the malignant potential [8, 12, 14, 15] and resistance to chemotherapy[12,16] of this neoplasia in dogs. Therefore, this study aimed to identify morphological patterns and malignancy criteria of the TVT using cytopathological and histopathological exams and relate these characteristics to clinical evolution and response to chemotherapy with vincristine sulfate.

2. MATERIAL AND METHODS

This study was conducted after approval of the Committee for Research Ethics of the Federal University of Goiás (COEP/UFG - 123/2011). The experimental protocol included obtaining clinical data from

dogs with the TVT, the collection of samples for cytopathological and histopathological analyzes, and obtaining data related to the monitoring of chemotherapy.

From August to December 2011, 20 dogs with the TVT of primary genital location and from the ambulatory routine of a veterinary hospital were studied. There were no restrictions as breed, sex and age. In order to obtain the clinical data, each animal underwent a complete physical examination and the information was recorded on an individual clinical evaluation protocol. Only dogs in their first occurrence of the TVT, which had not received previous chemotherapy were admitted into the study.

The clinical evaluation protocol included data on breed, age and sex of the animals, breeding habits, reproductive history and contact with other dogs. Information related to neoplasia was also recorded, such as appearance of the tumor mass, duration of clinical evolution, tumor size, evaluation of the overall physical condition of the animals, and presence or absence of apparent metastasis by visual inspection, palpation and detailed physical examination of dogs with TVT.

For microscopic evaluations, two clinical specimens were collected from the genital tumor of each dog, one being used for the preparation of the cytological sample and the other for the preparation of the histological sample. Impression cytology was performed by gentle compression of a slide against the neoplastic fragment, allowing the sample to dry at room temperature. Each slide was identified, fixed in methanol for five minutes and subjected to Giemsa stain. The tumor fragment for histological analysis, obtained from the border region between the neoplasia and the normal tissue, was fixed for 48 hours in 10% buffered formalin, processed and inserted in paraffin for the confection of 4μm cuts, which were, in turn, stretched on histological slides, stained with hematoxylin and eosin (HE) and evaluated concerning histomorphological aspects. The cytological and histological analyzes were performed by two researchers, with no information of the samples identification, and followed the described Floréz et al.[12] for the cytomorphological classification (Tab 1.), and Gaspar et al.[16] for malignancy criteria of the TVT. Initially, the slides were evaluated with 5x objective, for checking the sample cellularity and the stain standard, and in the sequence 10x, 20x and 40x lens, for analysis of cellular details and malignancy criteria (Table 1).

The criteria of cell malignancy were divided into general, cytoplasmic and nuclear, all classified as absent, mild, moderate or severe, according to the intensity or amount. Among the general ones, anisocytosis, anisokaryosis, macrokaryosis, basophilia, eosinophilia, cytoplasmic vacuoles and lymphoglandular bodies were considered. The cytoplasmic criteria comprised changes in cell morphology, such as spindle cell, tadpole cells,

phagocytosis and cytoplasmic projections. On the other hand, nuclear criteria included hyperchromasia, binucleation, multinucleation, pseudo-inclusion and mitosis.

After confirmation of the diagnosis, the animals underwent chemotherapy with vincristine sulfate at a 0.025mg/kg dose intravenously, every seven days, totaling at least four applications. The end of treatment was determined from the verification of total regression of the apparent tumor mass and performance of a second cytopathological exam for proving the absence of viable neoplastic cells.

In order to analyze the results related to clinical data and response, the therapy used was descriptive statistics. For the classification of the TVT cytomorphological standard the statistical test based on χ^2 was used. The general criteria of malignancy, cytoplasmic and nuclear, and the comparison between the morphological type and response to therapy underwent nonparametric statistical comparison test by Kruskal-Wallis ranks. For all tests the significance level of 5% was considered.

3. RESULTS

Regarding the gender of dogs with the TVT, among the twenty animals studied, 16 were females (80%) and 4 were males (20%). The age of the animals ranged between one and ten years old, and the highest percentage of dogs affected was concentrated in the age group of four to six years old (50%). Regarding breed, 80% of the dogs were mongrel dogs and the other 20% were of other breeds (Table 2). The general parameters and changes resulting from the neoplastic process highlighted similar profiles of the animals. In most cases, the dogs presented reproductive history of 3 or more copulas and no animal of the study had been neutered. Regarding the breeding habits, it was found that the animals had free access to the streets, being impractical to control the origin of the contacts. Despite the development of the neoplastic process, only one dog presented poor general physical condition, with obvious signs of dehydration and weight loss. The remaining dogs were apparently well, except for the presence of tumor mass. Concerning size, nine animals (45%) had tumor mass of small diameter, five (30%) of medium-size and six (40%) of large size. The owners could not provide exact information about the evolution time of the neoplastic lesions.

About cytological and histological analyzes, it was found that the cytological samples allowed a better characterization of the cell type, as well as the malignancy criteria, with less image distortion when compared to the histological ones (Fig. 1). When determining the morphological standard of the TVT, the plasmacytoid type was the most common (45%), followed by the lymphocytoid (30%) and mixed (25%) standards (Fig. 2). In the evaluation of the relation between the morphological standard and the size of neoplasia

it was found that in medium and large sized tumors, lymphocytoid and mixed types were predominant, and in the small masses, the plasmacytoid standard was predominant. It was not possible to evaluate the relation between the clinical evolution and morphological standard, since the owners could not provide the exact information about the evolution time of lesions. Further, apparent metastases were not observed, including the skin, lymph nodes and oral, nasal and ocular mucous membranes**.**

Regarding the malignancy criteria, including general, cytoplasmic and nuclear ones, there was no significant difference ($P < 0.05$) among the scores set and the criteria and morphological types of the TVT. Therefore, the malignancy criteria and the ratio between the highest and lowest frequency are described in relative numbers. Among the general criteria, anisocytosis was observed in fourteen samples with discreet score (70%) and in six with moderate score (30%). Anisokaryosis was a finding present in 100% of the cases, and a discreet score was observed in fifteen (75%) and moderate in five samples (25%). Macrokaryosis was not present in ten samples of the TVT (50%), but it was mild or moderate in five (25%), respectively. The cytoplasmic vacuoles criterion was found in discrete degree in eight cases (40%), moderate in seven (35%) and severe in three (35%). However, this criterion was not observed in two tumors (10%). The cytoplasmic basophilia and eosinophilia parameters were analyzed together, since in the presence of one the absence of the other was considered. Considering the total of the samples, in six (30%) there was basophilic cytoplasm predominance and in fourteen (70%) there was eosinophilic cytoplasm predominance. In both parameters, the scores were concentrated on mild or moderate. Lymphoglandular corpuscles were not observed in the total (100%) of the samples analyzed (Table 3).

Concerning cytoplasmic criteria, spindle cells were not found in any sample. Phagocytosis was the second cytoplasmic criterion with lowest occurrence, being described in only six cases (30%), with discreet score. Among these, four presented plasmacytoid morphological standard (20%). The tadpole cells and the cytoplasmic projections also presented low frequency. For both criteria, eight samples (40%) were positive, being six (30%) with discreet score and two with moderate score (10%). Although no significant difference, the findings reported for these criteria were more frequent in plasmacytoid type samples (Table 3).

Regarding the criteria of nuclear malignancy, binucleation was the most frequent criterion, and seven (35%) in discreet score and two in moderate score (10%). Hyperchromasia and nuclear pseudo-inclusions were found in discreet score in two samples (10%) of the plasmacytoid type. In the other samples, regardless of the predominant cell standard, these criteria were not observed. Multinucleation was present, in discreet score, in five samples, being three of the plasmacytoid type and one of the lymphocytoid and mixed types, respectively.

Mitoses were detected in five samples (25%) of the TVT. Among these, four exhibited discreet score (20%) and one (5%) moderate. When the cases of discreet score for mitosis were analyzed, two were of the lymphocytoid type and two were of the plasmacytoid type. On turn, the moderate degree of mitosis was of the plasmacytoid type, although with no significant difference compared to the other types ($P < 0.05$) (Table 3).

Among the 20 dogs with the TVT, 13 were monitored since the beginning of treatment until the complete remission of the neoplasia, determined by the clinical absence of tumor mass and tumor cells in the cytopathological exam, and the ratio between the number of chemotherapy sessions required for the complete regression and morphological standard of neoplasia was performed (Table 4). However, no morphological type of the TVT differed significantly in response to chemotherapy (Table 4).

In five cases, the owners opted to interrupt the treatment of animals before the complete regression and confirmation of the absence of the TVT. Two animals died during the study period due to other complications. The autopsies of the animals were not performed once they were not authorized by the owners.

4. DISCUSSION

The study of the TVT arouses interest in the scientific community because it is a common neoplasia in dogs, mainly in Brazil, being the genital location one of its main characteristics. Amaral et al.[11] evaluating 138 cases of this neoplasia has shown that 89.6% of the tumors were located in genital area. In this study, a similar situation was observed, whereas all animals selected presented the primary TVT of genital.

The cases of the TVT were selected regardless of gender, breed and age of the animals; whereas studies state that there is no predisposition to neoplasia related to these variables [15,17]. However, there was a predominance in female animals, which reflects the proper deployment of the TVT cells in the genital tract of bitches. Regarding breed, the majority of tumors occurred in mongrel dogs, which corroborates the described by Brandão et al.[17], who attributed the high incidence of TVT in mixed breed dogs. Added to this, Souza et al.[18] complement that the TVT is more common in areas with stray dogs. The age of animals affected ranged from one to ten years old, although the highest concentration occurred in the age group of four to six years old and with reproductive history of three or more copulations. Similarly, Das and Das.[2] mentioned that dogs between three and six years old are most affected by the TVT because they are in the period of the highest sexual activity of an adult dog. One animal had physical weakness, with signs of weight loss and dehydration. On the other hand, in most dogs the general condition was good, confirming the descriptions by Amaral[19], which that canines with the TVT usually present the physical condition preserved.

Regarding the microscopic analyzes, the cytopathological exam allowed better visualization of the cell type and malignancy criteria of the TVT, with less image distortion when compared to the histological slides [14]. In this context, Duncan et al.[20] discussing the use of cytology for diagnosis of round cell neoplasias, pointed out that in many cases the cytological characteristics are definitive for diagnosis compared to the histological ones, which was also observed in this study. Thus, the cytopathological analysis is suggested for the morphological classification of the TVT and evaluation of the criteria of malignancy.

The predominant morphological standard of the TVT followed the Floréz et al.[12] criteria, with higher frequency of the plasmacytoid type, followed by the lymphocytoid and mixed standards, respectively, which was also observed by Gaspar et al.[16]. It is noteworthy that there was a relation between the morphological standard and the size of the tumor, confirming that the plasmacytoid type predominates among the small masses and the others predominate among the medium and large masses, which is also reported by Salamanca et al.[15]. On the other hand, it was not possible to establish the relation between the morphological standard and duration of clinical evolution, as most owners could not provide information about the time of onset of the neoplasia. Amaral et al.[11] also did not succeed regarding this parameter. A similar situation occurred in the relation between the morphological standard and the metastasis occurrence, whereas no apparent metastatic foci were observed in animals of this study. About this, it is worth noting the low occurrence of metastases in dogs with the TVT, what according to Tinucci-Costa[21], is less than 5%, hindering studies involving such relation.

Among the general criteria of malignancy, anisocytosis, anisokaryosis, macrokaryosis, basophilia and eosinophilia there are relevant data about the cytomorphological changes. Meinkoth et al.[22] mentioned that these criteria are well established to evaluate the malignancy of a cell sample. However, there are reports that some degree of anisocytosis is present in any tissue. It should be added that the macrokaryosis results of multiplying the nuclear DNA content, and the presence of this finding in moderate to severe scores is considered clinically important[13]. In this research, 25% of the samples presented moderate macrokaryosis, indicating an important finding about the malignant potential of the TVT.

