

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**IMUNOEXPRESSÃO E CITOGENÉTICA DO TUMOR
VENÉREO TRANSMISSÍVEL NATURAL NO CÃO**

SANDRA BASSANI-SILVA

**BOTUCATU – SP
Julho - 2008**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**IMUNOEXPRESSÃO E CITOGENÉTICA DO TUMOR
VENÉREO TRANSMISSÍVEL NATURAL NO CÃO**

SANDRA BASSANI-SILVA

Trabalho apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração: Patologia Animal.

Orientadora: Livre Docente Noeme Sousa Rocha

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lígia Souza Lima Silveira da Mota

**BOTUCATU – SP
Julho - 2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Bassani-Silva, Sandra.

Imunoexpressão e citogenética do tumor venéreo transmissível natural no
cão / Sandra Bassani Silva. – Botucatu [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Co-orientadora: Lígia Souza Lima Silveira de Mota

Assunto CAPES: 50503006

1. Cão - Doenças 2. Tumores em animais

CDD 636.70896

Palavras-chave: Bandejamento; Bcl-2; Bcl-6; Caspase-3; Citogenética; COX-2;
Survina; Tumor venéreo transmissível

SANDRA BASSANI-SILVA

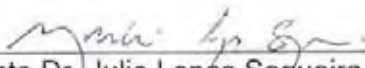
**IMUNOEXPRESSÃO E CITOGENÉTICA DO TUMOR
VENÉREO TRANSMISSÍVEL NATURAL NO CÃO**

COMISSÃO JULGADORA

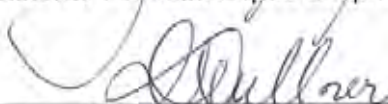
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR



PRESIDENTE E ORIENTADORA: Livre Docente Noeme Sousa Rocha, FMVZ – UNESP



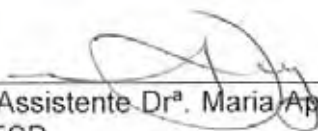
2º EXAMINADOR: Prof. Assistente Dr. Julio Lopes Sequeira, FMVZ – UNESP



3º EXAMINADOR: Profª. Assistente Drª. Cláudia Valéria Seullner Brandão, FMVZ – UNESP



4º EXAMINADOR: Profª. Drª. Louisiane de Carvalho Nunes, CCA - UFES



5º EXAMINADOR: Profª. Assistente Drª. Maria Aparecida Custodio Domingues, FMB – UNESP

Botucatu, 04 de julho de 2008



"Considera a natureza como o mais belo santuário
e a expressão, na Terra, da Perfeição Divina.
Respeita a vida em todas as suas formas
e vê os animais como seres,
não apenas vivos,
mas igualmente conscientes e sensíveis."

Código Rosacruz de Vida nº 15



"A minha fé mais profunda é que podemos mudar o mundo
pela verdade e pelo amor."
Mahatma Gandhi

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **João Santos Silva** e **Ivani Bassani Silva**, por terem se abdicado de muitos de seus sonhos para que os meus se tornassem realidade. Deus me deu o melhor presente na minha vida, que foi ter vocês como pais, como exemplo de vida e de caráter! Não tenho palavras para expressar meu amor e minha gratidão!

Ao meu companheiro de agora (**Sérgio Ferreira Martins Garcia**) e se Deus permitir, de toda a eternidade, por ter sido meu “porto seguro” durante esses três anos! Obrigada pela paciência e pelo carinho!

A minha irmã (**Solange Bassani Marco**), meus sobrinhos (**Gabriel Bassani Marco** e **Julia Bassani Marco**) e meu cunhado (**Felipe Marco Vazquez**) por terem me proporcionado momentos de alegria e carinho e pelo apoio, mesmo que à distância.

AMO TODOS VOCÊS!



"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado com certeza chegará mais longe..."

Desconheço o autor

AGRADECIMENTOS

Creio que a parte mais difícil de um trabalho não seja a discussão, nem as conclusões, mas sim a parte dos agradecimentos. Um bom trabalho só é possível de ser realizado quando há um perfeito equilíbrio entre o profissional e o pessoal. Agradecer, em poucas páginas e palavras, tantas pessoas que fizeram, e muitas ainda fazem parte de minha vida, que foram e muitas ainda são alicerces importantíssimos em minha formação é difícil; eu precisaria de pelo menos uma outra tese para os agradecimentos. Além disso, um trabalho desenvolvido em equipe torna-se mais agradável de ser realizado, bem como mais completo! Por isso, antes de mais nada, quero agradecer a todas as pessoas que me ajudaram a desenvolver este trabalho e as que dedicaram carinho a mim e aos meus pais, especialmente nesses últimos meses, pois sem o apoio e incentivos recebidos não teria sido possível a conclusão deste trabalho em tempo hábil. Enfim:

“Nada iguala o sabor do pão compartilhado” - Antoine de Saint-Exupéry



À minha orientadora, **Professora Noeme Sousa Rocha**, por me garantir mais uma vez, a oportunidade de desfrutar de seus ensinamentos e companhia, refletindo sempre a persistência em percorrer um caminho sempre sensato, disciplinado e aplicado ao engrandecimento da oncologia veterinária.

À minha co-orientadora, **Professora Lígia Souza Lima Silveira da Mota**, pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, pela confiança, pela paciência nas correções e pelos agradáveis momentos de convívio.

À minha co-orientadora de coração, **Professora Renée Laufer Amorim**, por ter me acolhido tantas vezes e com tanto carinho, por ter me socorrido nas imunocitoquímicas, estatísticas e por ter “abraçado como sua causa” a minha correria de fim de tese.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo nº 05/53802-0)** pelo auxílio financeiro.

À **Valquíria Santiloni**, meu anjo número um, sem o qual não teria conseguido fazer as análises citogenéticas, principalmente em tempo “recorde”. Obrigada pelo seu carinho e paciência, por ter ensinado todas as técnicas de citogenéticas e por ter analisado minhas lâminas.

À **Marcela Marcondes Pinto Rodrigues**, meu anjo número dois, por ter me lembrado como faz imunocitoquímica e por ter processado todas as minhas lâminas. Sem você não teria ficado tranqüila na época em que mais precisava de tranqüilidade.

Ao **Daniel Araki Ribeiro**, pela realização das minhas primeiras estatísticas.

Aos técnicos de laboratório, **Celene Maria Carvalho Gandin e Marcos Roberto Franchi**, não só por terem dado as primeiras explicações de como realizar uma imunocitoquímica e por terem ajudado na padronização de algumas de minhas imunocitoquímicas, mas principalmente pelo carinho e pela amizade com que me recebem.

À **Professora Maria Aparecida Custódio Domingues**, por ter auxiliado nos primeiros passos do projeto deste trabalho, pela prontidão em tirar dúvidas e por ter me cedido um pouco de seu tão concorrido tempo, para um momento de desabafo no início deste trabalho.

À Equipe TVT-Mama (**Fábio Henrique Evangelista de Andrade, Fernanda Carmello Figueiroa, Isabelle Ferreira, Luciano Santos da Fonseca, Mário Henrique Bariani e Paulo Ricardo O. Bersano**), não só pelo apoio técnico, mas por terem tornado meus dias de trabalho mais agradáveis!

Aos Ex-Residentes e Residentes da Patologia Veterinária (**Giuliana Brasil Croce, Arita de Cássia Marella Cremasco, Didier Quevedo Cagnini, Freddi Bardella de Souza**), por chamarem nos casos de TVT e pelo convívio descontraído.

Aos Ex-Residentes e Residentes da Cirurgia de Pequenos Animais (**Camila, Carol, Priscilla, Milton**) e aos Ex-Residentes e Residentes da Reprodução (**Rosiara, Maria Clara, Gabriel e Carmo**), por terem se preocupado e lembrado de chamarem nos casos de TVT.

Ao **Professor José Maurício Sforcin**, pelos conselhos oferecidos nesses anos e pelos agradáveis momentos em sua companhia.

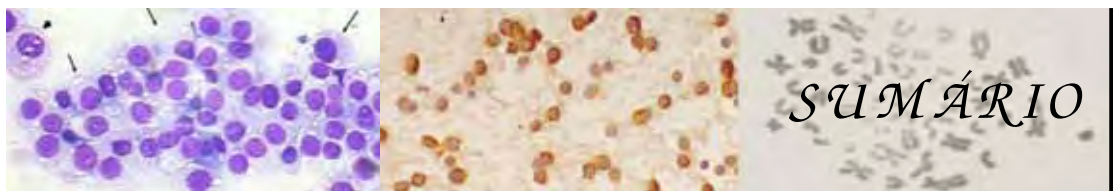
Aos **funcionários da biblioteca** deste Campus, por terem elaborado a ficha catalográfica, revisado as referências bibliográficas, solicitado artigos pelo Comute, enfim, por toda a atenção e gentileza que sempre me trataram durante esses oito anos em Botucatu.

A todos os **professores, funcionários e colegas** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e a todos do Departamento de Genética do Instituto de Bociências – UNESP, pelo carinho e convivência agradável, conseguindo transformar o local de trabalho em um ambiente prazeroso.

Aos amigos que fiz durante esses oito anos morando em Botucatu: **Edna Tereza de Lima, Karina Rodrigues dos Santos, Nilza (parasito), Sílvia (ornito), Ticiane (ornito), Anita (ornito), Adriano (ornito), Sandra Gimenez, Professora Semíramis, Dona Salete, Dona Lurdes, Carmen, Rafael Torres Neto, Leandro Cavalcanti, Celmira Calderón, Flávia Santini, Sr. Noel, Maury Raul, aos funcionários da PG (Denise, Maria e José R.L. Júnior), Ana Maria (mascote-terapia-IBB), Mariana (PG pato.), Stéfanie Vanessa, Maria Francisca Neves, Mariza Glicino da Silva, Maria Carolina de Francisco, Luciana Hayashi Silva, Lara Hayashi, Ana Paula Masseno, Camila Dias Porto, Professor Alexandre Secorum Borges, Professor Rogério M. Amorim, Horryst Friaça, Adriana Wanderley de Pinho Pessoa, Patrícia Neves Batina, Gabriela Neves Batina, Rosemeire, Cristiane, Odir, Marlene Dias, Cristininha, Professora Cláudia Valéria S. Brandão, Professora Sheila C. Rahal, Maricília (Funvet), Ana (Funvet), Juliana (acupuntura), Guilherme (ornito), Professor Júlio Lopes Sequeira, Professora Teresa Cristina Sequeira, Daisy Fávero Salvadori, Professor Reinaldo Silva, Professora Lúcia (parasito), à “turma antiga” da Parasitologia (Gustavo, Nelson, Telma, Viviane, Adriano, Victor, Marco), ao “pessoal do Centro” (Ary, Iracema, José Maria, Esten, Theodoro, etc.), Jair (Nossa Caixa), os já anteriormente citados, aos que eu esqueci de citar aqui, e aos que fizeram e fazem parte da minha vida.**

E finalmente agradeço, com muito respeito, **aos animais** que participaram involuntariamente desta pesquisa. Este trabalho foi realizado, para melhorar as condições e qualidade de vida aos nossos pacientes.

“Talvez eu represente apenas uma pós-graduanda que parte e não seja mais que uma rotina. Mas a convivência nos tornou amigos e, na partida, levarei saudades, deixando o agradecimento pela dedicação dos que viveram e dividiram todas as minhas alegrias, angústias e frustrações. Aos que já foram, tenho saudades, aos que ficam, minha saudade já está começando.....”



"No caráter, na conduta, no estilo, em todas as coisas,
a simplicidade é a suprema virtude."
Henry Wadsworth Longfellow

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos	vi
Sumário.....	x
Lista de tabelas.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Lista de abreviações	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	4
2.1. Tumor venéreo transmissível.....	4
2.2. Carcinogênese.....	7
2.2.1. Genes supressores tumorais	8
2.2.1.1. Apoptose e o câncer.....	8
2.2.1.1.1. Survivina.....	9
2.2.1.1.2. Caspases.....	11
2.2.1.1.3. Bcl-2.....	12
2.2.1.1.4. Bcl-6.....	13
2.2.2. Índice de proliferação celular e o câncer.....	13
2.2.3. Cicloxigenase-2 e câncer.....	15
2.2.4. Cromossomos.....	16
3. Objetivos.....	19
4. Material e Métodos.....	21
4.1. Dados clínicos dos animais.....	21
4.2. Coleta do material tumoral	21
4.3. Coleta de sangue periférico	22
4.4. Avaliação citomorfológica.....	22
4.5. Avaliação imunocitoquímica.....	23
4.6. Análise citogenética	27
4.6.1. Obtenção de células metafásicas tumorais.....	27
4.6.2. Obtenção de células metafásicas do sangue periférico	27
4.6.3. Método de análise cromossômica.....	28
4.6.3.1. Técnica para formação de banda G.....	28
4.6.3.2. Técnica para formação de banda C.....	28
4.7. Análise estatística.....	29

5. Resultados e Discussões	31
5.1. Dados clínicos dos animais.....	31
5.2. Avaliação citomorfológica.....	35
5.3. Avaliação imunocitoquímica.....	37
5.3.1. Survivina	37
5.3.2. Caspase-3.....	39
5.3.3. Bcl-2.....	41
5.3.4. Bcl-6.....	41
5.3.5. Ki-67	42
5.3.6. COX-2	43
5.4. Análise citogenética	47
5.4.1. Sangue periférico – cultura de linfócitos.....	47
5.4.2. Células tumorais	48
6. Conclusões	54
7. Perspectivas	56
8. Referências bibliográficas	58
Anexos	70
Artigo científico.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Padronização da técnica de imunocitoquímica para os diversos anticorpos utilizados na marcação do tumor venéreo transmissível.	26
TABELA 2 – Raças dos pacientes diagnosticados com tumor venéreo transmissível durante o período experimental.	33
TABELA 3 – Estatística descritiva dos casos analisados pela técnica de imunocitoquímica nos pacientes diagnosticados com tumor venéreo transmissível.	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição dos casos de tumores venéreos transmissíveis estudados, por idade.	31
FIGURA 2 – Formas de apresentação clínica do tumor venéreo transmissível canino: A. até D. formas genitais; E. ocular; F. tumores cutâneos múltiplos; G. localização na mucosa anal. Observar aspecto de couve-flor (A, D e G) e aspecto bocelado (B, C e E).	34
FIGURA 3 – Amostras citológicas de tumor venéreo transmissível dos diferentes tipos citomorfológicos: A. padrão plasmocitóide (predomínio de células ovóides, citoplasma amplo e núcleo excêntrico); B. padrão linfocitóide (predomínio de células redondas, citoplasma escasso e alta relação núcleo:citoplasma). Giemsa, barra: 20µm.	36
FIGURA 4 – Marcação pelos anticorpos em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível (TVT) canino: A. anticorpo monoclonal anti-survivina; B. anticorpo policlonal anti-caspase-3; células com marcação citoplasmática (setas). Cromógeno DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris; barra: 20µm.	45
FIGURA 5 – Marcação pelos anticorpos em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível (TVT) canino: A. anticorpo monoclonal Ki-67 (clone MIB-1); células com marcação nuclear (setas); B. anticorpo monoclonal anti-COX-2; observar marcação ao redor do núcleo (setas). Cromógeno DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris; barra: 20µm.	46
FIGURA 6 – Fotomicrografia de metáfases representativas - sangue periférico de cão normal: A. Coloração convencional (Giemsa); B. Banda C – observar regiões centroméricas coradas para o bandeamento C (setas).	51
FIGURA 7 – Fotomicrografia de metáfases representativas - amostra de TVT: A. Coloração convencional (Giemsa); B. Banda C, a seta mostra a positividade do bandeamento-C no braço maior do segundo cromossomo submetacêntrico.	52