Regarding the cytoplasmic vacuoles, Meinkoth et al.[22] describe that this finding is the morphological characteristic which distinguishes the TVT from the other round cells neoplasias and its absence is rare. In this research, in only two samples there were no cytoplasmic vacuoles in tumor cells. Despite that, the TVT diagnosis was confirmed based on clinical characteristics and microscopic parameters. The lymphoglandular bodies were not found in the samples analyzed. Although Amaral et al.[11] describe them as consistent finding, they are small and may be unnoticed, fact which may have occurred in this study. The spindle

cells were not observed. In contrast, tadpole cells and cytoplasmic projections were present in 40% of tumors, which is in accordance to Gaspar et al.[16]. These same authors relate the tadpole with the action of microtubules, the rigidity of the membrane and the pressure of contiguous cells, which allows inferring high cellularity of neoplastic masses which present this cytomorphological criterion.

The criteria of hyperchromasia and pseudo-inclusion nuclear malignancy occurred in 10% of the samples, which were of plasmacytoid pattern. Ackerman[13] also observed such criteria in cytological samples of the TVT and the occurrence was associated with the increase of DNA content in preparation for cell division, which supports the findings related to mitosis in this study, particularly the largest mitotic index in samples of plasmacytoid cytomorphology. Mitosis is a common and well established characteristic of the TVT. However, Machlachlan and Kennedy[23] do not consider this criterion as a strong indicator of malignancy to the TVT, since the majority is typical. Nevertheless, this criterion is considered in the evaluation of malignancy in this study, given that malignant cells replicate with increased speed.

Treatment with vincristine sulfate was effective in all animals treated and, generally, the dogs showed complete remission of the neoplasia with four or five sessions of chemotherapy. Only in one animal with plasmacytoid TVT diagnosis, the healing occurred at the seventh session. According to Gaspar[14] and Amaral[19], the plasmacytoid pattern presents more aggressive behavior and increased expression of P-glycoprotein, responsible for tumor resistance, which should be related to that observed in this study. Given this and the other findings described, the plasmacytoid TVT presents more aggressive characteristics when compared to the other morphological types. So, could be that the plasmacytoid TVT shows higher resistance to the vincristine sulfate. It is necessary to add that the abandonment of the treatment described in five cases has precluded the delineation of the correlation between therapeutic success and the morphological standard of the TVT. Further, as described by Amaral[19], the conduct of treatment interruption comprises a factor that contributes to the resistance of the neoplastic cells to antineoplastic medications.

5. CONCLUSIONS

The cytopathological exam allows better characterization of the morphological standards and malignancy criteria of the TVT compared to the histopathological exam, being possible to identify the plasmacytoid, lymphocytoid and mixed types. The TVT presents morphological peculiarities that may interfere with tumor behavior, especially those related to increased aggressiveness and that are observed in the plasmacytoid TVT, the most common morphological type of this neoplasia.

6. REFERENCES

1. MOUTINHO, F.Q.; SAMPAIO, G.R.; TEIXEIRA, C.R.; SEQUEIRA, J.L.; LAUFER, R. Tumor venéreo transmissível com metástases cutâneas em um cão. **Ciência Rural**, v.25, n.3, p.469-471, 1995.
2. DAS, U.; DAS, A.K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Veterinary Research Communications**, v.24, n.8, p.545-556, 2000.
3. BASSANI-SILVA, S.; SFORCIN, J.S.; AMARAL, A.S.; GASPAR, L.F.; ROCHA, N.S. Propolis effect in vitro on canine transmissible venereal tumor cells. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p.261–265, 2007.
4. COCKRILL, J.M.; BEASLEY, J.N. Transmission of transmissible venereal tumor of the dog to the coyote. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, n.3, p.409-410, 1979.
5. HARMELIN, A.; PHINTUS, J.H.; 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. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.63, p.245-249, 2002.
6. SCARPELLI, K.C.; VALLADÃO, M.L.; METZE K. Predictive factors for the regression of canine transmissible venereal tumor during vincristine therapy. **The Journal Veterinary**, v.183, n.3, p.62-363, 2010.
7. SANTOS, F.G.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, J.E.S.; CASSALI, G.D.; PAIXÃO, T.A.; MARTINS, A.S.; SILVA, S.S.; MARTINS, R.F.; MORO, L. Apoptosis in the transplanted canine transmissible venereal tumor during growth and regression phases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, p.607-612, 2008.
8. STOCKMANN, D.; FERRARI, H.F.; ANDRADE, A.L.; LOPES, R.A.; CARDOSO, T.C.; LUVIZOTTO, M.C.R. Canine transmissible venereal tumors: aspects related to programmed cell death. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n.1, p.65-75, 2011.
9. SPUGNINI, E.P.; DOTSINSKY, I.; MUDROV, N. Biphasic pulses enhance bleomycin efficacy in a spontaneous canine genital tumor model of chemoresistance: Sticker sarcoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.26, n.4, p.483-487, 2008.
10. SÁNCHEZ-SERVÍN, A.; MARTINÉZ, S.; CÓRDOVA-ALARCON, E.; FAJARDO, R. TP53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor. **Journal of Veterinary Science,** v.10, p.353-355, 2009.
11. AMARAL, A.S.; BASSANI-SILVA, S.; FERREIRA, I.; FONSECA, L.S.; ANDRADE, F.H.E.; GASPAR,

L.F.J.; ROCHA, N.S. Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p.253-260, 2007.

12. FLORÉZ, M.M.; PEDRAZA, F.; GRANDI, F.; ROCHA, N.S. Cytological subtypes of canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Clinical Pathology**, v.41, n.1, p.3-5, 2012.
13. ACKERMAN, M.R. Acute inflammation. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic basis veterinary disease. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007.** chap. 3-4, p.101-191.
14. GASPAR L.F.J. **Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com danos citogenéticos, taxa de proliferação e resposta clínica à quimioterapia**, 2005. 157 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
15. SALAMANCA, S.; SANTADER-BAQUERO, A.; TRIANA-GARCÍA, P.A.; ROMERO, S.; RONDÓN-BARRAGÁN, I.S. Tumor venéreo transmisible (TVT) con metástasis pulmonar: reporte de caso. **Orinoquia**, v.12, n.2, p.162-170, 2008.
16. GASPAR L.F.; FERREIRA I.; COLODEL, M.M.; BRANDÃO, C.V.; ROCHA, N.S. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: cell morphology and influence on p-glycoprotein expression. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.34, n.5, p.447–454, 2010.
17. BRANDÃO, C.V.; BORGES, A.G.; RANZONI, J.J.T.; RAHAL, S.C.; TEIXEIRA, C.R.; ROCHA, N.S. Tumor venéreo transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). **Revista Educação Continuada - CRMV-SP**, v.5, n.1, p.25-31, 2002.
18. SOUSA J.; SAITO V.; NARDO A.; RODASKI S.; GUÉRIOS S.; BACILA M. Características e incidência do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães e eficiência da quimioterapia e outros tratamentos. **Archives of Veterinary Science**, v.5, n.1, p.41-48, 2000.
19. AMARAL, A.S. **Tumor venéreo transmissível canino:** critérios de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada à imunocitoquímica e lesões de DNA. 2005. 225f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
20. DUNCAN, J.R., PRASSE, K.W. Cytology of canine cutaneous round cell tumors: mast cell tumor, histiocytoma, lymphosarcoma and transmissible venereal tumor. **Veterinary Pathology**, v.16, n.6, p.673-679, 1979.
21. TINUCCI-COSTA, M. **Tumor venéreo transmissível canino.** In: DALECK, C.R.; NARDI, A.B.;

RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2008.** p.539-556.

22. MEINKOTH, J.H.; COWELL, J.H.; COWELL, R.L. Recognition of basic cell types and criteria of malignancy. **The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice**, v.32, p.209-1235, 2002.
23. MACHLACHLAN, N.J.; KENNEDY, P.C. Tumors of genital systems. In: MEUTEN, D.J. (E.D.) **Tumors in domestic animals. 4ed. Ames: Lowa Lowa State, 2002.** chap.3, p.547-573.

TABLE 1 - Criteria to the cytomorphological classification of TVT at cytopathological and histopathological exams. Jataí, Brazil, 2012.

Type	Characteristics
Lymphocytoid	Prevalence of 60% or more of typical TVT cells, presenting rounded morphology, scanty and finely granular cytoplasm, and with vacuoles in the periphery of the cell, and round nuclei with rough chromatin and one or two protruding nucleoli.
Plasmacytoid	Prevalence of 60% or more of TVT cells with ovoid morphology, more abundant cytoplasm (lower nucleus: cytoplasm ratio), with eccentrically located nucleus.
Mixed	Mixed cellularity in lymphocytoid and plasmacytoid types, none of which exceeding 59% of the total.

Source: Floréz et al. [12]

339 TABLE 2 - Frequency of cases of TVT according to sex, age and breed. Jataí, Brazil, 2012.

	Gender and Breed of Dogs With TVT							
	Female				Male			
Age Range	Boxer	Pit Bull	Poodle	Mongrel dogs	Boxer	Pit Bull	Poodle	Mongrel dogs
0-3 years old	1	1	-	4	-	1	-	-
4-6 years old	-	-	-	7	-	-	1	2
7-10 years old	-	-	-	3	-	-	-	-

340

341

TABLE 3 – Distribution of the number of samples of the criteria general, cytoplasmic and nuclear malignancy according to the scores and the morphological, lymphocytoid, plasmacytoid and mixed types of the TVT. Jataí, Brazil, 2012.

Criteria	Absent			Discreet			Moderate			Severe		
	L	P	M	L	P	M	L	P	M	L	P	M
General Criteria (n=20)												
Anisocytosis	-	-	-	5[a]	6[a]	5[a]	1[a]	3[a]	1[a]	-	-	-
Anisokaryosis	-	-	-	5[a]	6[a]	4[a]	1[a]	3[a]	1[a]	-	-	-
Macrocariose	4[a]	4[a]	2[a]	1[a]	2[a]	2[a]	1[a]	3[a]	1[a]	-	-	-
Basophilia	-	-	-	0[a]	3[a]	0[a]	1[a]	2[a]	1[a]	-	-	-
Eosinophilia	-	-	-	3[a]	2[a]	2[a]	2[a]	2[a]	2[a]	-	-	-
Cytoplasmic Vacuoles	0[a]	2[a]	0[a]	3[a]	4[a]	1[a]	2[a]	3[a]	2[a]	1[a]	0[a]	2[a]
Lymphoglandular Bodies	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cytoplasmic Criteria (n=20)												
Spindle Cell	6[a]	9[a]	5[a]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tadpole Cell	4[a]	5[a]	3[a]	2[a]	2[a]	2[a]	0[a]	2[a]	0[a]	-	-	-
Phagocytosis	5[a]	5[a]	4[a]	1[a]	4[a]	1[a]	-	-	-	-	-	-
Cytoplasmic Projections	5[a]	4[a]	3[a]	1[a]	3[a]	2[a]	0[a]	2[a]	0[a]	-	-	-
Nuclear Criteria (n=20)												
Hyperchromasia	6[a]	7[a]	5[a]	0[a]	2[a]	0[a]	-	-	-	-	-	-
Binucleation	4[a]	4[a]	3[a]	2[a]	4[a]	1[a]	0[a]	1[a]	1[a]	-	-	-
Multinucleation	6[a]	4[a]	5[a]	1[a]	3[a]	1[a]	-	-	-	-	-	-
Pseudo-inclusions	6[a]	7[a]	5[a]	0[a]	2[a]	0[a]	-	-	-	-	-	-
Mitosis	5[a]	4[a]	6[a]	2[a]	2[a]	0[a]	0[a]	1[a]	0[a]	-	-	-

The same overwritten letters in the same column (a) do not differ among each other by the nonparametric test of Kruskal-Wallis ranks ($P > 0.05$). Numerical values correspond to the number of samples with the correspondent findings for each score and morphological type. L: lymphocytoid TVT, P: plasmacytoid TVT, M: mixed TVT.

350 TABLE 4 - Ratio between the number of chemotherapy sessions and the morphological standard
351 prevalent in dogs with the TVT. Jataí, Brazil, 2012.

Number of chemotherapy sessions	Morphological standard of the TVT		
	Lymphocytoid	Plasmacytoid	Mixed
Four (n=9)	3	4	2
Five (n=3)	1	2	0
Seven (n=1)	0	1	0

352

353

MORPHOLOGICAL PATTERNS AND MALIGNANCY CRITERIA OF TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR TO CYTOPATHOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EXAMS

PADRÕES MORFOLÓGICOS E CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL AOS EXAMES CITOPATOLÓGICO E HISTOPATOLÓGICO

PÁGINA 62

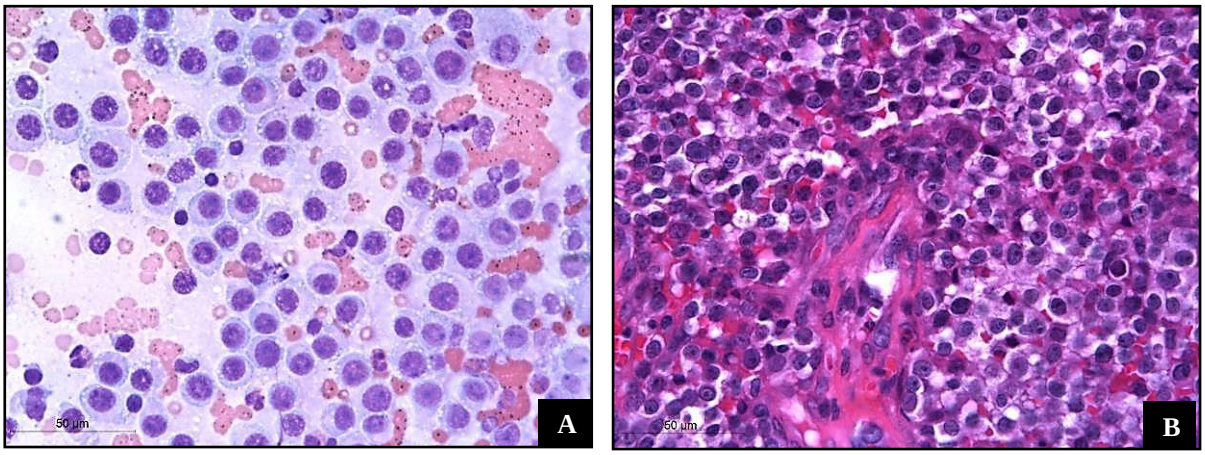


FIGURE 1 - Microscopic features of canine transmissible venereal tumor (TVT). Better quality and preservation of the cellular morphology in the cytological sample with respect to the histological sample (A) Cytopathological exam, Giemsa, 40x objective. (B) Histopathological exam, HE, 40x objective.

MORPHOLOGICAL PATTERNS AND MALIGNANCY CRITERIA OF TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR TO CYTOPATHOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EXAMS

PADRÕES MORFOLÓGICOS E CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL AOS EXAMES CITOPATOLÓGICO E HISTOPATOLÓGICO

PÁGINA 62

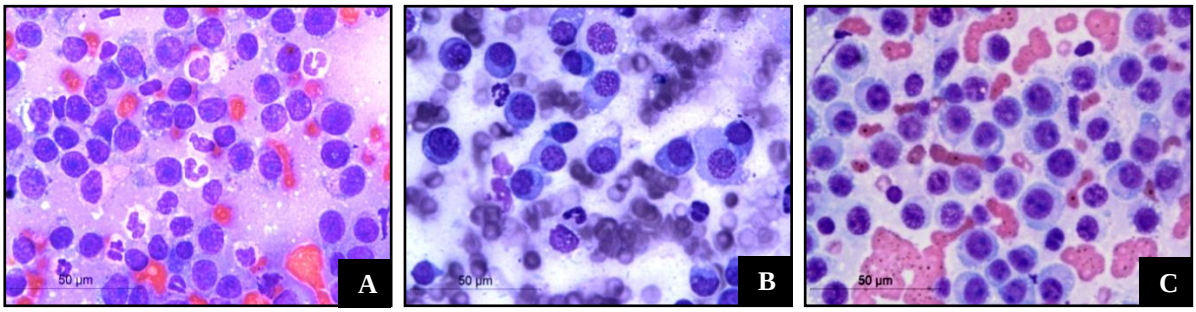


FIGURE 2 - Morphological standards of the transmissible venereal tumor in cytopathological exam. A) Lymphocytoid standard. Round cells with large nucleus and scanty cytoplasm, similar to lymphocytes. B) Plasmacytoid standard. The cells present more abundant cytoplasm and eccentric nucleus, with lower nucleus/cytoplasm ratio. C) Mixed standard. Lymphocytoid and plasmacytoid morphology cells. Giemsa, 20x objective.

CAPÍTULO 3 – Inserção do elemento LINE-1 no gene *C-MYC* e imunorreatividade das proteínas C-MYC, p53, p21 e p27 nos diferentes padrões morfológicos do tumor venéreo transmissível canino

RESUMO

O tumor venéreo transmissível canino (TVT) acomete primariamente a genitália externa de cães, a partir do transplante natural de células tumorais viáveis. Diferenças no padrão celular predominante originaram a classificação morfológica do TVT. A inserção do elemento LINE-1 no gene *C-MYC* é descrita e sua identificação constitui diagnóstico complementar da neoplasia. A despeito da importância das proteínas C-MYC, p53, p21 e p27 na regulação do ciclo celular e da apoptose, pouco se conhece sobre o papel dessas no TVT e não há referências sobre a sua expressão nos diferentes padrões morfológicos do tumor. Assim, esta pesquisa teve por objetivos diagnosticar e caracterizar os padrões morfológicos do TVT aos exames citopatológico e histopatológico, identificar a inserção do elemento LINE-1 no gene *C-MYC*, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), e avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas C-MYC, p53, p21 e p27, pela técnica do microarranjo tecidual (TMA). Também foi estudada a relação entre as proteínas C-MYC e p53 e a interferência dessas na expressão de p21 e p27. Para isso, foram utilizadas 20 amostras de TVT de ocorrência natural, submetidas às análises citopatológica, histopatológica, imunoistoquímica e diagnóstico molecular da neoplasia. Na classificação morfológica foram considerados os tipos linfocitoide, plasmocitoide ou misto e, na imunoistoquímica, avaliaram-se a intensidade e o percentual de marcação em cada tipo morfológico. No estudo morfológico houve predominância do tipo plasmocitoide, seguido dos tipos linfocitoide e misto. Todas as amostras amplificaram um fragmento de aproximadamente 340pb, caracterizando a inserção do elemento LINE-1 no gene *C-MYC* no TVT. À imunoistoquímica houve superexpressão de C-MYC e p53 em todos os padrões morfológicos e correlação entre C-MYC e p53, entre C-MYC, p21 e p27 e entre p53, p21 e p27, mas não entre p53 e p21 no tipo plasmocitoide. Concluiu-se que as alterações morfológicas permitem a classificação do TVT quanto ao tipo celular predominante e que a inserção do elemento LINE1 no gene *C-MYC* é específico para o TVT canino. Ainda, a superexpressão tecidual e a correlação entre as proteínas C-MYC, p53, p21 e p27 indicam redução e/ou perda de funcionalidade das mesmas no microambiente do TVT, com consequente supressão apoptótica, manutenção do crescimento celular e progressão da neoplasia.

Palavras-chave: apoptose, cães, ciclo celular, citologia, imunoistoquímica, reação em cadeia da polimerase.

1 INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível canino (TVT) acomete primariamente a genitália externa de cães (STOCKMANN et al., 2011). Apresenta característica singular, pois não decorre da transformação neoplásica de células normais (VÁSQUEZ-MOTA et al., 2008), e seu crescimento e evolução ocorrem a partir da transmissão, por transplante natural, de um clone de células tumorais de cães acometidos àqueles saudáveis (MURGIA et al., 2006).

Morfologicamente caracteriza-se como neoplasia indiferenciada de células redondas, com núcleo único, grande e nucléolo proeminente. O citoplasma apresenta limites mal definidos, se cora palidamente e possui vacúolos citoplasmáticos que acompanham as bordas celulares (AMARAL et al., 2012). Apesar dessas particularidades, há diferenças morfológicas constantes e sistemáticas entre as células do TVT, o que permite classificá-lo conforme o padrão celular predominante em linfocitoide, plasmocitoide ou misto (FLORÉZ et al., 2012).

A inserção do elemento LINE-1 no gene *C-MYC* refere-se a um rearranjo molecular específico do TVT. Assim, sua identificação é descrita como método diagnóstico complementar da neoplasia, e a reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste em ferramenta molecular altamente específica para verificar essa alteração (KATZIR et al., 1985; LIAO et al., 2003; O'NEILL, 2011; FONSECA et al., 2012).

O gene *C-MYC* é um proto-oncogene, responsável pela codificação de fosfoproteínas nucleares altamente conservadas, a p67 ou MYC-1, a p64 ou MYC-2, e a MYC-S ou MYC-3, chamadas proteínas C-MYC (FARIA & RABENHORTS, 2006). Atua em múltiplos canais celulares regulatórios, contribuindo de forma ímpar para a manutenção da integridade genômica em organismos superiores (PELENGARIS & KHAN, 2003; FARIA & RABENHORTS, 2006).

No controle da proliferação, o *C-MYC* é considerado um regulador positivo do ciclo celular, já que desempenha atividade em diferentes vias moleculares, incluindo a inativação da expressão da ciclina E, a indução da fosfatase cdc25A, o incentivo à transcrição E2F-dependente, fomento ao crescimento celular, e a ativação do complexo ciclina/CDK. Dessa forma, em uma de suas vias regulatórias, o *C-MYC* atua na inibição funcional da proteína inibidora de quinase p27. Especula-se que esse gene também interfira nas vias de inibição de outros genes supressores tumorais, como P21, P57, P15 e P16. Paralelamente, o *C-*

MYC atua no mecanismo de apoptose celular por meio da ativação indireta do gene supressor tumoral P53, via p19, desencadeando mecanismos apoptóticos (PELENGARIS et al., 2002; FARIA & RABENHORST, 2006).

Alterações moleculares no *C-MYC* podem conduzir à instabilidade genômica e, consequentemente, à transformação maligna. No entanto, os mecanismos moleculares relacionados a esse processo não são completamente esclarecidos (LUTZ et al., 2002; NAPOLI et al., 2002). Nos tecidos, essas alterações podem ser atribuídas à superexpressão das proteínas C-MYC, considerando que as células diferenciadas normalmente expressam níveis reduzidos dessas proteínas (FARIA & RABENHORST, 2006).

A proteína p53 exerce função antagônica às proteínas C-MYC, sendo reguladora negativa do ciclo celular, pois atua nos pontos de checagem ativando genes supressores tumorais, como o P21, bloqueando a progressão do ciclo. De forma semelhante ao *C-MYC*, polimorfismos e mutações no gene P53 culminam com perda de homozigose, instabilidade genômica e condução à malignidade (SÁNCHEZ-SERVÍN et al., 2009). Com a perda funcional, há aumento da meia-vida proteica e acúmulo nos tecidos. Assim, a expressão tecidual de p53 caracteriza a presença da proteína mutada, que é indetectável em tecidos normais (SANTOS et al., 2008; BUCHWALOW & BÖCKER, 2010; MORO et al.,2010).

Embora a expressão de p53 seja descrita nas células do TVT (MORO et al., 2010), não foram encontrados relatos sobre a relação desta, bem como da proteína C-MYC e àquelas inibidoras do ciclo celular dependentes de quinases. Nesse cenário, destaca-se a importância da imunoistoquímica na identificação das proteínas que permitem a avaliação do comportamento biológico do tumor e a determinação do prognóstico (HIRAYAMA et al., 2002). Como alternativa, a técnica de microarranjo tecidual (*Tissue microarray* - TMA) permite avaliar a expressão proteica de inúmeras amostras em uma única reação (ANDRADE et al., 2007).