LISTA DE ABREVIACÕES

Bcl-2 = oncoproteína humana Bcl-2, clone bcl-2/100/D5 e clone 124

Bcl-6 = anticorpo anti-Bcl-6, clone PG-B6p

COX-2 = cicloxigenase-2

DAB = 3'-3' diaminobenzidina

DNA = ácido desoxirribonucléico

IAP = proteína inibidora da apoptose

Ki-67 = antígeno clone MIB-1

MHC = complexo de histocompatibilidade principal

NES = sinais de exportação nuclear

PBS = tampão fosfato

PCNA = antígeno nuclear de proliferação celular

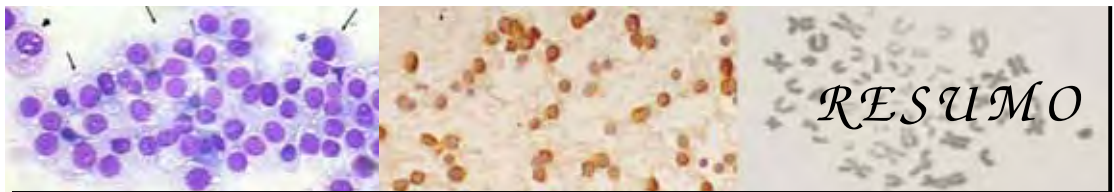
PGHS-2 = prostaglandina H₂ sintetase-2

RNA = ácido ribonucléico

Rpm = rotações por minuto

TVT = tumor venéreo transmissível

2x SSC = duas vezes a solução salina citratada

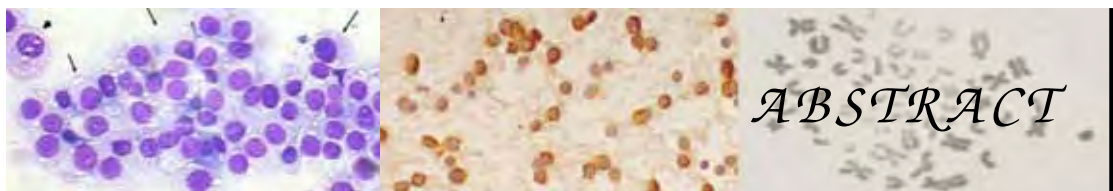


“Transportai um punhado de terra todos os dias, e fareis uma montanha.”
Confúcio

BASSANI-SILVA, S. **Imunoexpressão e citogenética do tumor venéreo transmissível natural no cão.** 2008, 71f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

O tumor venéreo transmissível (TVT) caracteriza-se por ser uma neoplasia de origem controversa. Baseado nos resultados obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa, dos três tipos morfológicos do TVT, os de morfologia plasmocitóide são mais agressivos. De acordo com as características morfológicas do TVT, a resposta à terapia é variável e sabendo-se que a utilização da survivina, bem como da caspase-3, do Bcl-6, do Bcl-2, do Ki-67 e da COX-2 são importantes para auxiliar no prognóstico, no manejo do paciente e na monitoração da doença durante e após a terapia, este projeto visou, além de estudos citogenéticos, observar se há diferenças na expressão dos imunomarcadores acima citados, nos TVTs plasmocitóides e linfocitóides. Para tal, foram utilizados 30 cães atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, Campus de Botucatu. Devido baixa incidência de TVT linfocitóide no HV-UNESP-Botucatu, não foi possível fazer correlações entre os tipos plasmocitóide e linfocitóide. A positividade da survivina variou de 96,15 a 100% em 200 células contadas e, em dois casos, a marcação da survivina foi citoplasmática e nuclear, nos outros casos a marcação foi apenas citoplasmática. A marcação pelo anticorpo anti-caspase-3 nos 30 casos de TVT foi baixa, variando de 0 a 6,5% de positividade em 200 células contadas, o que sugere um comportamento agressivo do TVT. Neste estudo, o TVT não expressou Bcl-2 nem Bcl-6 nas tentativas de imunomarcação. Dos 30 casos de TVT que foi realizado marcação pelo Ki-67, em 21 casos foi possível a contagem de células e houve uma média de positividade de 15,57%. Houve expressão de COX-2 em todos os casos e os valores variaram de 90,66 a 100% de positividade em 200 células contadas, exceto por um caso que apresentou 24,50% de positividade. A distribuição da marcação da COX-2 era, na maioria dos casos, em forma de “dots” perinucleares. Nas lâminas de sangue observamos que as células apresentaram o número de cromossomos diplóide normal ($2n=78$). Encontramos em 74,78% das células tumorais analisadas 56 a 58 cromossomos, sendo que estes apresentavam, em média, 17 cromossomos de morfologia metacêntrica ou submetacêntrica. Sugere-se que fusões cêntricas dos elementos acrocêntricos contribuíram no aumento numérico de elementos metacêntricos observados nas células do TVT, bem como houve rearranjos.

Palavras-chave: COX-2; Caspase-3; Survivina; Bcl-2; Bcl-6; Ki-67; Citogenética; Bandejamento; Tumor venéreo transmissível.



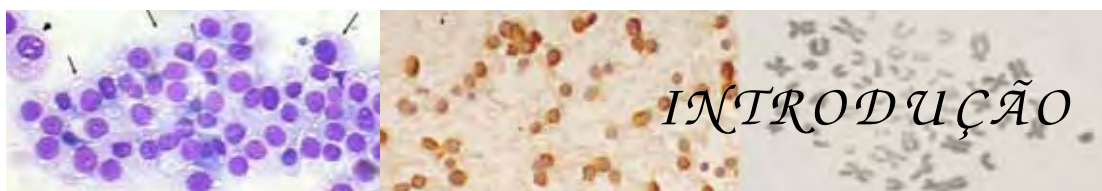
“Se fizemos o melhor que pudemos fazer, já triunfamos.”

Wynn Davis

BASSANI-SILVA, S. **Immunoexpression and cytogenetics in naturally transmissible venereal tumor in dogs.** 2008, 71f. Thesis (Doctorate) – School of Veterinary Medicine and Zootecnics, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

The characterization of transmissible venereal tumor (TVT) as neoplastic in origin is controversial. Based on results obtained previously by our research group, of the three TVT morphological types, those of plasmocytoid morphology are most aggressive. According to morphological characteristics of TVT, response to therapy is variable; and given that using survivin, caspase-3, Bcl-6, Bcl-2, Ki-67 and COX-2 to aid in prognosis, patient management and the monitoring of this disease during and after therapy, this project aimed, besides cytogenetic studies, to observe whether there are differences in expression of the aforementioned immunomarkers, in plasmocytoid TVTs and lymphocytoids. For this, 30 dogs, treated at the Veterinary Hospital of FMVZ-UNESP, Campus at Botucatu, were utilized without restriction as to sex, breed or age, with cytological diagnosis of transmissible venereal tumor. There was prevalence of males; age varied from 1 to 14 years, the majority were SRD dogs and localization was preferentially genital. Due to low lymphocytoid TVT incidence (5.91%) at HV-UNESP–Botucatu, it was not possible to make correlations between plasmocytoid and lymphocytoid types. Positivity of survivin varied from 96.15 to 100% in the 200 cells counted and, in two cases, marking for survivin was cytoplasmic and nuclear, while in other cases marking was only cytoplasmic. Survivin is associated with more aggressive behavior and shorter lifespan in the majority of tumors. In men, highly aggressive neoplasias present lower cytoplasmic expression of caspase-3 than low-grade neoplasias. Marking by anti-caspase-3 antibody in 30 TVT cases was low, varying from 0 to 6.5% positivity in 200 cells counted, which suggests aggressive TVT behavior. In our study, TVT did not express Bcl-2 or Bcl-6 in immunomarking attempts. Cell counts were possible in 21 of the 30 cases of TVT in which marking was accomplished by Ki-67 and average positivity was 15.57 %. There was COX-2 expression in all cases and positivity values varied from 90.66 to 100% in 200 cells counted, except for one case that presented 24.50% positivity. The marking distribution of COX-2 was, in the majority of cases, near the nucleus. In slides of peripheral blood, we could observe that the cells presented normal number of diploid chromosomes ($2n=78$). In 74.78% of tumoral cells analyzed possessing 56 to 58 chromosomes, an average of 17 chromosomes presented metacentric or submetacentric morphology, It is suggested that the centric fusions of acrocentric elements contributed to the numerical increase of metacentric elements observed in TVT cells, in addition to the presence of rearrangements.

Key words: COX-2; Caspase-3; Survivin; Bcl-2; Bcl-6; Ki-67; Cytogenetics; Banding; Transmissible venereal tumor.



“O otimista pode até errar, mas o pessimista já começa errado.”
Juscelino Kubitschek

1. INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível (TVT) desperta nos pesquisadores em oncologia grande interesse por diversas características, entre elas sua origem controversa (MOZOS *et al.*, 1996; MARCHAL *et al.*, 1997; MUKARATIRWA e GRUYS, 2003) além de, se prestar como um excelente modelo de investigação para neoplasia comparada (HSIAO *et al.*, 2002; LIAO *et al.*, 2003; MUKARATIRWA e GRUYS, 2003).

A redução da apoptose em células que expressam altas quantidades de COX-2 é também associado ao aumento da expressão de Bcl-2. Estudos com inibidores de COX levam a redução da expressão de Bcl-2 e indução à apoptose. Células tumorais que expressam COX-2 obtêm aumento na capacidade de invasão dos tecidos, pois rompem as barreiras teciduais resultando em células com maior potencial metastático (WANG e DUBOIS, 2004).

A redução da apoptose tumoral também tem sido correlacionada com a expressão da survivina, levando ao aumento da resistência do câncer à terapia e à redução do tempo de sobrevivência do paciente (KNAUER *et al.*, 2007). Sendo a survivina uma potente inibidora da caspase, sua superexpressão nas células neoplásicas implica na resistência a diferentes estímulos apoptóticos, incluindo à quimioterapia (WESTPHAL e KALTHOFF, 2003).

A proliferação celular relacionada com as neoplasias tem sido amplamente estudada por mostrar uma boa correlação com o comportamento biológico destes tumores e adicionar informações que orientem o tratamento e o prognóstico (ROELS *et al.*, 1999). O antígeno Ki-67 (MIB-1) tem relação direta com a fração de crescimento de uma população celular e é considerado, atualmente, como um marcador de proliferação celular útil e confiável nos mais diferentes tecidos (ALVES *et al.*, 1999; IQBAL *et al.*, 2002; HAZAN *et al.*, 2002).

Recentemente, a dupla marcação imunoistoquímica do Bcl-6 tem demonstrado ser método confiável para identificar linfomas de células B e predizer o tempo de sobrevida (PEDERSEN *et al.*, 2005).

A determinação do significado das aberrações numéricas e/ou estruturais na patogênese da transformação neoplásica pelo estudo dos cromossomos é importante uma vez que esses conhecimentos podem ser utilizados para decisões personalizadas no cuidado do paciente (isto é, diagnóstico e/ou prognóstico) (HAHN, 1998).

Estudos citogenéticos têm ajudado a demonstrar a natureza clonal da maioria das neoplasias e identificar as mudanças genéticas seqüenciais somáticas que ocorrem com um clone neoplásico. Sabendo-se que a utilização da survivina, bem como da caspase-3, do Bcl-6, do Bcl-2, do Ki-67 e da COX-2 são importantes para auxiliar no prognóstico, no manejo do paciente e na monitoração da doença durante e após a terapia, este estudo visou, além de estudos citogenéticos, observar se há diferenças na expressão da COX-2, da survivina, da caspase-3, do Bcl-2, do Bcl-6 e do Ki-67 nos TVTs plasmocitóides e linfocitóides.



"Defeitos não fazem mal, quando há vontade e poder de os corrigir."
Machado de Assis

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Tumor venéreo transmissível

O tumor venéreo transmissível (TVT) canino tem sido objeto de numerosas investigações desde 1876, quando Novinsky relatou o sucesso do primeiro transplante experimental de tumor usando esta neoplasia (COHEN, 1978; MURGIA *et al.*, 2006). Em qualquer que seja o país, inclusive os de clima tropical, o cão é o sistema alvo para implantação, desenvolvimento e perpetuação do TVT (VERMOOTEN, 1987; MURGIA *et al.*, 2006). No Serviço de Patologia do Hospital Veterinário – UNESP, campus de Botucatu – SP, é a segunda neoplasia mais freqüente em cães, perdendo apenas para o tumor de mama (HATAKA, 2003; AMARAL *et al.*, 2004; ANDRADE, 2008).

O TVT está dentro das neoplasias de ocorrência natural nos cães e, apesar de ter predileção pela mucosa da genitália externa de ambos os sexos, pode ser diagnosticado pela implantação de células em locais extragenitais, em ambos os sexos também. No primeiro caso, isto se dá durante o coito. Por outro lado, na segunda hipótese, pode ser transmitido por quebra da integridade estrutural das mucosas nasal, oral, conjuntival e do subcutâneo do animal (PÉREZ *et al.*, 1994; MARCHAL *et al.*, 1997; VARASCHIN *et al.*, 2001).

De acordo com a classificação morfológica de neoplasia é considerado de células redondas, e com a biológica, tem capacidade para desenvolver metástases, inicialmente para linfonodos adjacentes ao TVT primário, posteriormente, para pulmão, fígado, encéfalo, entre outros órgãos (DAS e DAS, 2000; FERREIRA *et al.*, 2000; AMARAL *et al.*, 2004), numa proporção equivalente a 17% (ROGERS, 1997; MacEWEN, 2001).

Na avaliação macroscópica, o TVT exhibe desde pequenos nódulos menores que 1 cm de diâmetro até grandes massas, de aspectos multilobuladas,

couve-flor, pedunculada acima de 10 cm de diâmetro. À palpação, a consistência é de macia a friável (COHEN, 1985; DAS e DAS, 2000; GOLDSCHMIDT e HENDRIX, 2002; GROSS *et al.*, 2005).

O exame citopatológico deve ser o de eleição para o diagnóstico de TVT, por sua simplicidade, baixo custo, menor risco e desconforto, além de reduzir distorção da morfologia celular, o que favorece diagnóstico seguro (DALECK *et al.*, 1987; ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000; BASSANI-SILVA *et al.*, 2003; AMARAL *et al.*, 2004). Este exame tem sido usado em larga escala no Serviço de Patologia da FMVZ-UNESP-Botucatu para o diagnóstico do TVT. Presta-se até mesmo para colher amostras em cavidades fechadas, onde o clínico não inclui o TVT como diagnóstico diferencial. O exame citológico mostrou-se eficiente e conclusivo para esta neoplasia (AMARAL *et al.*, 2004).