Este estudo teve por objetivos diagnosticar e caracterizar os padrões morfológicos do TVT aos exames citopatológico e histopatológico, e identificar a inserção do elemento LINE-1 no gene *C-MYC*, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Também foi avaliada a expressão imunoistoquímica, por TMA, da oncoproteína C-MYC e das proteínas supressoras tumorais p53, p21 e p27, e a interferência das proteínas C-MYC e p53 na expressão de p21 e p27.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Hospital Veterinário do Campus de Jataí da UFG, Unidade Jatobá (HV/CAJ/UFG), Jataí, GO, no Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (SPA/EVZ/UFG), Goiânia, GO e no Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (IB/UNB). O experimento obedeceu aos preceitos éticos em experimentação, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Goiás (COEP/UFG) (n. 123/2011).

Foram utilizados 20 cães, sem restrição quanto à idade, ao sexo e à raça, no período de agosto a dezembro de 2011. Para a obtenção dos dados clínicos, os animais foram submetidos a exame físico completo e as informações registradas em protocolo de avaliação clínica individual. Admitiram-se no estudo apenas cães portadores de TVT de ocorrência natural, localizado primariamente na genitália externa e não submetidos à terapia quimioterápica prévia.

Colheita e processamento das amostras

De cada tumor foi obtido um fragmento de biopsia que, após ressecção, foi seccionado em três. O primeiro (AT1) foi utilizado na preparação da amostra citopatológica, obtida pela impressão suave do tecido tumoral sobre uma lâmina histológica. O segundo (AT2) serviu às análises histopatológica e imunoistoquímica. Para isso, foi fixado durante 48 horas em formol tamponado a 10% e mantido em álcool 70ºGL até o momento do processamento e da inclusão em parafina. O terceiro fragmento (AT3) destinou-se ao diagnóstico molecular do TVT e, para tal, foi acondicionado em criotubo (TPP, Techno Plastic Products, Suíça) contendo 1,5mL de solução para a estabilização do material genético celular (RNA Later® - Invitrogen, EUA). O material foi resfriado a 4^{o}C por 24 horas e, em seguida, congelado a -20°C, sendo processado por ocasião da técnica da PCR. No momento do processamento, uma amostra AT3 foi inviabilizada e excluída do estudo.

Para compor o grupo controle negativo do diagnóstico molecular do TVT, obteve-se uma amostra de um segundo tipo neoplásico (mastocitoma), bem como duas amostras de sangue periférico de animais considerados hígidos após exame físico e complementar (hemograma). Assim, foram colhidos 3mL de sangue total,

acondicionados em tubo tipo *vacutainer* (Becton, Dickinson & Company, EUA) contendo EDTA, e congelados a -20°C para a extração do DNA e análise molecular.

Análises citopatológica, histopatológica e classificação morfológica do TVT

As amostras citopatológicas obtidas por impressão do fragmento AT1 foram mantidas à temperatura ambiente, fixadas em metanol por cinco minutos e coradas pela coloração de Giemsa, por 30 minutos. O diagnóstico citomorfológico do TVT foi estabelecido de acordo com COWELL et al. (2008).

Do fragmento AT2 incluído em parafina foram confeccionados cortes histológicos de 4µm, estes distendidos sobre lâminas histológicas e corados por Hematoxilina e Eosina (HE). A avaliação histomorfológica do TVT seguiu os critérios de SANTOS et al. (2008).

As análises citopatológica e histopatológica também foram empregadas para a classificação do padrão morfológico predominante em cada amostra de TVT e seguiram os critérios propostos por FLORÉZ et al. (2012) (Quadro 1).

QUADRO 1 - Classificação do padrão morfológico predominante no TVT

Tipo	Características
Linfocitoide	Predomínio de 60% ou mais de células de TVT com morfologia arredondada, citoplasma escasso, finamente granular e vacúolos na periferia da célula. Núcleo redondo, cromatina grosseira e um ou dois nucléolos proeminentes
Plasmocitoide	Predomínio de 60% ou mais de células de TVT com morfologia ovoide, citoplasma abundante (menor relação núcleo: citoplasma). Núcleo localizado excentricamente
Misto	Padrão composto por células do subtipo linfocitoide e do plasmocitoide, sendo que, nenhum padrão ultrapassa o percentual de 59% de células do TVT

Fonte: FLORÉZ et al. (2012)

As análises microscópicas foram realizadas às cegas e por dois observadores. Inicialmente as lâminas foram observadas em objetiva de menor aumento, 5x, para a verificação da celularidade da amostra e do padrão de coloração, seguindo-se aos aumentos de 100x, 250x e 400x, para verificação das particularidades morfológicas das células do TVT.

Índice apoptótico

O índice apoptótico do TVT foi avaliado nos cortes histológicos corados em HE, conforme metodologia adaptada de GONZALEZ et al. (2000). O parâmetro foi estimado segundo os escores em discreto, moderado ou acentuado, a partir da avaliação total de cada amostra de TVT, em aumento de 400x. Foram considerados corpos apoptóticos as células com morfologia colapsada, cromatina condensada e separada das células adjacentes por um halo pericelular.

Análise imunoistoquímica do TVT

As amostras destinadas à análise imunoistoquímica foram submetidas à técnica de microarranjo tecidual (TMA), de acordo com as descrições de KONONEN et al. (1998) e BUBENDORF et al. (2001). Ainda à avaliação histopatológica foram selecionadas diferentes áreas de cada tumor (cores de 1.0mm de diâmetro), estas identificadas e extraídas dos respectivos blocos de parafina doadores e inseridas em bloco receptor de TMA, com o auxílio do equipamento *Tissue Microarrayer* (Beencher Instruments®, Silver Spring, USA). Do bloco de TMA foram obtidos três cortes histológicos de 3µm, estes distendidos sobre lâminas silanizadas (Starfrost White, Sakura Adhesion, Germany - Dako 9545-1) e mantidos a 37^{o}C por 24 horas. Dos três cortes confeccionados, um foi corado por HE e os demais submetidos à técnica de imunoistoquímica para os anticorpos anti-C-MYC, anti-p53, anti-p21 e anti-p27.

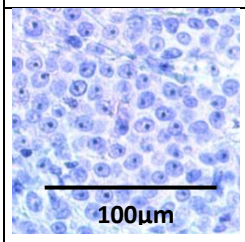
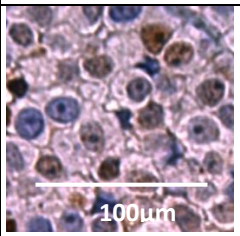
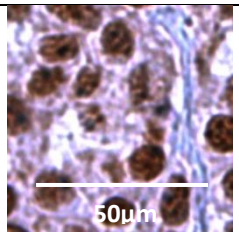
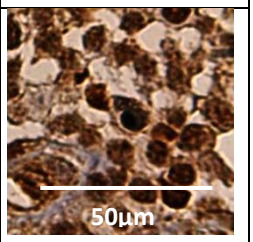
Para as reações imunoistoquímicas seguiram-se as etapas de desparafinização, reidratação e lavagem em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em solução tampão citrato 10mM pH6.0, em panela de pressão (Solar, Rapid Express, Tramontina), por três minutos. Após arrefecimento de 20 minutos, os cortes foram lavados em água destilada e submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena por imersão em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP), com quatro trocas de cinco minutos cada, e lavagem em solução salina tamponada com fosfatos 10mM pH7.4 (PBS - *phosphate buffered saline*), por cinco minutos. Marcações inespecíficas foram bloqueadas pela incubação dos cortes em solução *Protein Block* (Leica RE7158), por cinco minutos e em temperatura ambiente.

Sequencialmente, os cortes foram incubados por 30 minutos a 37^{o}C e por mais 18 horas a 4^{o}C, em câmara úmida, com os anticorpos monoclonal *mouse anti-human* C-MYC Ab-2, clone 9E10.3 (Thermo Fisher Scientific Neomarkes, MS-139-P0), diluído a 1:50; monoclonal *mouse anti-human* p53, clone DO-7 (Dako M7001), diluído a 1:500, monoclonal *mouse anti-human* p21$^{WAF1/Cip1}$, clone SX118 (Dako M7202) diluído a 1:50; e monoclonal *mouse anti-human* p27^{Kip1}, clone SX53G8 (Dako M7203), diluído a 1:200. Solução tampão de PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NAN_3) 0,1% foi utilizada para diluir os anticorpos. Para o controle positivo das reações foram utilizadas amostras teciduais de carcinoma mamário humano (C-MYC), carcinoma de células escamosas canino (p-53) e carcinoma de cólon humano (p-21 e p-27). Para o controle negativo das reações foi utilizada solução tampão PBS 10mM pH7,4 em substituição aos anticorpos primários.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução tampão PBS, com três trocas de três minutos cada, e incubadas por 30 minutos a 37°C em *Post Primary Block* (NovoLink Max Polymer RE7260-K, Reino Unido), seguida de lavagem com solução tampão PBS e incubadas em *Novolink Polymer*, por 30 minutos a 37^{o}C. Para visualização da reação, os cortes foram submersos em solução de diaminobenzidina - DAB (100mg de 3,3`Diaminobenzidine Tetrahydrichloride, Sigma, D-5637, EUA), 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 1mL de H_2O_2 (20 volumes) a 6% e 100mL de tampão PBS, por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Ato contínuo, os cortes foram lavados em água corrente e destilada durante três minutos, contracorados com hematoxilina de Harris por um minuto, lavados, diafanizados e montados com lamínula e resina sintética (Entellan, Merck, 1.07961, Alemanha).

Em microscópio óptico, as lâminas de TMA foram avaliadas quanto à imunomarcação, seguindo a análise da intensidade (I) de marcação conforme os escores (I0) ausente, (I1) discreto, (I2) moderado e (I3) acentuado (Quadro 2). Também foi avaliado o percentual (C) de células imunomarcadas em cada padrão morfológico do TVT, buscando verificar correlação entre as proteínas C-MYC e p53, seguida da análise de correlação entre C-MYC e p21/p27, e entre p53 e p21/p27. Para tal, foram considerados os escores (C0) ausência de células imunomarcadas, (C1) imunomarcação de 1-25%, (C2) de 26-50%, (C3) de 51-75% e (C4) de 76-100%.

QUADRO 2 - Escores de intensidade de coloração atribuídos à análise da marcação dos anticorpos C-MYC,p53, $p21^{WAF1/Cip1}$ e $p27^{Kip1}$ no TVT canino

Escore				
	Ausente (I0)	Discreta (I1)	Moderada (I2)	Acentuada (I3)
Tonalidade de marcação				

Extração do DNA e reação de polimerização em cadeia (PCR)

A extração do DNA genômico das amostras positivas e do controle negativo do TVT, bem como a análise para a identificação molecular foram realizadas de acordo com as descrições de AMARIGLIO et al. (1991), LIAO et al. (2003) e FONSECA et al. (2012). As amostras permaneceram armazenadas por período que variou entre dez a 12 meses precedentes à época do ensaio.

Procedeu-se a desintegração do fragmento neoplásico, por maceração, até a obtenção de uma solução homogênea. Seguiu-se a extração do DNA das amostras de TVT e da amostra de mastocitoma utilizando kit comercial *Illustra Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare, EUA). Para a obtenção do DNA do sangue total foi utilizado o kit comercial *PAX Gene Blood DNA* (PreAnalytix - A Qiagen, Suíça), sendo os procedimentos de extração gênica realizados conforme instruções dos fabricantes.

Para avaliar a integridade, o DNA obtido este foi corado com 0,3µg/mL de brometo de etídeo e submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Em seguida, a reação foi visualizada e fotografada sob luz ultravioleta no aparelho de fotodocumentação *Eagle Eye II Stratagene*. A concentração e a qualidade das amostras de DNA foram determinadas por espectrofotometria (Espectrofotômetro NanoDrop® ND-2000 Spectrophotometer - Thermo, EUA).

Com os dados referentes à concentração do DNA presente nas amostras neoplásicas, o material genético foi diluído à concentração final de 10ng/mL. Sequencialmente, as amostras foram avaliadas quanto à presença do rearranjo molecular do elemento LINE-1 no gene *C-MYC*, por meio da técnica de PCR. Para

tal, foram utilizados os *primers*: MYC.S (5'-ATG CAC CAA GAT TTT CTT CAC TGC-3'); LINE.A (5'-ATC CTA GAG AAG AAC ACA GGC AAC AC-3'); HBGA.S (5'-CGG TAT TTG GAG GTC AGC AC-3') e HGBA.A (5'-CCC ACC ACC AAG ACC TAC TT-3'). A reação obtida pelos *primers* HBGA.S e HGBA.A, que amplificava um segmento de 480pb do gene da hemoglobina humana, compôs o controle interno positivo da PCR. As sequências dos *primers* foram obtidas do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2010) e sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT, Integrated DNA Technologies, EUA).

A reação foi composta por diferentes elementos e concentrações, sendo 0,2µM de cada *primer*, 0,2mM de solução de dNTPs, tampão *Taq* DNA polimerase para uma concentração final de 1X, 2U de *Taq* DNA polimerase, cloreto de magnésio em concentração ótima para cada par de *primer* e aproximadamente 10ng de DNA genômico, como molde e H_2O_2 suficiente para perfazer volume total final de 25µL.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador *Swift MaxPro SWT* (ESCO MICRO Pte LTD), programado para executar protocolo sequencial composto por um ciclo de desnaturação a 94^{o}C por um minuto. Sequencialmente foram programados 35 ciclos para cada uma das reações a seguir: desnaturação da molécula de DNA a 94°C por um minuto, hibridização a uma temperatura ideal para cada par de oligonucleotídeos por 40 segundos, e extensão a 72 °C por um minuto.

Finalizado o procedimento da PCR, o gel foi corado com 0,3µg/mL de brometo de etídeo e analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, a reação foi visualizada e fotografada sob luz ultravioleta no aparelho de fotodocumentação *Eagle Eye II Stratagene*.

Análise Estatística

Os dados relativos ao diagnóstico, a classificação morfológica, a identificação do elemento LINE-1 no gene *C-MYC*, a expressão e a intensidade de imunomarcação de C-MYC, p53, p21 e p27 foram analisados descritivamente.

Para a análise de correlação do percentual de imunomarcação entre as proteínas C-MYC e p53, bem como entre C-MYC, p21 e p27 e entre p53, p21 e p27 foi aplicado o teste não paramétrico de Spearmann. Para a avaliação dos dados foi

utilizado o programa computacional Sigma Stat - Windows versão 2.0. Considerou-se para o experimento um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS

As análises citopatológica e histopatológica foram consideradas para a confirmação diagnóstica e para classificação dos padrões morfológicos do TVT. A análise citopatológica proporcionou melhor caracterização do tipo celular, com menor distorção da imagem quando comparada à histopatológica (Figura 1). Por isso, o padrão morfológico predominante do TVT (Figura 2) foi estabelecido à análise citopatológica, sendo observada predominância do tipo plasmocitoide, com nove (45%) casos do total das amostras analisadas. O segundo tipo mais comum foi o linfocitoide, observado em seis (30%) casos, seguido do tipo misto, em cinco (25%) do total de tecidos examinados.

O índice apoptótico do TVT foi discreto em 100% das amostras avaliadas.

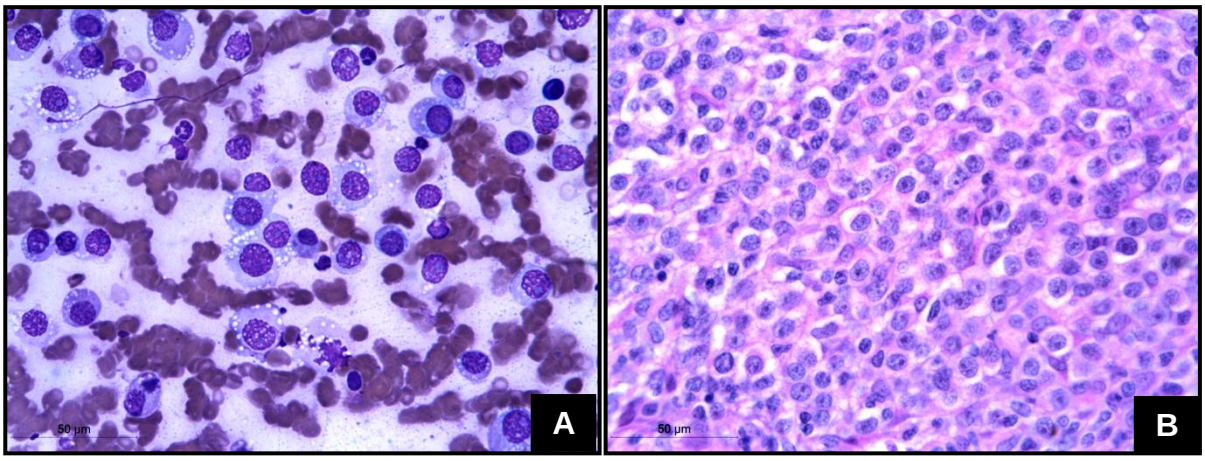


FIGURA 1 - Fotomicrografias de células de TVT canino. (A) amostra citolpatológica corada com Giemsa. (B) amostra histopatológica corada com HE. 400x

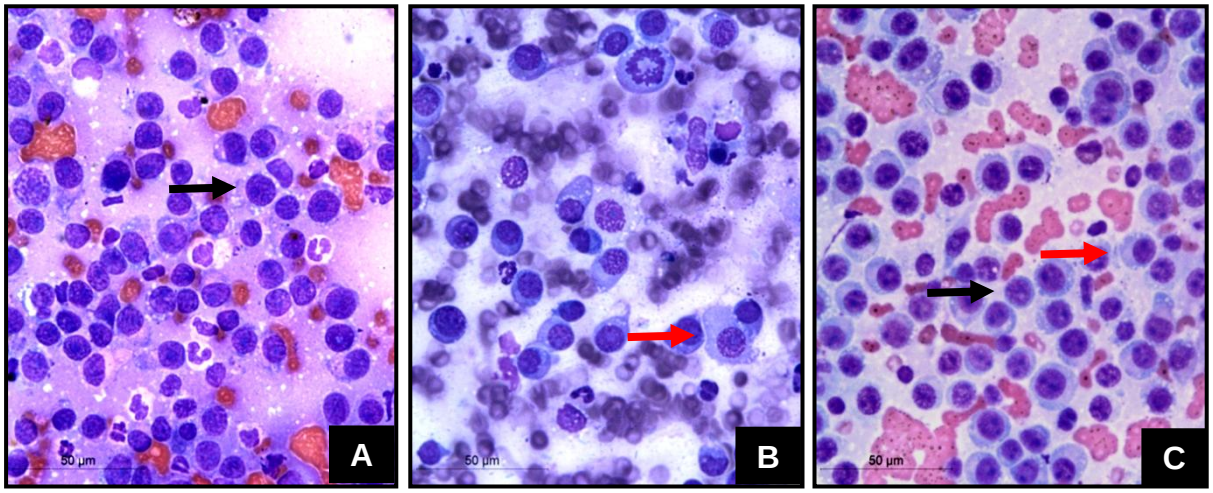


FIGURA 2 - Fotomicrografias dos padrões morfológicos de células de TVT canino ao exame citopatológico. A) Padrão linfocitoide. Células redondas, com núcleo grande e citoplasma escasso, semelhantes a linfócitos (seta preta). B) Padrão plasmocitoide. Células com citoplasma mais abundante e núcleo excêntrico, com menor relação núcleo/citoplasma (seta vermelha). C) Padrão misto. Células de morfologia linfocitoide (seta preta) e plasmocitoide (seta vermelha). Giemsa, 400x

Na Figura 3 consta a identificação do rearranjo molecular do elemento LINE-1 no gene *C-MYC,* utilizada para o diagnóstico complementar do TVT. O DNA genômico da neoplasia transmissível canina, colunas um a 19, amplificou um fragmento de aproximadamente 340pb, que caracteriza o rearranjo molecular LINE-1/*C-MYC*, e um segundo fragmento com peso molecular aproximado de 480pb, do gene da hemoglobina humana, que representa o controle interno positivo da reação.

As colunas 20, 21, 22 e 23 representam o grupo controle negativo. A amplificação de um segmento do DNA genômico do mastocitoma, segundo tipo neoplásico considerado no estudo, está representada na coluna 20. Apenas o fragmento de aproximadamente 480pb foi amplificado, com ausência total de amplificação referente à banda de 340pb (seta azul claro).

As colunas 21 e 22 referem-se à análise da amplificação do DNA das amostras de sangue total de cães saudáveis. A coluna 21 representa ausência de amplificação do rearranjo LINE1/*C-MYC* (seta amarela). A coluna 22 evidencia reação entre as amostras de sangue e o gene da hemoglobina humana (seta vermelha). A coluna 23 (seta verde) representa o controle interno negativo da PCR, com ausência total de amplificação, em virtude da ausência de DNA.

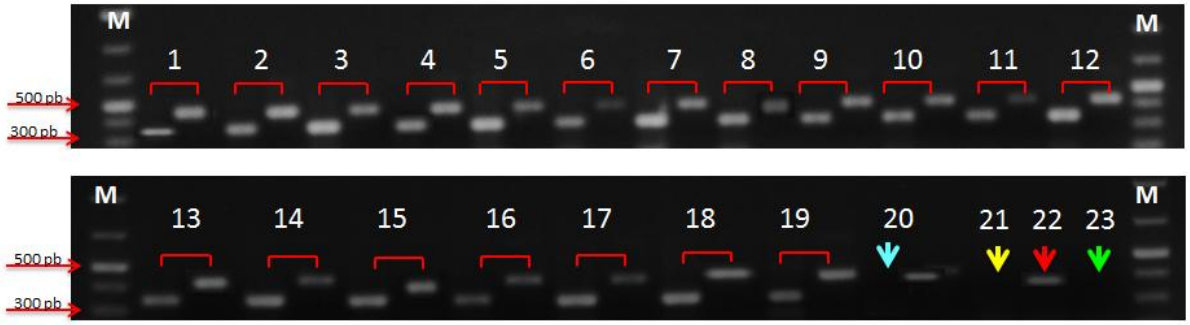


FIGURA 3 - Diagnóstico molecular do tumor venéreo transmissível canino (TVT) por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR). A eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,3µg/mL de brometo de etídeo ilustra o perfil característico do DNA genômico no TVT relativo ao rearranjo LINE1/*C-MYC*. A coluna M representa o marcador de massa molecular Gene Ruler 1kb Plus. As colunas de um a 19 demonstram o produto da amplificação a partir do DNA genômico do TVT para o fragmento de aproximadamente 340pb que caracteriza a inserção do elemento LINE-1 no gene *C-MYC* e para o fragmento de aproximadamente 480pb que caracteriza o controle interno positivo da reação. A coluna 20 demonstra a amplificação do DNA genômico do mastocitoma, amplificando apenas o fragmento de 480pb, representado com seta azul claro. As colunas 21 e 22 representam a amplificação do DNA em amostras de sangue total de cães saudáveis, com ausência de amplificação para o rearranjo LINE-1/*C-MYC* e presença de reação para o gene da hemoglobina humana, marcadas com as setas em amarelo e vermelho, respectivamente. A coluna 23, seta verde, representa o controle interno negativo da PCR (ausência de DNA) em que se observa ausência total de amplificação

À análise imunoistoquímica observou-se marcação para as proteínas C-MYC, p53, p21 e p27 em 100% das amostras, independente do padrão morfológico do TVT (Figura 4). Entretanto, foi observada variação na imunomarcação quando aplicados os escores de intensidade para os tipos linfocitoide, plasmocitoide e misto. Para a proteína C-MYC verificaram-se os escores I2 e I3 no tipo linfocitoide, sem predominância de nenhum desses. Já nos padrões plasmocitoide e misto houve predominância do escore I3. Para a p53 observaram-se os escores I1, I2 e I3 no tipo linfocitoide, também sem predominância de qualquer escore. Já no plasmocitoide o escore predominante foi o I2, seguido de I3 e I1, respectivamente, e, no misto, a marcação foi escore I3 em todas as amostras. A intensidade de p21 nos tipos linfocitoide e plasmocitoide foi predominantemente escore I3, seguida por I2 e I1, enquanto no tipo misto o escore foi I3. Quanto à p27, a intensidade foi I2 e I3 no tipo linfocitoide e I3 nos tipos plasmocitoide e misto.