De regra, as amostras citológicas de TVT são altamente celulares, quando submetidas à coloração e lidas ao microscópio, sendo possível observar células redondas a ovais, cujas medidas estão entre 14 e 30 μ de diâmetro e os bordos citoplasmáticos são bem delimitados. O núcleo é redondo ou oval e sua posição no citoplasma é excêntrico ou central, podendo apresentar cromatina grosseira e/ou granular com um ou dois nucléolos proeminentes (WELLMAN, 1990). A relação núcleo:citoplasma é relativamente alta (BOSCOS *et al.*, 1999).

Muitas vezes, a morfologia das células do TVT varia entre o tumor primário e o metastático (ROGERS, 1997; BOSCOS *et al.*, 1999), principalmente nos casos de tumores antigos, com mais de dois anos (BOSCOS *et al.*, 1999). Até o início do ano 2003, a literatura especializada no assunto, quer no TVT de ocorrência natural, quer no TVT experimental, *in vitro* não se preocupava com as diferentes morfologias celulares, apesar de se encontrar citações neste sentido. Entre elas, se pode exemplificar com a ausência de dos vacúolos citoplasmáticos (ROGERS, 1997), diferentes tamanhos de células, formas e tonalidades de TVT (MOHANTY e RAJYA, 1977; BOSCOS *et al.*, 1999).

Apesar do TVT ter sido identificado há décadas, sua origem exata ainda é incerta. MURGIA *et al.* (2006) acreditam na origem histiocítica, porém se basearam em informações de Cohen (1985) e Das e Das (2000), que limitaram-se

a questionar a origem reticuloendotelial. Estudos imunoistoquímicos com alpha-1-antitripsina, lisosima, ACM1 no TVT, sugerem a origem histiocítica (MOZOS *et al.*, 1996; MARCHAL *et al.*, 1997; MUKARATIRWA e GRUYS, 2003). O relato no qual formas amastigotas de *Leishmania sp.* foram encontradas ocasionalmente no citoplasma de células neoplásicas reforçariam a origem histiocítica do TVT (ALBANESE *et al.*, 2002). Entretanto, uma extensiva imunofenotipagem realizada em 2003 por Moore e Affolter, em amostras do TVT, falharam em confirmar a origem histiocítica do mesmo (apud GROSS *et al.*, 2005).

Com base nestas informações, a partir de 2003, desenvolveu-se um estudo em TVT de ocorrência natural com o propósito de encontrar correlação entre as diferentes morfologias celulares de TVT e suas agressividades biológicas. Para tanto, baseou-se nos cães da rotina do Hospital Veterinário – UNESP, campus de Botucatu e observou-se *in vitro* e *in vivo* que havia correlação entre a morfologia e a agressividade (BASSANI-SILVA *et al.*, 2003; AMARAL, 2005, BASSANI-SILVA, 2005; GASPAR, 2005).

Mais tarde, MURGIA *et al.* (2006), analisando um fragmento amplificado de DNA mitocondrial de TVT, observaram diferenças na seqüência entre os tumores e concluíram que o clone ancestral do TVT dividiu-se em duas subclasses cada qual se distribuindo em muitos países, talvez para se perpetuarem apesar das intempéries ambientais.

Ainda com relação às modificações na morfologia está o fato de que tumores antigos, com mais de dois anos, não respondem bem à quimioterapia (BOSCOS *et al.*, 1999), que é mais efetiva quando o diagnóstico é dado na fase inicial do tumor (PÉREZ *et al.*, 1994). Além disso, VARASCHIN *et al.* (2001) associaram a malignidade dos TVTs com a morfologia da célula, citoplasma abundante e núcleo excêntrico. Essa associação corresponde ao TVT plasmocitóide que, em pesquisas realizadas por nosso grupo de estudo resultaram em maior expressão de glicoproteína-p que está relacionada com resistência a quimioterapia em diversos tumores, principalmente no homem, maior resistência à ação antitumoral da própolis *in vitro* e quase a totalidade dos casos de metástases (41%) (AMARAL, 2005; BASSANI-SILVA, 2005; GASPAR, 2005).

O TVT é um excelente modelo para investigar a interação entre a imunidade do hospedeiro e o crescimento tumoral (HSIAO *et al.*, 2002; LIAO *et al.*, 2003; MUKARATIRWA e GRUYS, 2003). Um aspecto de extrema importância que tem atraído a atenção de pesquisadores para o TVT é o papel da resposta imune do hospedeiro durante os estágios de progressão e regressão do tumor (MUKARATIRWA e GRUYS, 2003).

Apesar de ser um aloenxerto, o sistema imune do hospedeiro é incapaz de destruir as células tumorais e dessa forma, o tumor desenvolve progressivamente por quatro a seis meses, uma vez que as células tumorais não expressam molécula de MHC classe I ou II durante essa fase (HSIAO *et al.*, 2002; LIAO *et al.*, 2003).

À medida que o tumor transplantado regride, são identificadas maiores quantidades de tecido conjuntivo de sustentação do tumor, e grande infiltrado leucocitário do tipo linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos (TINUCCI-COSTA, 1999).

LIAO *et al.* (2003) demonstraram papel importante das células de TVT, pois foram detectadas proteínas secretadas por essas células com especificidade para a indução de apoptose em células B. Essas mesmas proteínas que também são tóxicas para linfócitos B de outras espécies podem ser utilizadas nas doenças que requerem destruição específica das células B, tais como no tratamento de alergias, doenças auto-imunes e neoplasias, como linfoma de células B. Por estas razões, o TVT pode prestar-se como modelo de investigação da interação entre o crescimento tumoral e o sistema imune do hospedeiro, bem como possível produtor de fármaco, para aquelas doenças (YANG, 1981; HAYES *et al.*, 1983; RECHAVI *et al.*, 1991; HSIAO *et al.*, 2002; LIAO *et al.*, 2003; MUKARATIRWA e GRUYS, 2003).

2.2. Carcinogênese

Carcinogênese ou oncogênese designam a patogênese de uma neoplasia, desde as alterações mais precoces no DNA, que supostamente ocorrem em uma só célula ou em um pequeno grupo delas, até à formação de um

tumor que pode destruir o organismo hospedeiro. Este desenvolvimento neoplásico é um processo dinâmico, que evolui em múltiplas etapas. Caracteriza-se por modificações progressivas do perfil biológico celular, com alterações de sua capacidade de proliferação, diferenciação, sobrevivência e interação com o microambiente (HANSEN e CAVENEE, 1987; VERMA, 1986; SILVA, 2004).

Os eventos básicos da carcinogênese são conhecidos em nível molecular. Resultam de agressão ao genoma da célula, com alterações do DNA, que são mutações ou expressão anômala de genes normais. Tais alterações levam à ativação ou inativação de genes que coordenam funções essenciais da célula, como proliferação, diferenciação, morte por apoptose e estabilidade do genoma. O acúmulo de mutações nesses genes críticos, leva à perda da homeostase e o aparecimento do fenótipo celular maligno (VERMA, 1986; COSTA e MENCK, 2004).

2.2.1. Genes supressores tumorais

A ativação dos proto-oncogenes celulares, juntamente com a inativação dos genes supressores de tumor são as principais alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento tumoral. Os genes supressores codificam proteínas que inibem o progresso do ciclo celular, caso o DNA esteja danificado. Além disso, estão incluídas dentre os genes supressores de tumor, as proteínas que promovem apoptose em resposta às lesões não reparadas no DNA e as enzimas envolvidas no processo de reparo do DNA. Uma vez que os supressores controlam negativamente a proliferação e a sobrevivência celulares, mutações deletérias da função desses genes contribuem para o desenvolvimento e agressão da neoplasia (FRANKS, 1990; COSTA e MENCK, 2004; SILVA, 2004).

2.2.1.1. Apoptose e o câncer

Os processos de proliferação, diferenciação e morte-celular por apoptose são fundamentais para o desenvolvimento de certas doenças, em especial as de caráter neoplásico (PRESTON-MARTIN *et al.*, 1990; THOMPSON *et al.*, 1992; MANNING e PATIERNO, 1996; DEVERAUX e REED, 1999). Estudos da

morfologia e da imunocitoquímica de tumores no homem e em modelos animais evidenciam que a progressiva resistência à apoptose é uma das características marcantes da grande maioria dos cânceres (ZORNIG *et al.*, 2001; BARCINSKI, 2004; KNAUER *et al.*, 2007). Deste modo, pode-se observar a necessidade de avaliar, além do imunofenótipo, o índice de proliferação celular e a taxa de apoptose das células neoplásicas (KIUPEL *et al.*, 1999). O estudo do índice apoptótico nos tumores é de extrema importância para a determinação da agressividade tumoral, conseqüente resistência ao tratamento e ao monitoramento da neoplasia (AOYAGI *et al.*, 2002; KNAUER *et al.*, 2007).

Dentre as moléculas importantes no controle e na efetuação da apoptose estão as proteínas da família do Bcl-2 e, uma família especial com capacidade de inibir as caspases, conhecida como Proteínas Inibidoras da Apoptose (IAPs) (BARCINSKI, 2004; MARTINEZ *et al.*, 2004).

A fase da execução da apoptose começa quando as caspases, que são cisteinaproteases, quebram proteínas que apresentam ácido aspártico. Na fase de degradação celular as caspases atuam sobre si mesmas, além de degradarem diversos tipos de proteínas: citoqueratinas, actinas, catenina e proteínas inibidoras da apoptose como o Bcl-2, e no próprio DNA, destruindo a organização da cromatina e a sobrevivência celular (MAY e MAY, 1995).

2.2.1.1.1. Survivina

A survivina, membro da família das IAPs, é uma proteína bifuncional, que suprime a apoptose e regula a divisão celular (ALTIERI, 2003; BARCINSKI, 2004; KNAUER *et al.*, 2007). Descoberta em 1999, esta proteína tem atraído grande interesse da indústria farmacêutica como um alvo potencial de drogas, pois sua expressão está entre os produtos mais específicos dos tumores (REED, 2001; ALTIERI, 2003; KAUR *et al.*, 2004; KNAUER *et al.*, 2007).

A survivina não é detectável nas células diferenciadas de qualquer órgão em adultos, com exceção do timo, testículo, placenta, progenitores hemopoiéticos e de células endoteliais, porém é superexpressa em uma série de tumores, sugerindo que a reativação do gene da expressão da survivina ocorre comumente

nas neoplasias (REED, 2001; ALTIERI, 2003; WESTPHAL e KALTHOFF, 2003; BARCINSKI, 2004; GROSSMAN, 2004; XIE *et al.*, 2006; KNAUER *et al.*, 2007). A expressão da survivina tem sido correlacionada com a redução da apoptose tumoral, aumento da resistência do câncer à terapia e à abreviação do tempo de sobrevivência do paciente (KNAUER *et al.*, 2007). Possui localizações intracelulares, e predomina no citoplasma, núcleo, mitocôndrias e componentes do aparato mitótico (ALTIERI, 2003; KNAUER *et al.*, 2007).

A elevada concentração citoplasmática de survivina pode promover a função antiapoptótica da survivina, configurando um comportamento mais agressivo; já a localização nuclear nos tumores deve ser associada a um prognóstico favorável como nos casos de câncer colorretal (KNAUER *et al.*, 2007), câncer de mama (LI *et al.*, 2005a); tumores pancreáticos (TONINI *et al.*, 2005), entre outros.

Em 2006, DOMINGUES observou que a expressão da survivina nos Linfoma de Grandes Células B Difuso é um fator marcante de mau prognóstico e preditivo de baixa sobrevida, uma vez que a positividade, seja ela nuclear, citoplasmática, ou nuclear e citoplasmática, relacionava-se sempre com menor sobrevida comparada com os pacientes survivina negativos.

A survivina tem sido apontada, ainda, como possível alvo terapêutico no câncer (SHARMA *et al.*, 2004). Por estar presente no núcleo, drogas que atuariam nos chamados sinais de exportação nuclear (NES) apresentariam um potencial terapêutico promissor, o que daria a estes tumores com survivina nuclear um prognóstico favorável (KNAUER *et al.*, 2007).

O mecanismo pelo qual a survivina neutraliza a apoptose ainda é controverso. Inúmeros relatos sugerem que a survivina é um componente essencial do complexo cromossômico passageiro e desempenha papel crucial na apoptose, inibindo as caspases ao promoverem uma interação do complexo IAP-caspases, permitindo a liberação das proteínas mitocondriais, com a permeabilidade da membrana alterada, e ligação das IAP e conseqüente promoção da inibição das caspases (IKEGUCHI *et al.*, 2002; KNAUER *et al.*, 2007). Outros relatos sugerem que a survivina pode formar complexos com outros

membros das IAPs e unir-se à procaspases (KNAUER *et al.*, 2007). Sendo a survivina uma potente inibidora da caspase, sua superexpressão nas células neoplásicas implica na resistência à diferentes estímulos apoptóticos, incluindo à quimioterapia (WESTPHAL e KALTHOFF, 2003).

Os estudos da expressão da survivina nos TVTs plasmocitóides e linfocitóides vêm complementar os estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, que sugerem que o TVT plasmocitóide é mais agressivo, levando ao melhor entendimento biológico e a resposta terapêutica adequada (AMARAL, 2005; BASSANI-SILVA, 2005; GASPAR, 2005).

2.2.1.1.2. Caspases

Outro método de quantificar a frequência de células tumorais que estão em apoptose é avaliar a expressão das caspases, enzimas relacionadas diretamente com o evento da apoptose (GREEN, 1998; GREEN e KROMER, 1998; ROBERT e FRIEDLANDER, 2003).

As caspases constituem grande família de proteínas homólogas entre si, com atividade enzimática, hoje já com 14 membros bem caracterizados, caspase-1 a caspase-14 (NICHOLSON, 1999; BARCINSKI, 2004).

As caspases estão presentes no citoplasma da maioria das células, nas formas inativas como uma cadeia única de polipeptídeos (zimógenos ou pró-enzimas), e são ativadas por outras caspases por clivagem proteolítica, o que leva à apoptose (GREEN, 1998; ROBERT e FRIEDLANDER, 2003). A inibição da atividade das caspases, por mutação ou mesmo por ação farmacológica, pode retardar ou até impedir a morte celular por apoptose (BARCINSKI, 2004). As caspases podem ser classificadas em grupos como iniciadoras e executoras (SLAUSON e COOPER, 2002).

A caspase-3 tem sido a mais investigada, por ser a caspase executora mais importante, formando um caminho final comum à destruição celular por clivar proteoliticamente muitas proteínas funcionais e estruturais importantes (SLAUSON e COOPER, 2002). Esta enzima está relacionada com a apoptose em muitos distúrbios hemato-linfoproliferativos no homem. Investigações recentes sugerem

que tanto o nível da expressão da caspase-3 como sua forma de marcação intracitoplasmática, têm relação com a progressão tumoral (DONOGHUE *et al.*, 1999; DUKERS *et al.*, 2002). Além disso, a caspase-3 tem sido considerada um dos melhores métodos de determinação do índice de apoptose, uma vez que sua determinação é mais correta que a contagem de corpos apoptóticos. As células apoptóticas reconhecidas por sua morfologia representam um índice menor que o valor real, pois várias células, já em apoptose, podem ainda não apresentar alterações morfológicas visíveis na microscopia óptica (DUKERS *et al.*, 2002).