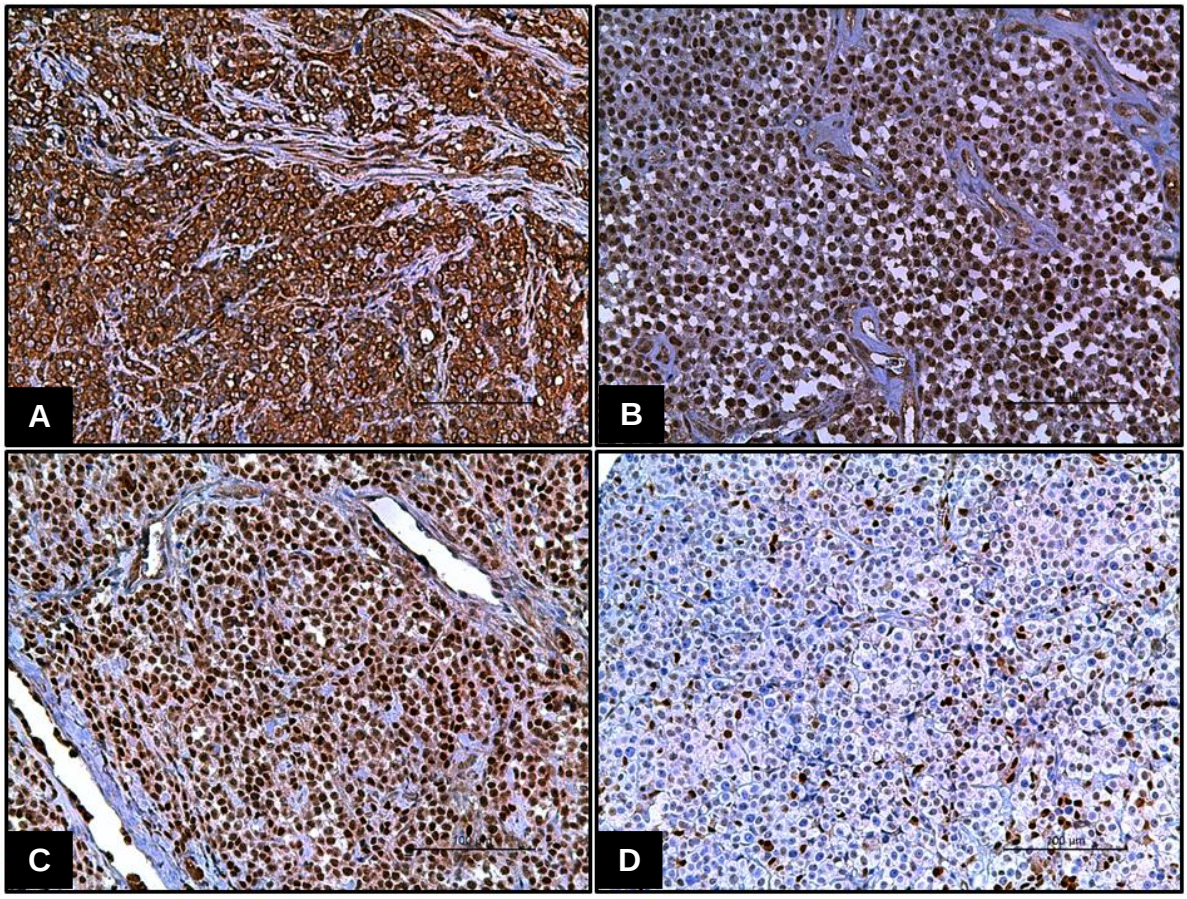


FIGURA 4 - Fotomicrografias de reações imunistoquímicas no TVT canino. A) C-MYC. Marcação citoplasmática nos escores I3 e C4 para intensidade de marcação e percentual de células marcadas. B) p53. Marcação nuclear nos escores I3 e C4 para intensidade de marcação e percentual de células marcadas. C) p21. Marcação nuclear nos escores I2 e C4 para intensidade de marcação e percentual de células marcadas. D) p27. Marcação nuclear nos escores I2 e C1 para intensidade de marcação e percentual de células marcadas. IHC, 250x

Quanto ao percentual de imunomarcação de cada proteína nos padrões morfológicos do TVT constatou-se expressão máxima (C4) de C-MYC e p53 nos tipos linfocitoide, plasmocitoide e misto. Para p21 verificou-se predominância do escore C2, seguido de C3 e C4, tanto para o tipo linfocitoide quanto para o plasmocitoide. Já no tipo misto, houve predomínio de C2, seguido de C3. Em relação à p27, constataram-se os escores C2, seguido de C3 e C1 no tipo linfocitoide. Já no plasmocitoide, houve predominância de C1, seguido de C2 e C3, enquanto que no misto observou-se o escore C3, seguido de C2.

Na análise de correlação constatou-se a existência de correlação do percentual de células imunomarcadas entre as proteínas C-MYC e p53 ($p>0,05$)

para todos os padrões morfológicos do TVT (Tabela 1). Já os resultados das análises de correlação entre as proteínas C-MYC, p21 e p27 e entre p53, p21 e p27 são apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente, e demonstram correlação (p>0,05) para a maioria das proteínas consideradas, exceto na análise entre p53, p21 e p27 com morfologia plasmocitoide (Tabela 3).

TABELA 1 - Correlação entre as proteínas C-MYC e p53 nos padrões morfológicos linfocitoide, plasmocitoide e misto do TVT canino

r/p	Proteínas e padrões morfológicos do TVT		
	C-MYC (L) x p53 (L)	C-MYC (P) x p53 (P)	C-MYC (M) x p53(M)
r	0,99	0,98	1,00
p	0,01	0,02	0,00

r ≤0,30 = baixa magnitude; r de 0,30 a 0,60 = moderada magnitude; r ≥0,61 = forte magnitude. **r:** coeficiente de correlação; **p:** nível de significância; **L:** linfocitoide; **P:** plasmocitoide; **M:** misto.

TABELA 2 - Correlação entre a proteína C-MYC e as proteínas p21 e p27 nos padrões morfológicos linfocitoide, plasmocitoide e misto do TVT canino

C-MYC (L)	r	p	C-MYC (P)	r	p	C-MYC (M)	r	p
p21 (L)	0,98	0,02	**p21 (P)**	0,96	0,04	**p21 (M)**	0,99	0,01
p27 (L)	0,98	0,02	**p27 (P)**	0,95	0,05	**p27 (M)**	0,99	0,01

r ≤0,30 = baixa magnitude; r de 0,30 a 0,60 = moderada magnitude; r ≥0,61 = forte magnitude. **r:** coeficiente de correlação; **p:** nível de significância; **L:** linfocitoide; **P:** plasmocitoide; **M:** misto.

TABELA 3 - Correlação entre a proteína p53 e as proteínas p21 e p27 nos padrões morfológicos linfocitoide, plasmocitoide e misto do TVT canino

p53 (L)	r	p	p53 (P)	r	p	p53 (M)	r	p
p21 (L)	0,95	0,05	**p21 (P)**	0,92	**0,08**	**p21 (M)**	0,99	0,01
p27 (L)	0,99	0,01	**p27 (P)**	0,92	**0,08**	**p27 (M)**	0,99	0,01

r ≤0,30 = baixa magnitude; r de 0,30 a 0,60 = moderada magnitude; r ≥0,61 = forte magnitude. **r:** coeficiente de correlação; **p:** nível de significância; **L:** linfocitoide; **P:** plasmocitoide; **M:** misto.

4 DISCUSSÃO

Quanto à comparação das técnicas utilizadas para o diagnóstico microscópico do TVT verificou-se melhor caracterização do tipo celular neoplásico, com menor distorção da imagem à análise citopatológica em relação à histopatológica. Nesse sentido, AMARAL et al. (2004) fizeram observações semelhantes em estudo comparativo de diferentes métodos diagnósticos do TVT. Também ERÜNAL-MARAL et al. (2000) descreveram que a técnica citológica deve ser o método eletivo quando da suspeita de TVT, já que confere melhor definição da morfologia celular em relação às amostras fixadas em formaldeído, além de compreender técnica simples, minimamente invasiva e indolor. Adicionalmente, destaca-se a confiabilidade diagnóstica mediante a aplicação da técnica, que permitiu o diagnóstico definitivo em 100% das amostras deste estudo, o que também está de acordo com GUEDES et al. (2000).

Considerando essas características, optou-se por avaliar o padrão morfológico predominante do TVT ao exame citopatológico, sendo considerados os padrões linfocitoide, plasmocitoide e misto. Ressalte-se que a classificação morfológica do TVT compreende proposta recente e pautada em relatos científicos acerca da presença de tipos celulares e comportamentos biológicos distintos em diferentes amostras da neoplasia (AMARAL et al., 2007; FLORÉZ et al., 2012).

Nesta pesquisa, o tipo plasmocitoide ocorreu com maior frequência, seguido dos tipos linfocitoide e misto, respectivamente. Resultados semelhantes foram descritos por AMARAL et al. (2007) e GASPAR et al. (2010), que verificaram maior ocorrência do padrão plasmocitoide nas amostras genitais e também nas extragenitais primárias ou metastáticas.

Para o diagnóstico molecular do TVT foi utilizada a técnica de PCR conforme preconizado por AMARIGLIO et al. (1991), LIAO et al. (2003), SPIN et al. (2010) e FONSECA et al. (2012). Embora a literatura não discorra de forma sistemática quanto aos fatores temperatura e tempo ideais para o armazenamento do TVT, SPIN et al. (2010) mencionaram que nove meses precedentes à época da manipulação seria período ideal para a estocagem desse tipo neoplásico. No entanto, na presente pesquisa empregou-se temperatura de congelamento de -20^{o}C e tempo de armazenamento entre dez e 12 meses, respectivamente, e não foram constatadas alterações em relação à qualidade das amostras, fato confirmado pela

integridade da molécula de DNA à eletroforese, e ainda pela mensuração da concentração e da qualidade do material genético em espectrofotometria.

Os resultados da PCR comprovam a alta sensibilidade do teste para a detecção do rearranjo do elemento LINE-1 no gene *C-MYC* no TVT, já que todas as amostras da neoplasia transmissível estudada amplificaram um fragmento de aproximadamente 340pb, que caracteriza o referido rearranjo, corroborando as observações de KATZIR et al. (1985), MURGIA et al. (2006), PARK et al. (2006) e O'NEILL (2011). Destaque-se que nas demais amostras consideradas neste estudo não houve amplificação.

Apesar de AMARIGLIO et al. (1991) e SPIN et al. (2010) confirmarem que essa alteração é característica do TVT em comparação a análise desse mesmo rearranjo no sangue de animais saudáveis, não mencionaram se tal ocorrência é específica desse tipo neoplásico. Entretanto, a ausência do rearranjo molecular LINE-1/*C-MYC* em amostra de mastocitoma canino deste estudo sugere que tal alteração molecular seja específica para o TVT.

Os primers MYC.S e LINE.A confeccionados para esta pesquisa foram específicos para a identificação da amplificação de um fragmento de DNA contendo aproximadamente 340pb, estando de acordo com a metodologia de SPIN et al. (2010) e FONSECA et al. (2012). No entanto, diferiu dos resultados apresentados por CHU et al. (2001), CHOI & KIM (2002), LIAO et al. (2003) e PARK et al. (2006), que identificaram uma amplificação de 550pb responsável pela formação do rearranjo LINE-1/*C-MYC* no TVT. Visto que o elemento LINE-1 possui uma sequência de 1.378pb inserida no gene *C-MYC*, as diferenças nas amplificações justificam-se em virtude da utilização de *primers* que configuram diferentes regiões gênicas desse rearranjo (MURCHISON, 2009).

Em relação à técnica de processamento das amostras destinadas à análise imunoistoquímica, TMA, apesar de ANDRADE et al. (2007) fazerem referência acerca da preocupação da reduzida área das amostras na representatividade de achados importantes e decisivos, neste estudo tal método permitiu a análise dos diferentes marcadores, com menor custo, maior agilidade, sem, contudo, interferir na precisão dos resultados.

Considerando o critério intensidade de imunomarcação, em que se avalia a fração da área celular marcada (KLEIN et al., 2001; MATOS et al., 2006), é

possível afirmar que as proteínas C-MYC, p53, p21 e p27 estão em todas as amostras de TVT. Nesse contexto, apesar da variação de intensidade de imunomarcação entre as proteínas, esta foi sutil entre os diferentes padrões morfológicos do TVT.

Por outro lado, a quantificação da imunomarcação, dada pela análise do percentual celular marcado em relação ao total de células da amostra, permite conhecer o nível de acúmulo tecidual dessas proteínas e avaliar as interações entre as mesmas. Possibilita ainda, indiretamente, reconhecer possíveis mecanismos envolvidos no crescimento e na progressão da neoplasia. MATOS et al. (2006) e TROMPIERI-SILVEIRA et al. (2009) também adotaram o parâmetro percentual de imunomarcação para quantificar células imunomarcadas para diferentes proteínas. Nesse sentido, TROMPIERI-SILVA et al. (2009), considerando o percentual de células marcadas, compararam a variação da imunomarcação do anticorpo anti-CD3 entre as fases de progressão e regressão do TVT, e verificaram diferenças na quantidade de linfócitos T nas referidas fases.

A superexpressão da proteína C-MYC em todos os tipos morfológicos do TVT, representada pelo escore C4 de percentual de células marcadas, pode ser atribuída à ocorrência de mutação do gene *C-MYC*, em princípio, pela ocorrência do rearranjo molecular comprovado à técnica de PCR. De acordo com FARIA & RABENHORTS (2006), células diferenciadas expressam baixos níveis de C-MYC, em virtude de sua meia vida curta. Assim, sugere-se que a alteração no gene *C-MYC* implique na síntese de proteína alterada, com redução ou ausência de função da mesma e acúmulo no tecido neoplásico. Essa mutação proteica auxiliaria a manutenção do crescimento celular e a progressão tumoral, visto que a C-MYC, quando funcional, atua na integridade tecidual por indução da apoptose celular a partir de diferentes vias pró-apoptóticas, incluindo a ativação indireta das proteínas BAX e p53, bem como da ligação com o receptor CD95/FAZ. Paralelamente, em condições normais, a C-MYC atua na proliferação celular, via inibição da transcrição de p21 e p27, porém, seu estímulo cessa quando o processo é completado, a fim de evitar o estímulo contínuo e a consequente proliferação celular desordenada (PELENGARIS et al., 2002; FARIA & RABENHORST, 2006).

A proteína p53 apresentou comportamento semelhante ao da C-MYC, com superexpressão (C4) em todos os padrões morfológicos do TVT. VÁSQUEZ-

MOTA et al. (2008) e SÁNCHEZ-SERVÍN et al. (2009) demonstraram polimorfismos em diferentes sítios do gene P53 em amostras de TVT. Nesse contexto, apesar da análise molecular do P53 não ter sido aplicada nesta pesquisa, acredita-se que possíveis mutações gênicas representem a causa das modificações na conformação da proteína, levando ao aumento de sua meia-vida, eventual perda de função e acúmulo nas células, conforme descrito por CALAZANS et al. (2010) e LIMA et al. (2012a). Da mesma forma, SANTOS et al. (2008) e MORO et al. (2010), ao investigar o comprometimento funcional da proteína p53 por imunoistoquímica, sugeriram que o padrão de imunomarcação encontrado indica anormalidade funcional no P53 e na proteína formada a partir da transcrição do gene anormal, muito embora não tenham conseguido correlacionar o percentual das células marcadas ao prognóstico do TVT.

As análises de correlação entre as proteínas C-MYC e p53 foram realizadas com vistas a investigar a interação entre as mesmas, potencialmente alteradas, e a capacidade de inativação ou expressão, respectivamente, das proteínas supressoras tumorais p21 e p27, nos diferentes tipos celulares de TVT.

A relação entre C-MYC e p53, conforme descrito por PELENGARIS et al. (2002) e STOCKMANN et al. (2011), associa-se a indução de vias relacionadas a apoptose celular. Embora a análise estatística tenha confirmado a correlação, não foram encontradas, neste estudo, alterações morfológicas que pudessem caracterizar a apoptose. Esse fato sustenta a hipótese de disfunção das proteínas C-MYC e p53, com consequente manutenção do crescimento celular e progressão do TVT. Apesar da descrição de apoptose no TVT (MORO et al., 2010), não foram encontradas informações acerca do comprometimento do mecanismo apoptótico relacionado a disfunção na proteína C-MYC. De outra parte, SANTOS et al. (2008) estudaram a apoptose no TVT pela avaliação da integridade da p53 em tumores experimentalmente transplantados e verificaram que durante a regressão tumoral a expressão de p53 foi maior em relação à fase de progressão. Os autores explicam ainda que a maior expressão esteve relacionada a apoptose das células neoplásicas. Em contrapartida, considerando os achados deste estudo, é possível que as funções proteicas apresentem comportamentos distintos nos tumores experimentalmente transplantados e naqueles naturalmente adquiridos. Isso sugere que os de ocorrência natural apresentam maior potencial agressivo, visto que

nesses casos há bloqueio do sistema imune pelo fenômeno do imunoestágio e as células tumorais permanecem por mais tempo na fase de progressão, podendo até mesmo evoluir à metástase (DUNN et al., 2004; LIMA et al., 2012b).

A funcionalidade da C-MYC também foi mensurada a partir da avaliação de sua correlação com as proteínas p21 e p27. A importância dessa correlação justifica-se em virtude do impacto que C-MYC desempenha no controle da progressão continuada do ciclo celular, conforme mencionado por LUTZ et al. (2002), via inativação funcional das proteínas p21 e p27, que atuam no bloqueio da progressão do ciclo celular via inibição das quinases dependentes de ciclinas. A correlação entre as proteínas C-MYC, p21 e p27, observada neste estudo, permite sugerir que as alterações no conjunto gene/proteína C-MYC possa prejudicar o mecanismo de inibição das proteínas supressoras tumorais p21 e p27, mantendo o crescimento das células tumorais e a progressão da neoplasia de forma contínua e desordenada. Entretanto, não foram encontradas quaisquer informações que discordem ou corroborem essa hipótese.

Ainda, a correlação entre as proteínas p53, p21 e p27 pode ter contribuído no perfil de imunomarcação dessas duas últimas no tecido neoplásico. Entretanto, apesar da presença dessas proteínas supressoras tumorais, não houve bloqueio ao crescimento das células neoplásicas. Nesse sentido, especula-se que o crescimento celular também possa estar relacionado a um mecanismo intrínseco que as células neoplásicas desenvolvem, mediado por C-MYC, para a proliferação desordenada, ficando essas células responsivas a novos estímulos, seja de crescimento ou bloqueio do ciclo celular, conforme relatado por ALBORAN et al.(2001). Acrescente-se que, considerando o acúmulo tecidual, a funcionalidade das proteínas p21 e p27 também pode estar comprometida nas amostras de TVT.

De outra parte, a ausência de correlação evidenciada entre as proteínas p53 e p21 no tipo plasmocitoide do TVT, permite inferir maior tendência a progressão das células neoplásicas, em virtude da ausência de bloqueio do ciclo celular induzida por essa via molecular. Estudos de BASSANI-SILVA et al. (2007), GASPAR et al. (2010) e AMARAL et al. (2012) fazem referência a maior agressividade do tipo plasmocitoide do TVT em estudos verificando a resposta terapêutica, a resistência à glicoproteína p e a maior concentração de lesões à molécula de DNA, respectivamente. Dessa forma, sugere-se que no padrão

morfológico plasmocitoide as alterações moleculares e proteicas são mais expressivas, culminando em interrupção da via de indução de p21 mediada por p53.

5 CONCLUSÕES

As diferenças morfológicas do TVT permitem classificar a neoplasia quanto ao tipo celular predominante em linfocitoide, plasmocitoide ou misto.

A inserção do elemento LINE1 no gene *C-MYC* caracteriza alteração molecular específica para o TVT canino, sendo o protocolo utilizado satisfatório e seguro para manter a integridade do material genético da neoplasia. Ainda, a avaliação desse rearranjo molecular pode ser útil ao diagnóstico complementar em casos de TVT indiferenciado.

A superexpressão tecidual e a correlação entre as proteínas C-MYC, p53, p21 e p27 indicam redução e/ou perda de funcionalidade das mesmas no microambiente do TVT, com consequente supressão apoptótica, manutenção do crescimento celular e progressão da neoplasia.

6 REFERÊNCIAS

1 ALBORAN, I.M.; O'HAGAN, R.C.; GARTNER, F.; MALYNN, B.; DAVIDSON, L.; RICKERT, R.; RAJEWSKY, K.; DEPINHO, R.A.; ALT, F.W. Analysis of *C-MYC* function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. **Immunity**, Cambridge, v.14, p.45-55, jan. 2001.

2 AMARAL, A.V.C.; OLIVEIRA, R.F.; SILVA, A.P.S. M.; BAYLÃO, M.L.; LUZ, L.C.; SANT'ANA, F.J.F. Tumor Venéreo Transmissível Intra-Ocular em Cão: Relato de Caso. **Veterinária e Zootecnia**, Garça, v.19, n.1, p.79-85, mar. 2012.

3 AMARAL, S.A.; BASSANI-SILVA, S.; FERREIRA, I.; FONSECA, S.L.; ANDRADE, E.H.F.; GASPAR, J.F.L.; ROCHA, S.N. Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.102, p.253-260, 2007.

4 AMARAL, S.A.; GASPAR, L.F.J.; BASSANI-SILVA, S.; ROCHA, N.S. Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.99, n.551, p.167-171, 2004.

5 AMARIGLIO, E.N.; HAKIM, I.; BROK-SIMONI, F.; GROSSMAN, Z.; KATZIR, N.; HARMELIN, A.; RAMOT, B.; RECHAVI, G. Identity of rearranged LINE/*C-MYC* junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington, v.88, p.8136-8139, set. 1991.

6 ANDRADE, V.P.; CUNHA, I.W.; SILVA, E.M.; AYALA, F.; SATO, Y. Tissue microarrays: high throughput and low cost avaiable for pathologists. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.43, n.1, p.55-60, fev. 2007.

7 BASSANI-SILVA, S.; SFORCIN, J.S.; AMARAL, A.S.; GASPAR, L.F.; ROCHA, N.S. Propolis effect in vitro on canine transmissible venereal tumor cells. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.102, p. 261-265, 2007.

8 BUBENDORF, L; NOCITO, A.; MOCH, H.; SAUTER, G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **Journal of Pathology**, Sussex, v.195, p.72-79, 2001.

9 BUCHWALOW, I.B.; BOCKER, W. **Immuno-histochemistry:** basic and methods. New York: Springer, 2010. 149p.

10 CALAZANS, S.G.; RODIGHERI, S.M.; FERNANDES, S.C.; AMORIM, R.L.; SEQUEIRA, J.L.; APPARECIDA, J. Imunorreatividade da p53 associada à ausência de mutações no gene P53 em linfomas caninos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.6, p.1444-1447, jun. 2010.