Neoplasias altamente agressivas possuem uma expressão citoplasmática menor de caspase-3 que as neoplasias de grau baixo (DONOGHUE *et al.*, 1999; DUKERS *et al.*, 2002). A localização da imunomarcação é mais importante que a imunopositividade, e tem sido relacionada com o prognóstico. No homem, linfomas de grau alto que possuem positividade para caspase-3 respondem melhor à terapia. Entre as neoplasias positivas para esta enzima, aquelas com intensa marcação puntiforme citoplasmática tendem a apresentar um prognóstico melhor do que as que apresentam marcação difusa (DONOGHUE *et al.*, 1999).

2.2.1.1.3. Bcl-2

A caspase-3 cliva o gene Bcl-2, que foi o primeiro proto-oncogene cujo mecanismo de ação foi descrito agir suprimindo a morte celular por apoptose (MIHARA *et al.*, 2003; SONH *et al.*, 2003; BARCINSKI, 2004). O mecanismo de ação da proteína Bcl-2 ainda não está totalmente esclarecido, mas há hipóteses que ela funcione como um canal iônico, como modulador da atividade de caspases ou como inibidor da liberação de citocromos-c pelas mitocôndrias (SLAUSON e COOPER, 2002; BARCINSKI, 2004). O gene Bcl-2 é expresso em uma ampla variedade de tecidos fetais, mas tendem a ser mais restritos às células que estão em rápida divisão e diferenciação nos adultos (ZÖRNIG, *et al.*, 2001). Se existe neoplasia com alta expressão de Bcl-2 é esperado pior prognóstico desta neoplasia ou resistência ao tratamento (SONH *et al.*, 2003).

2.2.1.1.4. Bcl-6

O gene Bcl-6 é importante na supressão de genes envolvidos no controle da ativação, diferenciação e apoptose de linfócitos no centro germinativo (PASQUALUCCI *et al.*, 2003; MIN *et al.*, 2005). Sua “down-regulation” é necessária para que possam existir células-B normais no centro germinativo e há expressão de Bcl-6 de forma considerável nos linfomas de células-B (PASQUALUCCI *et al.*, 2003).

Recentemente, a dupla marcação imunoistoquímica do Bcl-6 tem demonstrado ser método confiável para identificar linfomas de células B e prever o tempo de sobrevida, de modo bem semelhante aos dos estudos de cDNA microarray (PEDERSEN *et al.*, 2005). O gene Bcl-6 é um proto-oncogene repressor da transcrição e, nos linfomas não-Hodgkin, o Bcl-6 está frequentemente desregulado (GIANELLI *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005b). Em distúrbios pulmonares linfoproliferativos, foi investigada a presença de mutações na região regulatória 5' do gene Bcl-6 e 40% dos casos mostraram mutações no gene Bcl-6 (KUROSU *et al.*, 2004). Estudos na mutação do gene Bcl-6 também foram realizados em leucemia linfocítica crônica de células-B, e os estudos mostraram que mutações no Bcl-6 identificam um subgrupo dessa doença, o que mostra alto risco de progressão nesses pacientes (SARSOTTI *et al.*, 2004).

2.2.2. Índice de proliferação celular e o câncer

Como dito anteriormente, há necessidade de avaliar, além do imunofenótipo, o índice de proliferação celular e a taxa de apoptose das células neoplásicas (KIUPEL *et al.*, 1999).

A proliferação celular relacionada com as neoplasias tem sido amplamente estudada por mostrar uma boa correlação com o comportamento biológico dos tumores e adicionar informações que orientem o tratamento e o prognóstico (ROELS *et al.*, 1999).

Existem muitos métodos de avaliação da proliferação celular, entre estes podem ser citadas técnicas simples como a contagem das figuras de mitose ou métodos mais sofisticados como pela avaliação imunoistoquímica, utilizando-se a marcação dos antígenos Ki-67 (MIB-1) e PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (ALVES *et al.*, 1999; GRIFEY *et al.*, 1999; ROELS *et al.*, 1999).

As figuras de mitoses são contadas no corte histológico empregando-se colorações de rotina, por exemplo, a Hematoxilina e Eosina. Um dos maiores problemas deste método é que o período de mitose é muito curto dentro do ciclo celular, portanto células em proliferação podem não ser detectadas e o índice proliferativo será subestimado (GRIFEY *et al.*, 1999). Deve-se ressaltar que este método ainda é muito utilizado na rotina laboratorial para a avaliação do comportamento biológico das neoplasias.

O PCNA marca uma proteína essencial para a síntese do DNA e que varia na sua quantidade nas diferentes fases do ciclo celular, apresentando pico na fase S. A principal desvantagem deste marcador é o tempo de vida útil prolongado desta proteína após a saída da célula do ciclo celular, havendo com isso uma super-estimação do índice de proliferação da neoplasia (GRIFEY *et al.*, 1999 e ALVES *et al.*, 1999).

O antígeno Ki-67 (MIB-1) pode ser detectado em todas as fases do ciclo celular menos na G₀ (GERDES *et al.*, 1991). Este tem relação direta com a fração de crescimento de uma população celular e é considerado, atualmente, como um marcador de proliferação celular útil e confiável nos mais diferentes tecidos (ALVES *et al.*, 1999; IQBAL *et al.*, 2002; HAZAN *et al.*, 2002).

O crescimento tumoral é determinado por três fatores principais: o tempo do ciclo celular, a porcentagem das células em proliferação e o número de células perdidas. Portanto, além dos marcadores de proliferação celular, outro índice muito importante relacionado com o comportamento biológico das neoplasias é a apoptose (PHILIPS *et al.*, 2000), o que já foi abordado anteriormente neste estudo.

2.2.3. Cicloxigenase-2 e câncer

A cicloxigenase-2 (COX-2), também chamada de prostaglandina H₂ sintetase-2 (PGHS-2), é a enzima central no caminho biossintético dos ácidos aracdônicos em prostaglandinas. Ela é considerada o “primeiro gene imediato”; é formada quando a célula é estimulada e participa de vários processos, tais como carcinogênese e inflamação (MAO *et al.*, 2007).

Nas últimas duas décadas, numerosos estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos têm correlacionado o desenvolvimento e a progressão do tumor com a presença da COX-2 nas células neoplásicas do homem e dos animais (BEAM *et al.*, 2003; DORÉ *et al.*, 2003; CALDERÓN, 2005; MAO *et al.*, 2007).

A correlação entre a COX-2 e o câncer surgiu a partir de diversos estudos que correlacionaram o uso crônico de antiinflamatórios não esteroidais (DAINEs) com a diminuição da incidência do carcinoma de cólon em meados dos anos noventa, porém, não havia base científica que explicasse essas observações (OSHIMA *et al.*, 1996; BAKHLE, 2001; SCHMITZ *et al.*, 2007).

Estes achados foram sintetizados em hipóteses testáveis onde a atividade de COX-2 estaria associada ao crescimento celular e ação de oncogenes (BAKHLE, 2001). EBERHART *et al.* (1994), estabeleceram resultado crucial para esta hipótese demonstrando a presença de COX-2 no tecido neoplásico (câncer de cólon) e sua ausência em tecido normal (intestino) (BAKHLE, 2001).

A super-expressão de COX-2 sozinha não é suficiente para induzir uma neoplasia, mas sua expressão é suficiente para induzir à carcinogênese em certos tipos de tecidos (GAO e PRESCOTT, 2002; WANG e DUBOIS, 2004).

A COX-2 é uma proteína angiogênica potente (LIAO *et al.*, 2007) e, sabe-se que o crescimento tumoral e a angiogênese são interdependentes (MAO *et al.*, 2007). Células tumorais que expressam COX-2 obtêm aumento na capacidade de invasão tecidual, pois rompem as barreiras teciduais resultando em células com maior potencial metastático, ou seja, a COX-2 está associada à mecanismos de promoção tumoral, como o aumento da capacidade de invasão e metastase (TSUJII *et al.*, 1997; MURATA *et al.*, 1999; SURH *et al.*, 2001; BOL *et al.*, 2002;

CAO e PRESCOTT, 2002; SLAUSON e COOPER, 2002; DONG *et al.*, 2003; WANG e DUBOIS, 2004). Isso foi confirmado em 2005 por CALDERON, que observou a expressão de COX-2 em mastócitos neoplásicos presentes em vasos linfáticos (êmbolo neoplásico) e por MAO *et al.* (2007) que estudaram cânceres gástricos e observaram que a super-expressão da COX-2 nestes tumores estava relacionada com metástases e invasões profundas.

Ainda em 2007, LIAO *et al.* e SCHMITZ *et al.* também observaram que pacientes com maiores níveis de expressão de COX-2 nos osteossarcomas e nos colangiocarcinomas intrahepáticos tiveram acentuada redução no tempo de sobrevida.

SCHMITZ *et al.* (2007) observaram que os colangiocarcinomas intrahepáticos que apresentavam a maior expressão de COX-2 também possuíam menor número de células tumorais apoptóticas, indicando que altos níveis de expressão de COX-2 estão associados com a redução na apoptose e o aumento na proliferação tumoral. Sugere-se que a super-expressão de COX-2 pode causar inibição mediada por prostaglandina E₂, inibindo a apoptose nos colangiocarcinomas. Além disso, a super-expressão da COX-2 mostrou aumentar o crescimento tumoral pela ativação de várias prostaglandinas E (receptor EP) (HAWK *et al.*, 1999; WENDUM *et al.*, 2004; SCHMITZ *et al.*, 2007).

A redução da apoptose em células que expressam altas quantidades de COX-2 é também associado ao aumento da expressão de Bcl-2. Estudos com inibidores de COX levam a redução da expressão de Bcl-2 e indução à apoptose (VANE *et al.*, 1998; CAO e PRESCOTT, 2002; WANG e DUBOIS, 2004).

2.2.4. Cromossomos

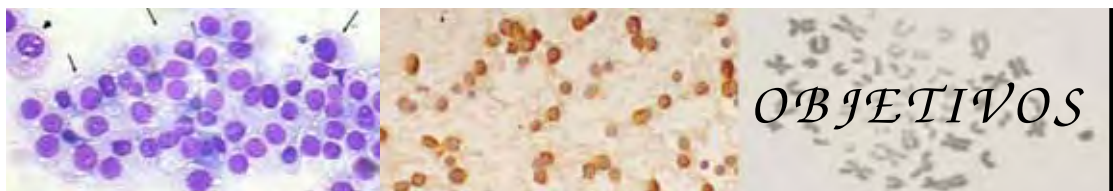
O conjunto diplóide normal do cão doméstico (*Canis familiaris*) apresenta 78 cromossomos sendo todos autossomos de morfologia acrocêntrica, o cromossomo X o maior submetacêntrico e o cromossomo Y o menor deles. Por outro lado, estudos citogenéticos realizados em células do TVT mostraram grande desvio no número cromossômico encontrado no cariótipo normal, onde exibiam entre 57 a 59 cromossomos sendo vários de morfologia submetacêntrica

sugerindo assim a ocorrência de rearranjos (COHEN, 1978; COHEN, 1985; VERMOOTEN, 1987; ROGERS, 1997; HASLER e WEBER, 2000; MacEWEN, 2001). Tais rearranjos devem ser do tipo balanceado, ou seja, não há nem perda nem ganho de material genético e estes incluiriam translocações recíprocas e fusões cêntricas (HAHN, 1998).

Há duas razões principais para estudar os cromossomos das neoplasias: determinar o significado das aberrações numéricas e/ou estruturais no desenvolvimento neoplásico e utilizar esses conhecimentos para decisões próprias no cuidado do paciente (isto é, diagnóstico e/ou prognóstico). Estudos citogenéticos têm ajudado a demonstrar a natureza clonal da maioria das neoplasias e identificar as mudanças genéticas seqüenciais somáticas que ocorrem no clone neoplásico (HAHN, 1998).

Em 1970, CASPERSSON *et al.* foram um dos primeiros a introduzir a técnica de bandeamento cromossômico, pelo método fluorescente utilizando a quinacrina mostarda (banda Q). Com o advento da técnica de bandeamento cromossômico por alta resolução (YUNIS, 1981), a análise citogenética de células neoplásicas tornou-se mais segura e permitiu a identificação de várias anormalidades que até então eram despercebidas. Estas técnicas citogenéticas permitiram demonstrar que as alterações cromossômicas estão implicadas na patogênese de lesões neoplásicas. Assim, foi possível estabelecer que a maioria das neoplasias no homem, incluindo tumores benignos, possui anormalidades cariotípicas não casuais com alguns sítios genômicos preferencialmente envolvidos (HEIM e MITELMAN, 1989; BÉRGAMO, 1995).

Estudos recentes mostram que certas alterações genéticas podem ser um importante adjunto aos dados clínicos e, potencialmente, podem ser considerados como um novo marcador relevante para predizer o prognóstico do tumor, a sensibilidade à droga ou o risco de ter o câncer (JANCÁRKOVÁ *et al.*, 2008). Comparando tumores primários e metastáticos, STAEBLER *et al.* (2002) e FISHMAN *et al.* (2005) verificaram que os últimos apresentavam mais aberrações, quando estudando alterações citogenéticas.



"A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa,
transformam-se em oportunidades."
Maxwell Maltz

3. OBJETIVOS

- Verificar se há variação na expressão da survivina, caspase-3, Bcl-2, Bcl-6, Ki-67 e COX-2, em preparações citológicas de TVT canino plasmocitóides e linfocitóides;
- Analisar citogeneticamente amostras de sangue periférico e do tecido tumoral por meio de técnicas de coloração convencional e bandeamento C, a fim de avaliar as alterações cariotípicas nos TVTs plasmocitóides e linfocitóides.



“As dificuldades são os desafios da vida. Quanto maior a dificuldade,
tanto maior o mérito em superá-lo.”

Provérbio Curdo

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Dados clínicos dos animais

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ-UNESP), campus Botucatu. Foram utilizados 30 cães atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, Campus de Botucatu, sem restrição de sexo, raça ou idade, com diagnóstico citológico de tumor venéreo transmissível. Os tumores foram categorizados, de acordo com localização anatômica, em genitais e/ou extragenitais (Anexo A).

4.2. Coleta do material tumoral

Confirmado o diagnóstico do TVT pela coloração de Giemsa, foram colhidas amostras da lesão por punção sem aspiração ou por esfoliação para confecção de preparados citológicos, utilizados posteriormente para a avaliação da morfologia celular (célula com aspecto plasmocitóide ou linfocitóide). Foram utilizadas seringas descartáveis de 10mL, agulhas descartáveis de 22G e/ou escova ginecológica. No local, foi realizada a punção ou esfoliação da massa e o conteúdo da agulha foi colocado sobre lâminas histológicas com uma das extremidades fosca para a identificação, procedendo-se imediatamente à extensão do material (COWEL e TYLER, 1989). As lâminas foram secas em temperatura ambiente, fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa para a avaliação citomorfológica.

Um segundo aspirado foi realizado, suspendendo-se as células em 1,5mL de PBS livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ gelado armazenado em tubos de polipropileno tipo "ependorf". Esta suspensão de células foi utilizada para a confecção de 12 lâminas, com auxílio de citocentrífuga, com velocidade entre 550 e 600 rpm, durante três minutos. As lâminas histológicas com o botão de células

centrifugadas foram então armazenadas em etanol 95% para realização das técnicas de imunocitoquímica.

Um terceiro aspirado foi realizado, desta vez suspendendo-se as células em 4,5 mL de meio de cultura RPMI 1640 armazenados em tubos de polipropileno tipo “Falcon”. Esta suspensão de células foi encaminhada para o Laboratório de Citogenética Animal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Unesp - Campus de Botucatu, São Paulo, e utilizada para o processamento para análise citogenética.

4.3. Coleta de sangue periférico

Foram coletadas amostras de 3 a 5 mL de sangue periférico de cada animal, em seringas descartáveis previamente heparinizadas (Liquemine® – Laboratório Roche) para realização do cultivo de linfócitos segundo técnica descrita por Moorhead *et al.* (1960), com modificações, para verificação do padrão cariotípico normal da espécie.

4.4. Avaliação citomorfológica

As preparações citológicas coradas pelo Giemsa foram submetidas à avaliação da morfologia celular (célula com aspecto plasmocitóide ou linfocitóide), em microscopia óptica (Carl Zeiss Jenamed 2), para categorização morfológica, de acordo com as características do tipo celular predominante, da seguinte forma:

- TVT_s plasmocitóides: predomínio de 60% ou mais de células de TVT com morfologia ovóide, citoplasma abundante e núcleo localizado excêntricamente;
- TVT_s linfocitóides: predomínio de 60% ou mais de células de TVT com morfologia arredondada, citoplasma escasso e núcleo redondo e central.

Os esfregaços corados pelo Giemsa foram avaliados inicialmente com objetiva de 10x para verificação da celularidade da amostra, padrão de coloração e distribuição das células. A seguir, procedeu-se à observação em aumentos progressivos de 250x e 400x para o detalhamento das características celulares e

contagem de células. Após a varredura inicial, as áreas com melhor padrão de distribuição celular e coloração foram analisadas em 400x, sendo contados em cada lâmina no mínimo dez campos aleatórios não sobrepostos para a obtenção da classificação do tipo celular predominante. A análise citomorfológica detalhada foi feita com auxílio de uma ocular reticulada (grade de integração 100/25, com 25mm² de área), que delimitava o campo de contagem celular. Foram contadas 100 células de cada amostra; as células selecionadas foram categorizadas de acordo com a morfologia em linfocitóides ou plasmocitóides.

4.5. Avaliação imunocitoquímica

Com os preparados citológicos fixados em álcool etílico 95% foi realizada coloração imunocitoquímica com os anticorpos: survivina* (clone 5E8 – Hu), caspase-3[†] (clone Asp 175), Bcl-2[‡] (clone bcl-2/100/D5 e clone 124), Bcl-6[§] (clone PG-B6p), Ki-67^{**} (clone MIB-1) e COX-2^{††} (clone CX-294).

A técnica de imunocitoquímica seguiu o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu, conforme descrito abaixo e na Tabela 1.

Para os anticorpos caspase-3, Bcl-2 (clone bcl-2/100/D5), Ki-67 e COX-2, após a retirada dos preparados citológicos do álcool etílico 95%, as lâminas foram hidratadas em H₂O destilada com quatro banhos e realizada a recuperação antigênica pelo calor, que tem como objetivo a liberação dos epítomos antigênicos do tecido. Para tal, as lâminas foram colocadas em uma cuba de vidro e submersas em solução pré-aquecida de citrato 10mM, pH 6,0, por 30 minutos em banho-maria a 92,6°C. Para os anticorpos survivina, Bcl-2 (clone 124) e Bcl-6 não foi realizada recuperação antigênica.

* Anticorpo monoclonal de camundongo; Anti-survivin Ab-3 - Clone 5E8 – Hu; Labvision, cód. MS-1203-P.

† Anticorpo policlonal de coelho; Caspase-3 clivada – Asp175; Cell Signaling Technology, cód. 9661.

‡ Anticorpo monoclonal de camundongo; Oncoproteína humana Bcl-2 – clone bcl-2/100/D5; isótopo IgG₁. Novocastra Laboratories, cód. NCL-bcl-2 / Anticorpo monoclonal de camundongo; Oncoproteína humana Bcl-2 – clone 124, isótopo IgG₁, kappa. DakoCytomation, cód. M0887.

§ Anticorpo monoclonal de camundongo; Bcl-6 Anti-humana – clone PG-B6p; isótopo IgG₁, kappa. DakoCytomation, cód. M7211.

** Anticorpo monoclonal de camundongo; Ki-67 Anti-humana – clone MIB-1; isótopo IgG₁, kappa. DakoCytomation, cód. M7240.

†† Anticorpo monoclonal de camundongo; COX-2 Anti-humana – clone CX-294; isótopo IgG₁, kappa. DakoCytomation, cód. M 3617.

Posteriormente, os preparados citológicos foram retirados do banho-maria e colocados em temperatura ambiente por 20 minutos, para o resfriamento do material. Seguiu-se com dez lavagens em água destilada e realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 10 volumes, deixando as lâminas imersas por 20 minutos. Em seguida, o material foi lavado em água destilada e posteriormente submerso em solução tampão de TRIS HCl pH 7,4 (Trizma base, Sigma, T1503; NaOH P.A. Merck, 106404.1000).

Para o anticorpo Bcl-2 (clone bcl-2/100/D5), o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com uma solução de 8mL de H₂O₂ misturado em 92mL de metanol.

As lâminas foram então secas com papel filtro, a área com o material foi delimitada com caneta (DakoCytomation Pen) e transferidas para uma bandeja com tampa, tendo-se sempre o cuidado de mantê-las umedecidas com tampão TRIS, para incubação com os anticorpos primários em câmara úmida por 18 horas (“overnight”) a 4°C.

Após o período de 18 horas, as lâminas foram lavadas em TRIS (dois banhos de cinco minutos cada) e retirou-se o excesso, para iniciar a próxima etapa. Para incubação do anticorpo secundário nas marcações com os anticorpos caspase-3, Ki-67 e COX-2 foi utilizado o Kit EnVision® (DakoCytomation EnVision Dual Link System Peroxidase - K4061) durante 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente, para os anticorpos survivina e Bcl-2 foi utilizado o LSAB (DakoCytomation LSAB System).

As lâminas foram lavadas em solução tampão de TRIS. Para a revelação da reação foi empregada solução cromógena de DAB líquido (Liquid Dab Substrate Chromogen System - K3468), seguindo as recomendações do fabricante, por cinco minutos em temperatura ambiente, em câmara úmida e escura. O material foi lavado com TRIS e em cinco banhos de água destilada, para interrupção da reação.

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 3 minutos, lavadas em água corrente por dez minutos e desidratadas. A etapa de

desidratação consistiu em uma passagem em álcool 85º, uma em álcool 95º, três em álcool absoluto e três em xilol, cada etapa durando três minutos.

Em seguida, as lâminas foram montadas com resina sintética (Permount – Fischer Scientific – SP 15-500) e lamínulas e levadas ao microscópio para avaliação da imunomarcção.

Nas baterias de imunocitoquímica foi processada uma lâmina de controle negativo, onde foi suprimido o anticorpo primário na incubação e substituído por imunoglobulinas de camundongo (para os anticorpos monoclonais) e coelho (para os anticorpos policlonais).

As análises imunocitoquímicas foram realizadas avaliando o percentual de células marcadas em 200 células neoplásicas, em aumento de 400x com o auxílio do programa de análise de imagens (QWin v3.0 Leica) e uma câmera digital (Leica DFC) acoplada a um microscópio (Leica DMLD). Para tanto, foram capturadas imagens de campos aleatórios e não contíguos. As avaliações foram feitas como descrito a seguir.

Para avaliação do percentual de positividade foram contadas 200 células de TVT consecutivas, independente da imunomarcção positiva ou negativa, no aumento de 400x, iniciando-se a contagem a partir do canto esquerdo inferior até o canto direito superior, completando o campo todo, sendo assinaladas as células que apresentavam reação positiva e negativa separadamente, bem como anotados os padrões de marcação (nuclear, citoplasmático, nuclear e citoplasmático).

4.6. Análise citogenética

4.6.1. Obtenção de células metafásicas tumorais

A suspensão celular obtida pela dissociação do material ou diretamente pela punção ou esfoliação da massa tumoral, mantida em tubo de polipropileno tipo Falcon contendo 4,5 mL de meio de cultura RPMI 1640 foi centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos. Após retirada do sobrenadante, adicionou-se 5mL de solução hipotônica de KCl (0,075M). O material foi incubado por 40 minutos a 38°C e em seguida centrifugado novamente a 1500 rpm por 5 minutos. O material foi fixado e lavado por várias vezes em solução fixadora 3:1 de metanol e ácido acético, até o sobrenadante apresentar-se límpido. Ressuspendeu-se o “pelete” final em 0,5 mL de solução fixadora e procedeu-se o preparo das lâminas. Três a quatro gotas da suspensão obtida foram pingadas sobre lâmina histológica limpa e mantida em água destilada gelada. As lâminas confeccionadas foram secas à temperatura ambiente e guardadas em geladeira até o momento da análise cromossômica.

4.6.2. Obtenção de células metafásicas do sangue periférico - Cultura de linfócitos

Em um frasco estéril de cultura foram adicionados 4,5mL de meio de cultura RPMI 1640, 0,5 mL de soro bovino fetal, 0,1 mL de estreptomicina e penicilina, 0,1mL de fitohemaglutinina e 10 gotas do sangue total. O material foi incubado a 38,5°C por 96 horas. Meia hora antes de completar 96h, foi adicionado 0,1 mL de colchicina (0,016%).

Após completar às 96 horas de cultivo, o material foi transferido para um tubo de centrífuga e centrifugado por 5 minutos a 1500rpm. O sobrenadante foi desprezado e 5mL de solução hipotônica de KCl (0,075M) foram adicionados. Após 30 minutos na estufa a 38,5°C, foram adicionadas 3 gotas de fixador (metanol e ácido acético – 3:1) e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e 5mL de fixador adicionados. Esta última etapa foi repetida até o material ficar transparente. O sedimento foi ressuspendido em

0,5mL de fixador e pingou-se de 3 a 4 gotas da suspensão em cada lâmina histológica. As lâminas confeccionadas foram secas à temperatura ambiente e guardadas em geladeira até o momento da análise cromossômica.

4.6.3. Método de análise cromossômica

A primeira lâmina de cada amostra foi corada com uma solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato 0,06M com pH 6,8, durante 2 minutos. Nestas lâminas, ao microscópio de luz, foram procuradas as metáfases para o cálculo do número cromossômico modal, que foram analisadas individualmente em cada amostra obtida. Nas amostras de sangue periférico foram analisadas 12 células de cada animal para verificação do padrão cariotípico normal da espécie. Nas amostras tumorais foram analisadas todas as metáfases encontradas.

As demais lâminas foram reservadas para análise em bandeamento C e G.

4.6.3.1. Técnica para formação de banda G

Para a formação de banda G, a técnica utilizada foi a de SCHERES (1972) com modificações. Essa técnica consiste no tratamento das lâminas com uma solução de tripsina 1:250 (Difco®) 0,01% diluída em tampão fosfato 0,06M pH 6,8, mantida em banho-maria 37°C, por 4 a 10 segundos dependendo da idade da lâmina. O material foi corado com solução de Giemsa-tampão fosfato (1:30) durante 5 minutos e lavado em água corrente.

Um número máximo de metáfases foi analisado em cada caso, com o objetivo de verificar a clonalidade das alterações cromossômicas dentro do mesmo caso.

As metáfases foram fotografadas e montadas para possível identificação das alterações cromossômicas e possíveis marcadores.

4.6.3.2. Técnica para a formação de banda C

Para a formação de banda C, a técnica foi a de SUMMER (1972) com modificações. As lâminas foram tratadas com uma solução de HCl 0,2 N por 10 a

15 minutos à temperatura ambiente e lavadas em água destilada; em seguida foram incubadas em solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ a 5% à 37°C durante 15 a 30 minutos e lavadas em água corrente, mergulhadas em solução de 2 X SSC 60°C por 10 a 20 minutos e novamente lavadas em água corrente.

O material foi corado com solução de Giemsa à 37°C diluída em tampão fosfato 0,01M, pH 6,8, durante 6 minutos e as melhores metáfases foram fotografadas para a identificação de possíveis polimorfismos e/ou marcadores cromossômicos.

4.7. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa de análise estatística Statistica 7 (Stat soft).

Foram utilizados testes não paramétricos de correlação de Spearman para correlacionar os marcadores imunocitoquímicos, com nível de significância de 5%.



“Antes de você desanimar porque fracassou em alguma coisa, pense que somente alcança o sucesso quem insiste, apesar de tudo.”
Autor desconhecido

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Dados clínicos dos animais

A inclusão dos pacientes foi condicionada ao consentimento escrito dos proprietários, após o esclarecimento sobre o protocolo experimental.

O grupo experimental foi constituído por 30 animais onde 17 eram provenientes de Botucatu; os demais eram de cidades vizinhas, como São Manuel Laranjal Paulista, Barra Bonita, Bauru e várias outras, representando a área de abrangência do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP de Botucatu.

Dos 30 animais estudados, 18 eram machos e 12 eram fêmeas, com idades variando entre um e 14 anos, sendo que 70% dos animais estavam concentrados na faixa entre dois e seis anos. A distribuição dos casos por faixa etária está na Figura 1.

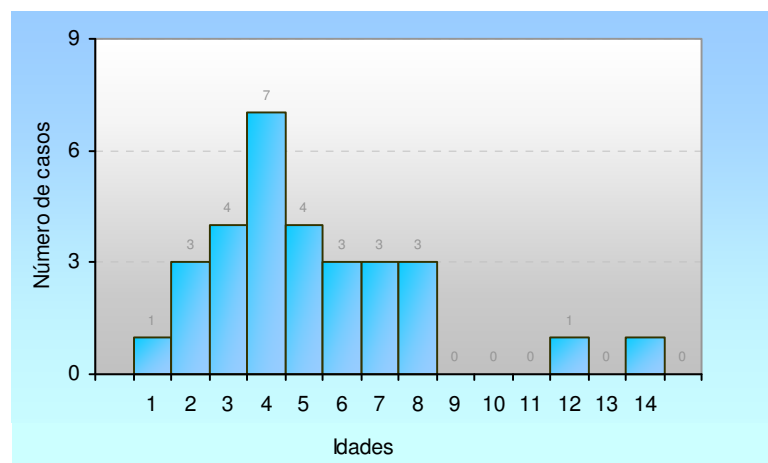


FIGURA 1 – Distribuição dos casos de tumores venéreos transmissíveis estudados, por idade.