11 CHOI, Y.K.; KIM, C.J. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 gene in canine transmissible venereal tumor. **Journal of Veterinary Science,** Suwon, v.3, p.285-292, 2002.

12 CHU, R.M.; SUN, T.J.; YANG, H.Y.; WANG, D.G.; LIAO, K.W.; CHUANG, T.F.; LIN, C.H.; LEE, W.C. Heat shock proteins in canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, New York, v.82, p.9-21, 2001.

13 COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; KOTH, J.H.M.; DENICOLA, D.B**. Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat.** 3.ed. Canada: Mosby Elsevier, 2008. 475p.

14 DUNN, G.P.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. The three Es of cancer immunoediting. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.22, p.329-360, 2004.

15 ERÜNAL-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 Tierarztliesh Wochenschrift**, Hannover, v.107, n.5, p.175-180, 2000.

16 FARIA, M.H.G.; RABENHORST, S.H.B. Impacto do oncogene *C-MYC* no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v.52, n.2, p.165-171, 2006.

17 FLORÉZ, M.M.; PEDRAZA, F.; GRANDI, F.; ROCHA, N. S. Cytological subtypes of canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Clinical Pathology**, Madison, v.41, n.1, p.3-5, 2012.

18 FONSECA, L.S.; MOTA, L.S.L.S.; CORDEL, M.M.; FERREIRA, I.; BRANDÃO, C.V.S.; ROCHA, N.S. Spontaneous canine transmissible veneral tumor: association between diferente phenotypes and the insertion LINE-1/*C-MYC*. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Bogotá, v.25, n.3, p.402-408, jul/set. 2012.

19 GASPAR, L.F.J.; FERREIRA, I.; COLODEL, M.M.; BRANDÃO, C.V.S.; ROCHA, N.S. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: cell morphology and influence on P-glycoprotein expression. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,** Ankara, v.34, n.5, p.447-454, 2010.

20 GUEDES, R.M.C.; ZICA, K.G.B.; GUEDES, M.I.M.C.; OLIVEIRA, S.R. Accuracy of cytological exam for diagnosis of inflammatory and proliferative process in domestic animals. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.5, p.437-439, 2000.

21 GONZALEZ, C.M.; GRIFFEY, S.M.; NAYDAN, D.K.; FLORES, E.; CEPEDA, R.; CATTANEO, R.; MADEWELL, B.R. Canine transmisible veneral tumour: a morphological and immunoistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. **Journal of Comparative Pathology**, Endiburg, v.122, p.241-248, 2000.

22 HIRAYAMA, K.; YOKOTAY, H.; ONAI, R.; KOBAYASHIY, T.; KUMATAY, T.; KIHARA, K.; OKAMOTO, M.; SAKO, T.; NAKADEZ, T.; IZUMISAWAZ, Y.; TANIYAMA, H. Detection of Matrix Metalloproteinases in Canine Mammary Tumours: Analysis by Immunohistochemistry and Zymography. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v.127, p.249-256, 2002.

23 KATZIR, N.; RECHAVI, G.; COHEN, J.B.; UNGER, T.; SIMONI, F.; SEGAL, S.; COHEN, D.;GIVOL, D. “Retroposon” insertion into the cellular oncogene *C-MYC* in canine transmissible venereal tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.82, p.1054-1058, 1985.

24 KLEIN, M.; VIGNAUD, J.M.; HENNEQUIN, V.; TOUSSAINT, B.; BRESLER, L.; PLÉNAT, F. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Baltimore, v.86, p.656-658, 2001.

25 KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIMENI, O.P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling tumor of specimens. **Nature Medicine**, New York, v.4, n.7, p.844-847, 1998.

26 LIAO, K.W.; LIAO, K.W.; HUNG, S.W.; HSIAO, Y.W.; BENNETT, M.; CHU, R.M. Canini transmissible veneral tumor cell depletion of B limphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cell. **Vererinary Immunology and Immunophalogy**, Amsterdam, v.92, p.149-162, 2003.

27 LIMA, C.R.O.; RABELO, R.E.; VULCANI, V.A.S.; CARDOSO, L.B.; SOUSA, N.L.M.; MOURA, V.M.B.D. P53 Gene: Major mutations in neoplasias and anticancer gene therapy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.5, p.845-853, 2012a.

28 LIMA, C.R.O.; MOURA, V.M. B.D.; RABELO, R.E.; VULCANI, V.A.S.; HELRIGEL, P.A.; GUIMARÃES, M.M. Resposta imune e o papel dos linfócitos T e B no microambiente tumoral: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v.9, n.18, p.1-27, 2012b.

29 LUTZ, W.; LEON, J.; EILERS, M. Contributions of myc to tumorigenesis. **Acta Biochimica et Biophysica**, Shangai, v.1602, p.61-71, 2002.

30 MATOS, L.L.; STABENOW, E.; TAVARES, M.R.; FERRAZ, A.R.; CAPELOZZI, V.L.; SILVA, M.A. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. **Clinics**, São Paulo, v.61, n.5, p.417-424, 2006.

31 MORO, J.V.; TINUCCI-COSTA, M.; SILVEIRA, A.C.T.; GERARDI, D.G.; ALESSI, A.C. Reactivity of p53 protein canine transmissible venereal tumor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, n.2, p.318-323, abr. 2010.

32 MURCHISON, E.P. Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. **Oncogene,** Hampshire, v.27, p.19-30, 2009.

33 MURGIA, C; PRITCHARD, K. J; KIM, I. S; FASSATI, A; WEISS, A. R. Clonal Origin and Evolution of a Transmissible Cancer. **Cell**, Chicago, v.10, n.1016, p.477-487, 2006.

34 NAPOLI, C.; LERMAN, L.O.; NIGRIS, F.; SICA, V. *C-MYC* oncoprotein: a dual pathogenic role in neoplasia and cardiovascular diseases? **Neoplasia**, New York, v.4, n.3, p.185-190, 2002.

35 O'NEILL, I.D. Concise review: transmissible animal tumors as models of the cancer stem-cell process. **Cancer Stem Cells**, Wisconsin, v.29, n.12, p.1909-1914, 2011.

36 PARK, M.S.; KIM, Y.; KANG, M.S.; OH, S.Y.; CHO, D.Y.; SHIN, N.S.; KIM, D.Y. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Califórnia, v.18, n.1, p.130-133, 2006.

37 PELENGARIS, S.; KAN, M. The many faces of *C-MYC*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.416, n.2, p.129-136. ago. 2003.

38 PELENGARIS, S.; KAHN, M.; EVAN, G. I. *C-MYC*: more than just a matter of life and death. **Nature Reviews Cancer,** London, v.2, p.764-776, 2002.

39 SÁNCHEZ-SERVÍN, A.; MARTINÉZ, S.; CÓRDOVA-ALARCON, E.; FAJARDO, R. P53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor. **Journal of Veterinary Science**, Henderson, v.10, p.353-355, 2009.

40 SANTOS, F.G.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, J.E.S.; CASSALI, G.D.; PAIXÃO, T.A.; MARTINS, A.S.; SILVA, S.S.; MARTINS, R.F.; MORO, L. Apoptosis in the transplanted canine transmissible venereal tumor during growth and regression phases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.3, p.607-612, 2008.

41 SPIN, J.S.; FONSECA, L.S.; MOTA, L.S.L.S.; CASTELLI, E.C.; SILVA, S.B.; FERREIRA, I.; ROCHA, N.S. Detecção molecular do rearranjo LINE-1/*C-MYC* em tumores venéreos transmissíveis caninos espontâneos. **Clínica Veterinária,** São Paulo, v.15, n.89, nov/dez. 2010.

42 STOCKMANN, D.; FERRARI, H.F.; ANDRADE, A.L.; LOPES, R.A.; CARDOSO, T.C.; LUVIZOTTO, M.C.R. Canine transmissible venereal tumors: aspects related to programmed cell death. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, São Paulo, v.4, n.1, p.65-75, 2011.

43 TROMPIERI-SILVEIRA, A. C.; GERARDI, D.; MOURO, J.V.; COSTA, M.T.; ALESSI, A.C. Immunohistochemical expression of B and T-lymphocytes and TGF-β in experimentally transplanted canine venereal tumor. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1148-1154, 2009.

44 VÁSQUEZ-MOTA, N.; SIMON-MARTÍNEZ, J.; CÓRDOVA-ALARCON, E.; LAGUNES, L.; FAJARDO, R. The T963C Mutations of P53 Gene Does Not Participate In The Clonal Origin of Canine TVT. **Veterinary Research Communication**, Dordrecht, v.32, p.187-191, 2008.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tumor venéreo transmissível canino caracteriza uma neoplasia singular no contexto da medicina veterinária e também da medicina, em virtude da incidência da neoplasia e da propriedade que o tumor possui de ser reproduzido experimentalmente, tornando-se novo ponto de partida para o estudo da oncologia.

De outra parte, os aspectos relacionados à histogenêse e à transmissão dessa neoplasia ainda constituem grande desafio para os pesquisadores, mesmo com o significativo avanço dos últimos anos. Aliado a esses, recentemente a proposta para a classificação do TVT quanto aos padrões citomorfológicos predominantes, tem modificado o caminho das pesquisas frente a este tipo neoplásico.

Os avanços das técnicas de biologia molecular e a maior acessibilidade às metodologias propostas por essa área do conhecimento tem revolucionado o campo das pesquisas científicas, permitindo abordagens profundas em relação ao estudo dos genes e das alterações moleculares envolvidas no processo de carcinogênese. Porém, sua aplicabilidade no campo da oncologia veterinária, particularmente à neoplasia alvo deste estudo, ainda é pouco difundida. Outro ponto relevante, porém desprovido de suporte científico consistente, refere-se ao conhecimento do desempenho e das interações entre proteínas-chave envolvidas nos fenômenos biológicos do ciclo celular e da apoptose no TVT.

A coordenação e o acompanhamento das etapas experimentais, nesse estudo, proporcionaram conhecimento sistemático de múltiplos fatores. Dentre esses, os aspectos macroscópicos, as particularidades das características clínicas, o reconhecimento das estruturas celulares, as diferenças morfológicas que caracterizam os subtipos da neoplasia, a avaliação e a interpretação dos critérios microscópicos envolvidos na malignidade tumoral, bem como o conhecimento do campo da biologia molecular, que envolveu a prática de técnicas refinadas e o emprego de tecnologia de ponta.

Ao final, conclui-se que a associação entre os aspectos macroscópicos, microscópicos e moleculares configura artifício essencial para a compreensão da transformação maligna e para a adoção de medidas terapêuticas direcionadas, priorizando, sobretudo, o melhor prognóstico do paciente.

Paralelamente, os resultados deste estudo foram úteis ao esclarecimento do comportamento biológico e da relação das proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e da apoptose no TVT. No entanto, verificou-se que os aspectos clínicos e comportamentais não diferiram consideravelmente entre os padrões morfológicos linfocitoide, plasmocitoide e misto. Sendo assim, salienta-se a continuidade de pesquisas aplicadas à elucidação deste novo ponto de questionamento para a oncologia veterinária.

De outra parte, diante da impossibilidade de se aplicar a análise de alteração gênica às proteínas p53, p21 e p27, reitera-se a necessidade de estudos envolvendo a pesquisa de alterações moleculares em genes específicos ou ainda o sequencialmento molecular de toda cadeia gênica.

Portanto, fica a sugestão, ao final deste trabalho, para a continuidade das pesquisas direcionadas a elucidação do envolvimento dessas e de outras moléculas na gênese do TVT, no sentido de se comparar as diversas alterações moleculares neoplásicas em diferentes localizações geográficas, em todo o mundo. Assim, será possível esclarecer se há variabilidade genética em relação à localização ou se as eventuais mutações gênicas relacionam-se a outros fatores. Acrescente-se ainda que, essa neoplasia singular apresenta uma flexibilidade única, o que a torna adequada ao estudo neoplásico em diferentes realidades, com a expansão da mesma para diversas áreas do conhecimento.

ANEXOS