Segundo a literatura especializada no assunto, a predisposição por sexo neste tipo de neoplasia é um assunto controverso e já foi relatado por diversos autores. Neste trabalho, o número de machos foi maior que o de fêmeas, concordando com BOSCO (1988), ROGERS *et al.* (1998), VARASCHIN *et al.* (2001) e BRANDÃO *et al.* (2002). Porém isso não pode ser considerado como predisposição sexual uma vez que outros autores (MORALES e GONZÁLEZ, 1995; SOBRAL *et al.*, 1998; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002) relatam que há mais diagnósticos em fêmeas. Um levantamento feito da casuística do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP de Botucatu, abrangendo o período de 1994 a 2002 (AMARAL *et al.*, 2004), obteve-se 52% de ocorrência em machos. Em um outro levantamento feito no mesmo Hospital Veterinário, entre março de 2002 e setembro de 2004, a prevalência foi de fêmeas (72 animais – 54,54%), seguida por 60 machos. Essa divergência sexual em um mesmo local comprova que a neoplasia não apresenta uma clara predisposição sexual, o que concorda com CALVERT (1983), COHEN (1985) e DAS e DAS (2000), que assumem que não há predisposição sexual.

A média de idade dos animais foi semelhante a citada por CALVERT (1983), MORALES e GONZÁLEZ (1995), ROGERS (1997), ROGERS *et al.* (1998), SOBRAL *et al.* (1998) e DAS e DAS (2000), assim como a distribuição por faixa etária (entre dois e seis anos) à reportada por SOBRAL *et al.* (1998), que apontam como idade de maior risco aquela em que os animais apresentam maturidade sexual, ou seja, adultos jovens, entre dois e quatro anos, diminuindo consideravelmente após os seis anos de idade. Como o TVT é uma afecção venérea, os novos casos são esperados numa faixa etária limitada à atividade sexual intensa, ou seja, entre três a cinco anos de idade, com uma ocorrência mínima em cães com menos de um ano e diminuindo de incidência após os seis ou sete anos.

Houve um predomínio de cães Sem Raça Definida (23) seguido por Poodle (3), Cocker Americano (1), Border Collie (1), Fox Paulistinha (1) e Fila Brasileiro (1). A distribuição dos casos, por raça, observada no experimento está na Tabela 2.

TABELA 2 – Raças dos pacientes diagnosticados com tumor venéreo transmissível durante o período experimental.

RAÇA	NÚMERO DE CASOS	%
Poodle	3	10,0
Cocker Americano	1	3,3
Border Collie	1	3,3
Fox Paulistinha	1	3,3
Fila Brasileiro	1	3,3
SRD*	23	76,8
TOTAL	30	100

* sem raça definida

Não foi observada predisposição racial; a maioria dos animais era Sem Raça Definida (76,8%), refletindo diretamente o perfil de doença venérea associada a animais de vida livre e com pouco controle higiênico-sanitário por parte dos proprietários. Esta observação é corroborada por MORALES e GONZÁLES (1995) e ROGERS (1997). A variação de raças portadoras da neoplasia, apresentada pelos diversos autores, relaciona-se mais àquelas predominantes em uma determinada região do que a uma possível predisposição racial. Embora alguns autores cite a ocorrência mais freqüente em cães de grande porte (ROGERS *et al.*, 1998), isso não foi observado em nossa casuística, como de acordo com BRANDÃO *et al.* (2002).

A localização preferencial do tumor foi genital (25 casos – 83,4%); sendo que houve um caso (3,3%) extragenital e, em quatro casos (13,3%), além da localização genital o TVT também estava presente extragenitalmente (nódulos pelo corpo, ocular e anal) (Figura 2).

O aspecto macroscópico das lesões variava desde poliposos, aspecto de couve-flor, avermelhado, lesões boceladas (lisas) ou vermelho-claras. Havia tumores friáveis, os quais liberavam fragmentos durante o exame físico e os tumores cutâneos eram firmes (Figura 2). Esses achados são semelhantes aos citados pela literatura (TINUCCI-COSTA, 1999; BRANDÃO *et al.*, 2002).



FIGURA 2 - Formas de apresentação clínica do tumor venéreo transmissível canino: **A. até D.** formas genitais; **E.** ocular; **F.** tumores cutâneos múltiplos; **G.** localização na mucosa anal. Observar aspecto de couve-flor (**A, D e G**) e aspecto bocelado (**B, C e E**).

5.2. Avaliação citomorfológica

As amostras foram analisadas para determinação do padrão citomorfológico e subsequente inclusão em um dos grupos experimentais, definidos como Linfocitóide ou Plasmocitóide (Figura 3), descritos anteriormente. O padrão plasmocitóide foi o mais freqüente, com 93,34% dos casos, seguido pelo linfocitóide (6,66%).

Muitos autores ainda utilizam a classificação do TVT em atípica e típica, porém essa classificação pode induzir a erro de interpretação, uma vez que sabe-se que há diferenças na prevalência de um determinado tipo celular de acordo com a região do país estudada. Na região sudeste o TVT predominante é o plasmocitóide (AMARAL *et al.*, 2004) e na região sul do Brasil há predomínio de TVT com morfologia linfocitóide (comunicação pessoal por GASPARG, 2003 e CALDERÓN, 2007). No Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu, a prevalência é de TVT plasmocitóide; de março de 2005 a fevereiro de 2008, de 186 TVTs diagnosticados citologicamente, 175 (94,09%) foram classificados como plasmocitóide e 11 linfocitóides (5,91%). Portanto, o presente trabalho manteve a proporção de TVTs plasmocitóides e linfocitóides semelhante ao encontrado no Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu.

Uma suposição feita por nosso grupo de pesquisa, é que os TVTs iniciam-se como linfocitóides, tornam-se mistos e depois viram plasmocitóides, com o passar do tempo. Em um trabalho realizado por AMARAL (2005), os casos de TVT atendidos no HV – UNESP – Botucatu, foram classificados com relação à evolução clínica em recentes (com até três semanas de evolução), estabelecidos (com três a oito semanas de evolução) ou antigos (com mais de oito semanas) e verificou-se que os tumores antigos eram os predominantes com 52,5% (86 casos), dos 164 casos estudados. Isso reforça o fato dos tumores encontrados no presente estudo terem sido a maioria padrão plasmocitóide, uma vez que os proprietários demoram em levar o animal ao atendimento clínico.

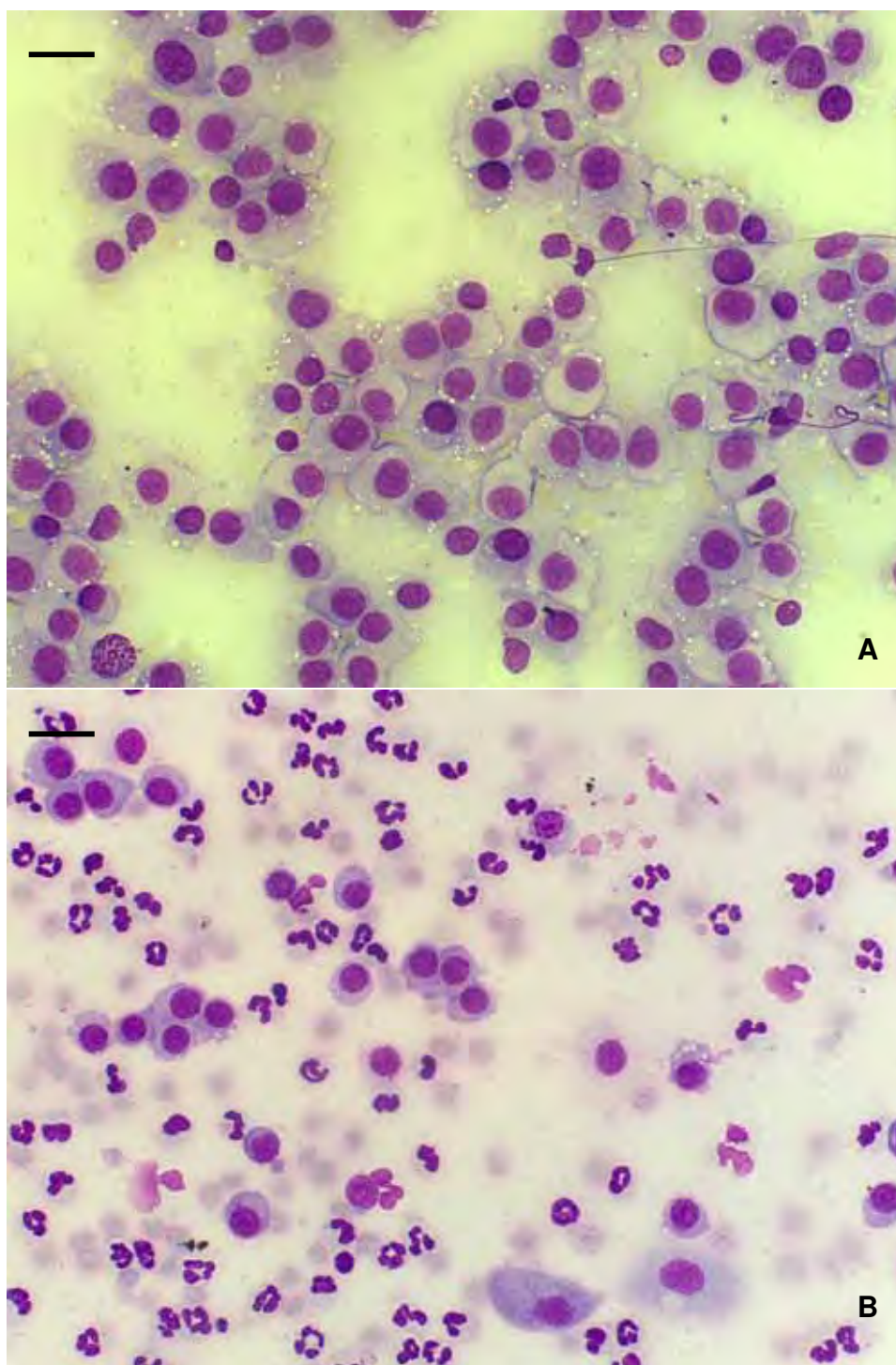


FIGURA 3 – Amostras citológicas de tumor venéreo transmissível dos diferentes tipos citomorfológicos: **A.** padrão plasmocitóide (predomínio de células ovóides, citoplasma amplo e núcleo excêntrico); **B.** padrão linfocitóide (predomínio de células redondas, citoplasma escasso e alta relação núcleo:citoplasma). Giemsa, barra: 20 μ m.

5.3. Avaliação imunocitoquímica

As amostras de citocentrifugado mostraram-se mais adequadas que os esfregaços diretos, pois apresentavam menor marcação de fundo na imunocitoquímica.

A utilização das amostras celulares preparadas por citocentrifugação e fixadas em álcool mostrou-se adequada para a realização da técnica de imunocitoquímica. Esta observação já fora feita por CANIATTI *et al.* (1996), que consideraram a técnica um método prático, econômico e acurado para o diagnóstico e imunofenotipagem do linfoma canino.

Devido ao baixo número de TVTs com padrão linfocitóide na nossa rotina, não foi possível verificar se há variação na expressão da survivina, da caspase-3, do Bcl-2, do Bcl-6, do Ki-67 e da COX-2, nos TVTs plasmocitóides e linfocitóides.

Foi realizada estatística descritiva dos casos analisados pela técnica de imunocitoquímica. Neste momento considerou-se a marcação total de cada anticorpo (nuclear, citoplasmática e nuclear e citoplasmática). Os resultados estão na tabela 3, a seguir. As discussões serão realizadas a seguir, conforme cada anticorpo.

TABELA 3 – Estatística descritiva dos casos analisados pela técnica de imunocitoquímica nos pacientes diagnosticados com tumor venéreo transmissível.

ANTICORPO	Nº	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALORES	
				MÍN.	MÁX.
Survivina	30	99,56	1,06	96,15	100
Caspase-3	30	3,01	1,72	0,00	6,50
Ki-67	21	15,57	10,29	2,53	42,85
COX-2	30	95,70	14,05	24,50	100

5.3.1. Survivina

A expressão da survivina foi observada nos 30 casos de TVT estudados por imunocitoquímica (Figura 4a). A positividade da survivina variou de 96,15 a 100% em 200 células contadas, conforme mostra a tabela 3. Em dois casos, a

marcação da survivina foi citoplasmática e nuclear, nos outros casos a marcação foi apenas citoplasmática.

Em uma revisão feita em 2005(a), LI *et al.* relataram que a localização nuclear ou citoplasmática da survivina e sua correlação com prognóstico ainda é controversa. Alguns autores citam que a localização nuclear tem prognóstico pior, já outros relatam que a expressão nuclear da survivina representa um prognóstico favorável. Segundo KNAUER *et al.* (2007), os tumores com survivina nuclear teriam melhor prognóstico, uma vez que drogas que atuam nos chamados sinais de exportação nuclear e representariam um potencial terapêutico promissor.

UCHIDE *et al.* (2005) relatam que a survivina tem atraído grande interesse como um marcador de prognóstico, pois é associado com um fenótipo mais agressivo, deste modo, esses autores fizeram um clone molecular do cDNA da survivina e avaliaram a expressão do mRNA deste gene em uma variedade de tumores caninos de ocorrência natural, e verificaram que a superexpressão do gene da survivina ocorreu em 3 de 18 tumores malignos, mas em nenhum tumor benigno, concordando com o fato que a superexpressão da survivina está associada a malignidade tumoral nos cães. No presente estudo, dos dois casos que apresentaram marcação citoplasmática e nuclear, um era na região anal, e o outro era peniano, porém neste último o animal possuía metástases pelo corpo todo, inclusive ocular.

Alguns autores relatam que a survivina é superexpressa na maioria dos cânceres em seres humanos, mas não é expressa em tecido normal. A survivina é associada a um comportamento mais agressivo e menor tempo de vida na maioria dos tumores. Ela regula a fase G₂/M do ciclo celular por se associar aos fusos dos microtúbulos mitóticos, e inibe diretamente a atividade da caspase-3 e da caspase-7 (LI *et al.*, 2004). Em um estudo feito com câncer de mama na mulher, observou-se correlação entre a expressão da survivina e da caspase-3 com o grau histológico do tumor, porém não houve correlação entre a expressão da survivina com a caspase-3 (NASSAR *et al.*, 2008). Já em um estudo feito por DU *et al.* (2008), quando comparado a expressão da survivina em carcinomas de células escamosas em laringe com recorrência em um ano ou superior a cinco anos, a

taxa de expressão de survivina foi de 92,9% e 21,1%, respectivamente. Já a da caspase foi de 50,0% nos primeiros e de 89,5% nos com recorrência com mais de 5 anos; a taxa de expressão da survivina e da caspase nos diferentes grupos teve diferença significativa ($p < 0,05$).

No presente estudo, a expressão da survivina quando comparada com a expressão da caspase-3 pelo método de correlação de Pearson e pelo método não paramétrico de correlação de Spearman com nível de significância $p < 0,05$, também não mostrou correlação ($p = 0,06$), resultado semelhante a NASSAR *et al.* (2008). Porém, foi constatado que o número de células marcadas pela caspase-3 foi pequeno, fato esperado frente a intensa marcação da survivina no presente estudo.

Na literatura verifica-se escassez de trabalhos relacionando survivina e neoplasias nos animais, uma vez que os estudos com a survivina em medicina veterinária são recentes. Não há nada correlacionando survivina e TVT.

5.3.2. Caspase-3

A marcação pelo anticorpo anti-caspase-3 nos 30 casos de TVT foi baixa, variando de 0 a 6,5% de positividade em 200 células contadas, conforme tabela 3 e figura 4b. Uma observação interessante é que em 3 casos houve marcação nuclear, além da citoplasmática e, em 11 casos apresentou, além da marcação citoplasmática, células com marcação nuclear e citoplasmáticas juntas.

Os estudos com o anticorpo anti-caspase-3 em medicina veterinária são recentes, havendo poucos trabalhos com tumores dos animais domésticos e a imunomarcação de caspase-3 clivada e não havendo nada correlacionando caspase-3 e o TVT. Por não existirem dados na literatura veterinária sobre a marcação pela caspase-3 no TVT, os resultados apresentados foram comparados aos dados de outras neoplasias nos animais e homens.

Em linfomas caninos, o índice apoptótico, avaliado pela caspase-3, não é diferente entre os tumores de alto e baixo grau de malignidade, nem entre os linfomas T e B (SUZANO, 2007). Já nos tumores de mama em cadelas, DeNARDI (2007) observou aumento da imunomarcação para caspase 3 nos carcinomas de

mama que metastatizaram e nas metástases pulmonares. Nos adenomas, carcinomas não metastáticos e nos carcinomas inflamatórios a taxa de apoptose celular foi baixa e sem diferença entre esses grupos.

Nos casos de TVT não foi observada diferença de marcação da caspase-3 entre os animais que apresentavam metástases e os que possuíam apenas TVT genital.

Nos homens, neoplasias altamente agressivas possuem uma expressão citoplasmática menor de caspase-3 que as neoplasias de grau baixo (DONOGHUE *et al.*, 1999; DUKERS *et al.*, 2002) e as que apresentam marcação puntiforme citoplasmática tendem a apresentar um prognóstico melhor do que as que apresentam marcação difusa (DONOGHUE *et al.*, 1999). Nos casos de TVT aqui estudados, a marcação citoplasmática do anticorpo anti-caspase-3 foi citoplasmática difusa e com positividade baixa, o que sugere um comportamento agressivo do TVT.

Em um estudo feito por KONSTANTINIDOU *et al.* (2007) com meningiomas intracraniais, uma associação entre caspase-3 e Bcl-2 deveria ser esperada, visto que a superexpressão de Bcl-2 inibe o acúmulo de citocromo-c e a ativação da caspase-3, bem como o Bcl-2 interage com uma proteína no retículo endoplasmático, inibindo a ativação da caspase-3. Por outro lado, os autores relatam que a caspase-3 é capaz de modular a função do Bcl-2 clivando-a em uma forma truncada pequena que, ao contrário da forma longa que é anti-apoptótica, torná-la-ia pro-apoptótica. A complexidade dessas interações poderia ser responsável pela ausência de qualquer associação clara entre caspase-3 e Bcl-2 e os achados desses autores estarem de acordo com outros da literatura que relatam que não há associação entre a atividade da caspase-3 e a expressão do Bcl-2 sugerindo que o controle da apoptose em tumores do sistema nervoso central envolvem outros genes que não o Bcl-2, p53 e c-myc.

No presente estudo, não foi possível estabelecer a correlação entre a caspase-3 e o Bcl-2, devido a não marcação do Bcl-2, conforme descrito a seguir.

5.3.3. Bcl-2

De acordo com YANG *et al.* (2006), a proteína Bcl-2 se expressa em tumores benignos e malignos de mama de cadela, sem diferença estatística entre eles e não se relaciona com a imunomarcção de receptores de estrógeno. Já a reatividade para o Ki-67 é maior nos tumores malignos e correlaciona-se com os índices de receptores de estrógenos presentes na neoplasia.

Nos tumores linfóides de felinos, não houve diferença entre o tempo de sobrevivência nos tumores com maior ou menor imunomarcção de Bcl-2, mas os tumores de baixo grau apresentaram maiores índices de células positivas para Bcl-2 do que os de alto grau. O contrário ocorreu com o percentual de células em proliferação, que foi maior nos linfomas de alto grau (DANK *et al.*, 2002).

No presente estudo, o TVT não expressou Bcl-2 em nenhuma das duas tentativas de imunomarcção, talvez seja por ainda não estar bem estabelecida a padronização deste anticorpo em amostras citológicas.

5.3.4. Bcl-6

Há décadas, o TVT foi confundido com diversas neoplasias, entre elas, o linfoma, devido a sua semelhança morfológica com essas células (COHEN, 1985; ROGERS, 1997). Atualmente a origem da célula ainda é controversa. Em vista disso, optou-se no presente trabalho por empregar a marcação do Bcl-6, no sentido de averiguar qualquer relação do TVT com uma célula de origem linfóide bem como seu grau de agressividade nas diferentes morfologias, plasmocitóide e linfocitóide, visto que este tem como finalidade identificar células linfóides.

O fato do TVT não ter expressado Bcl-6 na tentativa realizada, pode indicar a possibilidade desse anticorpo não estar padronizado para reações em tecidos animais. Não há, na literatura consultada, nenhum trabalho correlacionando Bcl-6 com neoplasias nos animais, nem tampouco em TVT.

5.3.5. Ki-67

Dos 30 casos de TVT em que foi realizada a marcação pelo Ki-67, em 21 foi possível a contagem de células, uma vez que nos outros 9 casos a marcação imunocitoquímica não ocorreu (Figura 5a). Isso se deve, provavelmente, ao fato deste anticorpo não reagir em tecidos fixados por muito tempo (tempo de fixação ideal seria 24 horas), podendo não ser útil na avaliação da taxa de proliferação em material que não foram tomados tais cuidados (comunicação pessoal por AMORIM, 2008).

No presente estudo, houve uma média de positividade para o Ki-67 (clone MIB-1) de 15,57 %, assemelhando-se aos resultados relatados por GREATTI *et al.* (2004), que encontraram média de 10,8% nos esfregaços citológicos de TVT.

STUART-HARRIS *et al.* (2008) realizaram uma meta-análise sistemática que envolveu 85 trabalhos de revisão abrangendo 32.825 pacientes com câncer de mama, comparando marcadores de proliferação (Ki-67, índice mitótico (MI) e PCNA) com o tempo de sobrevida em pacientes com câncer. Os autores puderam perceber que a expressão do Ki-67 (MIB-1), do MI e do PCNA são associados com tempos de sobrevidas menores. Os autores relataram também que não foi possível neste estudo identificar qual desses marcadores é o mais importante, entretanto relatam que esses marcadores de proliferação provêm informações prognósticas adicionais. No presente estudo, não foi possível fazer a correlação entre expressão do Ki-67 (clone MIB-1) com duração do tratamento devido a falta de dados na maioria das fichas clínicas e abandono do tratamento por muitos proprietários.

Em 2006, YANG *et al.* verificaram que os índices do Ki-67 para tumores mamários malignos em mulheres eram significativamente maiores que dos tumores benignos ou das hiperplasias. Estes achados foram consistentes com os resultados de estudos prévios com tumores mamários caninos (LOHR *et al.*, 1997; SARLI *et al.*, 2002). A marcação imunocitoquímica para o anticorpo Ki-67 pode ser um procedimento confiável na avaliação da malignidade dos tumores mamários

caninos. Tumores malignos possuem um índice de Ki-67 maior que os dos tumores benignos (YANG *et al.*, 2006).

Quando analisada a marcação com Ki-67 para proliferação celular, não notou-se diferenças nos índices de proliferação entre os TVTs plasmocitóides e linfocitóides. Geralmente neoplasias de baixo grau, que seriam aqui representadas pelos TVTs linfocitóides, possuem índices de proliferação menor (WANG *et al.*, 2005; SUZANO, 2007).

6.3.6. COX-2

Estudos sugerem que a PGE₂ inibe a apoptose pela indução da expressão do proto-oncogene Bcl-2 (PRESCOTT e FITZPATRICK, 2000). Isso não foi possível observar no presente estudo devido a não marcação do Bcl-2 em nossas amostras.

Em mastocitomas cutâneos caninos, a expressão de COX-2, utilizando-se anticorpo primário policlonal, foi maior nos tumores grau III, seguidos pelo grau II e I, porém em todos os graus de diferenciação histológica, a imunomarcação foi superior a 50% e de intensidade semelhante (CALDERON, 2005).

Nos tumores mamários de cadelas, a expressão de COX-2 foi diferente entre os tumores benignos e malignos e entre os carcinomas metastáticos e não metastáticos, sendo maior neste último grupo, o que confere a esta imunomarcação um potencial preditivo de possibilidade de metástase (DORE *et al.*, 2003; DeNARDI *et al.*, 2005).

Os 30 casos de TVT analisados neste estudo apresentaram expressão de COX-2 (Figura 5b). Os valores variaram de 90,66 a 100% de positividade em 200 células contadas, exceto por um caso que apresentou 24,50% de positividade. Desta forma, não há diferença entre os tumores menos agressivos e mais agressivos. A correlação entre tumores metastáticos e não metastáticos não foi realizada nesse estudo, uma vez que nos casos onde o tumor apresentava metástase, coletou-se material apenas das massas primárias.

Em um estudo, piroxicam foi dado para cães com tumores de ocorrência natural e respostas parciais foram obtidas (KNAPP *et al.*, 1992). Devido a alta

expressão de COX-2 nos casos de TVT aqui estudados, sugere-se que nos casos mais resistentes ao tratamento com vincristina, possa-se associar inibidores de COX-2 ao tratamento.

Quando realizado o teste não paramétrico de correlação de Spearman, com nível de significância ($p < 0,05$), quando comparado a expressão da COX-2 com a caspase-3 total houve correlação significativa ($p = -0,20$).

Comparando a expressão da COX-2 com o Ki-67, também houve correlação significativa ($p = -0,01$). Isso é devido ao fato que quando há alta expressão de COX-2, há diminuição da apoptose, e um aumento da proliferação celular, o que foi observada pela baixa taxa de positividade para caspase-3 nos TVTs e média positividade para Ki-67. Porém, quando correlacionado COX-2 com survivina, não houve diferença significativa ($p = 0,16$). Sugere-se que a alta expressão da COX-2 é devida a sua ação na promoção da angiogênese, uma vez que os TVTs são altamente irrigados e hemorrágicos.

Uma observação feita durante as análises das lâminas de TVT, é que a distribuição da marcação da COX-2 era, na maioria dos casos, como “dots” perinucleares. Não há na literatura consultada nenhuma descrição desse tipo de marcação em outras neoplasias, deste modo seria interessante a investigação se esta marcação está relacionada com o grau de agressividade tumoral, ou não há nenhuma influência, uma vez que nos casos da caspase-3, o tipo de marcação também se torna útil (Figura 5b).

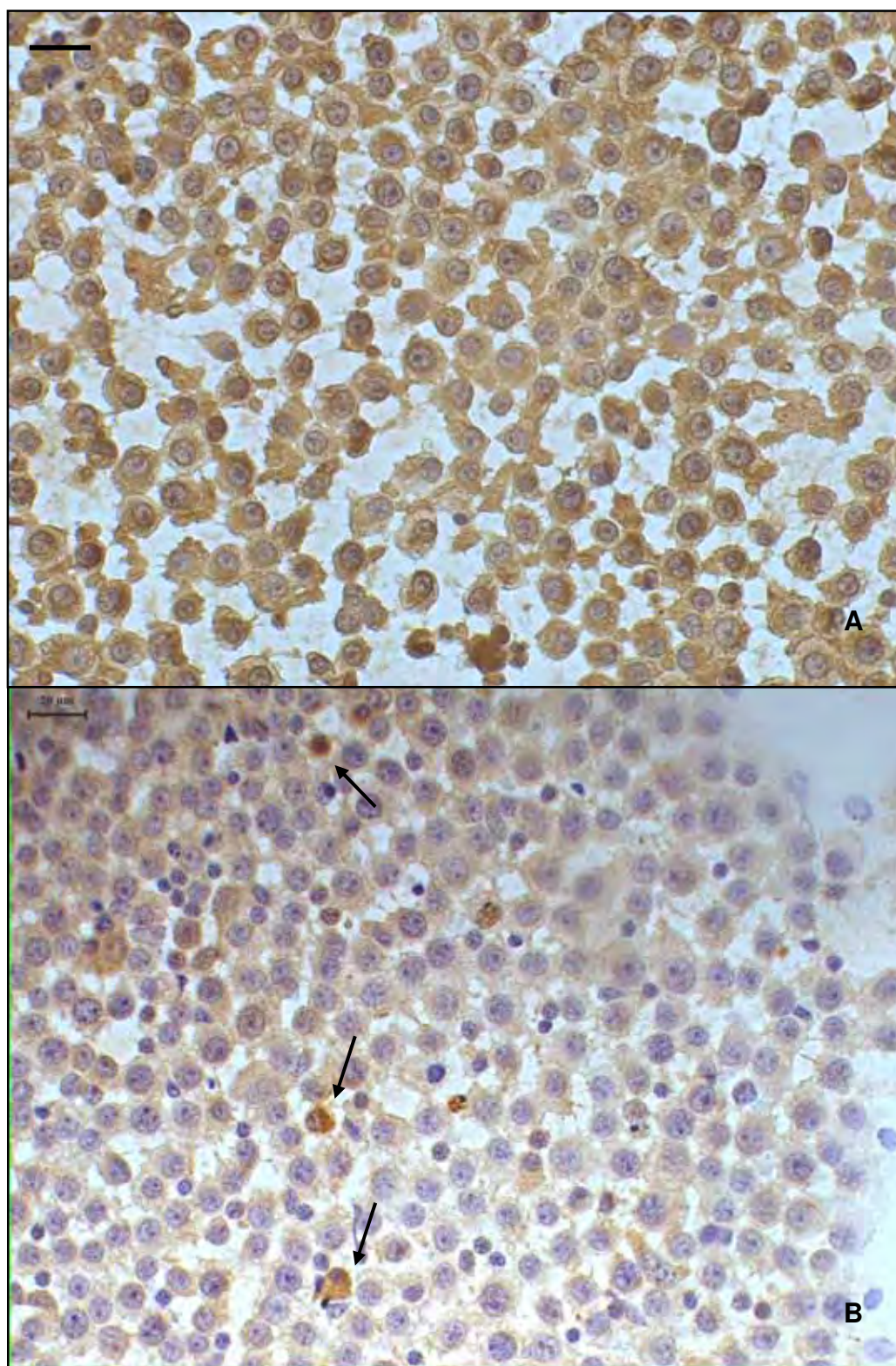


FIGURA 4 – Marcação pelos anticorpos em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível (TVT) canino: **A.** anticorpo monoclonal anti-survivina; **B.** anticorpo policlonal anti-caspase-3; células com marcação citoplasmática (setas). Cromógeno DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris; barra: 20µm.

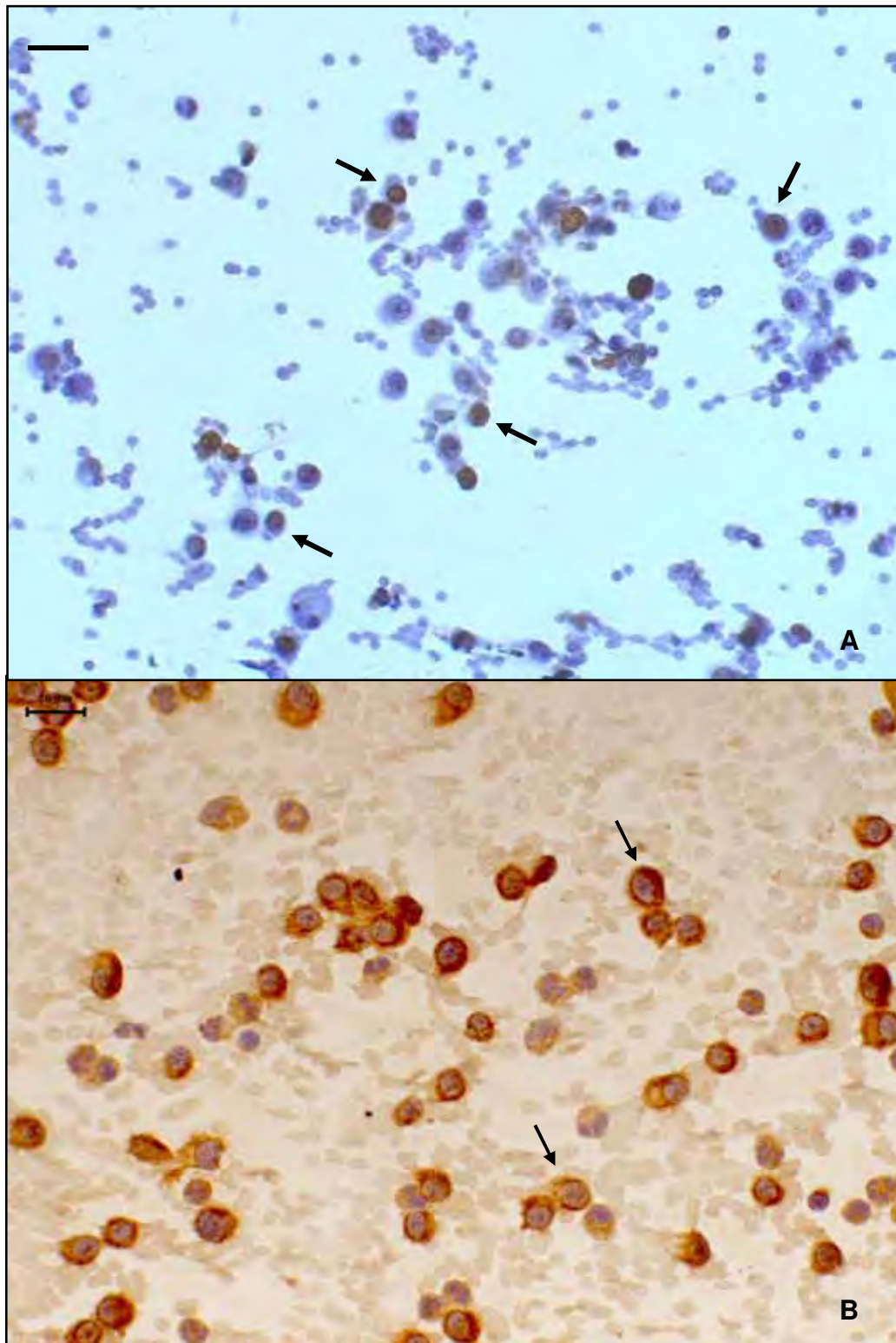


FIGURA 5 – Marcação pelos anticorpos em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível (TVT) canino: **A.** anticorpo monoclonal Ki-67 (clone Mib-1); células com marcação nuclear (setas); **B.** anticorpo monoclonal anti-COX-2; observar marcação ao redor do núcleo (setas). Cromógeno DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris; barra: 20 μ m.

5.4. Análise citogenética

5.4.1. Sangue periférico – cultura de linfócitos

O cariótipo do cão doméstico (*Canis familiaris*) é amplamente aceito como um dos cariótipos de mamíferos mais difíceis de trabalhar (BREEN *et al.*, 1999). O alto número de cromossomos diplóides e suas similaridades morfológicas causam dificuldades em distinguir os autossomos menores. Pelo uso do bandeamento G, apenas os 21 autossomos maiores e os cromossomos sexuais foram padronizados internacionalmente e estabelecidos em um cariótipo padrão (SWITONSKI *et al.*, 1996; BREEN *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2000). Os 17 autossomos remanescentes não podem ser identificados apenas por padrões de bandeamento, e o uso de marcadores moleculares é necessário para distingui-los (GRAPHODATSKY *et al.*, 2000).

Nas lâminas de sangue periférico coletadas durante este experimento, coradas com solução de Giemsa, observou-se que as células apresentaram o número de cromossomos diplóide normal ($2n=78$). Todos os cromossomos apresentaram morfologia normal, ou seja, os autossomos acrocêntricos e os sexuais submetacêntricos, sendo o cromossomo X de maior tamanho, conforme relatos anteriores (AWA *et al.*, 1959; MURRAY *et al.*, 1969) (Figura 6a).

De acordo com MANOLACHE *et al.* (1976), PATHAK e WURTER-HILL (1977) e PATHAK *et al.* (1982), em metáfases obtidas a partir de sangue periférico de cães coradas para bandeamento-C, nas regiões centroméricas dos autossomos há uma quantidade de heterocromatina constitutiva que varia de moderada a quase indetectável. Isso também foi observado no presente estudo, conforme Figura 6b. O cromossomo X possui banda-C positiva na região centromérica e na primeira metade proximal do braço longo e o cromossomo Y apresenta braço longo corado intensamente. Segundo HATANAKA *et al.* (1996), as bandas-C positivas mais evidentes encontram-se nos centrômeros de sete a oito pares de autossomos sendo também observadas outras bandas positivas mais claras nos centrômeros de outros cromossomos no cariótipo do cão doméstico. Portanto,

variações no padrão de coloração das regiões heterocromáticas foram já descritas.

5.4.2. Células tumorais

Dos 30 casos de TVT coletados neste estudo, em apenas 11 amostras foi possível a análise citogenética das células tumorais (Anexo B). No total de 115 metáfases analisadas em solução convencional de Giemsa, observou-se que o número diplóide nas células tumorais mostrou grande desvio em relação ao número cromossômico normal para a espécie. Encontrou-se em 74,78% das células analisadas 56 a 58 cromossomos, sendo que estes apresentavam, em média, 17 cromossomos de morfologia metacêntrica ou submetacêntrica (Figura 7), concordando com os achados de KAKPAKOVA *et al.* (1968) e RICHARDSON *et al.* (1987).

A partir da análise das metáfases obtidas de amostras de sangue periférico de animais portadores de TVT bem como das amostras tumorais, constatou-se que as alterações encontradas no cariótipo limitam-se as aquelas oriundas do próprio tumor. A similaridade dos cariótipos nos TVTs caninos nos diferentes países indica a estabilidade das alterações cromossômicas nestas células.

Como o número de TVTs linfocitóides foi pequeno, não foi possível observar se há diferença na análise citogenética entre estes tumores. Devido a literatura citar, na maioria das vezes, a morfologia típica dos tumores como sendo semelhante a da linfocitóide e, como os achados neste estudo são semelhantes com os citados na literatura (no qual houve predomínio do padrão plasmocitóide), talvez não haja diferença cromossômica entre os dois tipos celulares de TVT, bem como não se conseguiu investigar se há diferenças entre o TVT encontrado em machos, dos TVTs encontrados nas fêmeas.

Nas lâminas de TVT coradas para bandeamento C, observou-se que em algumas metáfases o braço maior do segundo cromossomo submetacêntrico apresentou banda-C positiva, concordando com OSHIMURA *et al.* (1973) (Figura 7b). Porém em outras metáfases do mesmo caso, a marcação aparecia no braço

longo do quarto cromossomo. Segundo RICHARDSON *et al.* (1987), as células de TVT apresentavam bandas C-positivas na maioria dos cromossomos, com uma preferência marcante às regiões centroméricas, o que não foi observado nos casos de TVT aqui estudados.

Sugere-se que fusões cêntricas dos elementos acrocêntricos contribuíram no aumento numérico de elementos metacêntricos observados nas células do TVT, bem como houve rearranjos, como observado anteriormente por ADAMS *et al.* (1968); COHEN (1978), VERMOOTEN (1987) e ROGERS (1997).

HAHN (1998) relata que os rearranjos ocorridos nas células de TVT devem ser do tipo balanceado, ou seja, não há nem perda nem ganho de material genético e estes incluiriam translocações recíprocas e fusões cêntricas. É proposto por MAKINO *et al.* (1963) (apud RICHARDSON *et al.*, 1987) um tipo de fusão Robertsoniana que envolve fusão equivalente entre os elementos acrocêntricos envolvendo quebra nos centrômeros e originando elementos metacêntricos.

Há poucas informações disponíveis na literatura a respeito do cariótipo com bandeamento C e G nas células normais de cão, bem como em células tumorais. Estudos citogenéticos de cânceres nos cães não estão tão avançados como nos cânceres nos homens, devido problemas com a identificação de todos os cromossomos pelas técnicas de bandeamento clássicas (SWITONSKI *et al.*, 2004). SWITONSKI *et al.* (2004) relataram que há duas estratégias principais para o mapeamento citogenético: a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e a hibridização da célula somática, e que a técnica do FISH tem um papel maior na identificação dos *locus* de interesse.

JANCÁRKOVÁ *et al.* (2008) realizaram testes genéticos em câncer de ovário nas mulheres, por meio de métodos convencionais (cultura direta e bandamento G) e métodos moleculares como FISH com sondas de cromossomo inteiro e hibridização genômica comparativa (CGH). Estes autores observaram que a eficiência da cariotipagem empregando os métodos de análise convencional foi baixa, bem como utilizando a técnica de FISH. O método que se mostrou mais indicado foi o CGH. Também verificaram que pacientes com tumores contendo

menos de sete aberrações possuíam maior tempo de sobrevida apresentando melhor resposta terapêutica. O estudo mostrou que tumores com ampliações dos seguintes braços cromossômicos 1p, 10p, 20q e deleção 5q têm maior risco de recorrência; ou seja, encontraram-se associações entre fatores prognósticos bem como entre o número de aberrações nas células tumorais e prognóstico. Os autores concluíram que o número de aberrações nas células de câncer ovariano parecem ser um importante marcador prognóstico, especialmente quando associado com idades jovens.

O que foi observado por SWITONSKI *et al.* (2004) e JANCÁRKOVÁ *et al.* (2008) nos permite dizer que, o uso de técnicas moleculares no TVT pode auxiliar a dizer se há diferenciação genética entre o tipo plasmocitóide e linfocitóide bem como prever o número de aplicações de quimioterápicos necessários para a remissão do TVT. Segundo GASPAR (2005), o número de aplicações varia de acordo com o tipo celular do TVT e que, quanto maior o número de atipias celulares, maior o número de aplicações e segundo JANCÁRKOVÁ *et al.* (2008) tumores com menos aberrações teriam uma melhor resposta terapêutica.

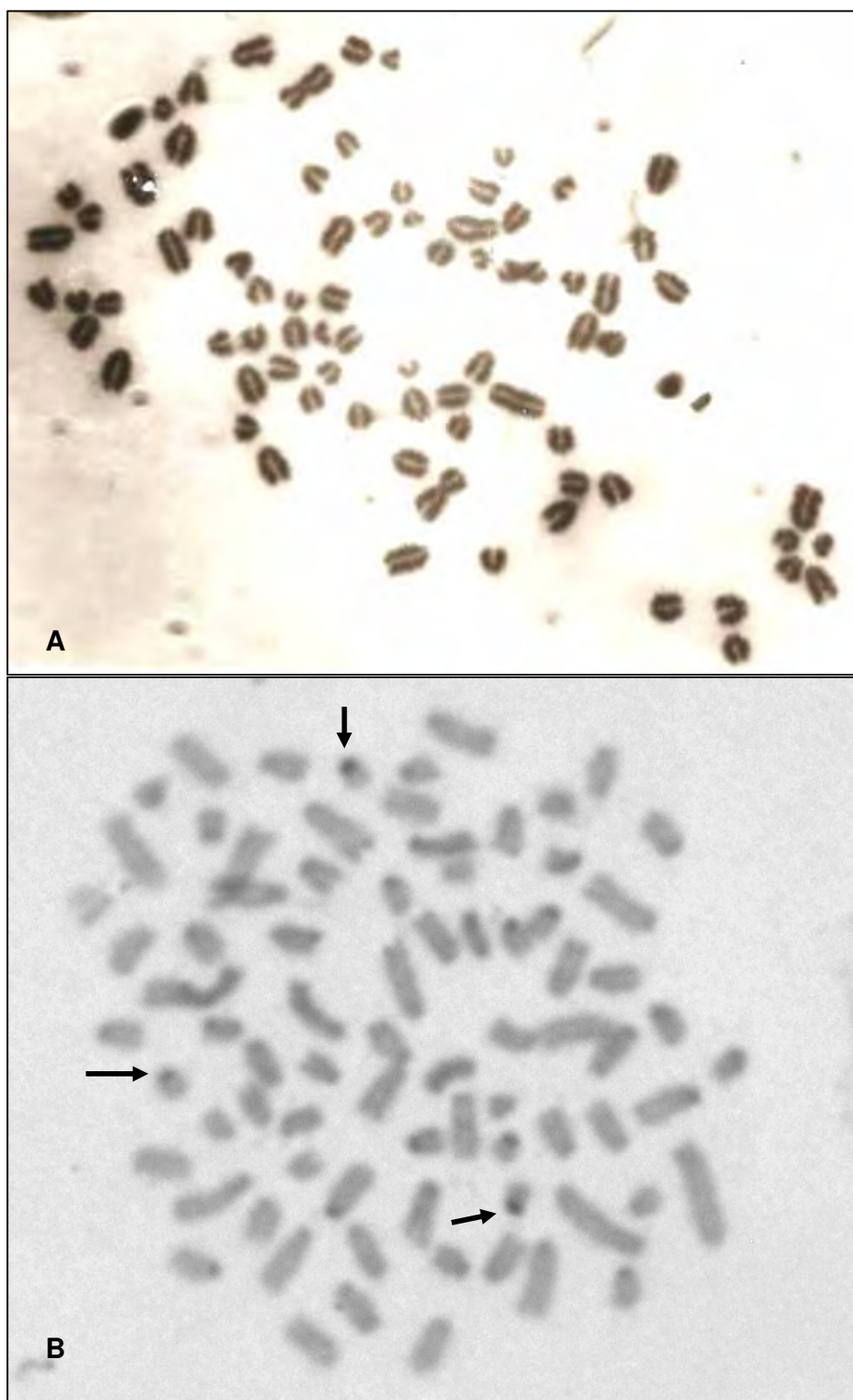


FIGURA 6 - Fotomicrografia de metáfases representativas - sangue periférico de cão normal: **A.** Coloração convencional (Giemsa); **B.** Banda C – observar regiões centroméricas coradas para o bandeamento C (setas).

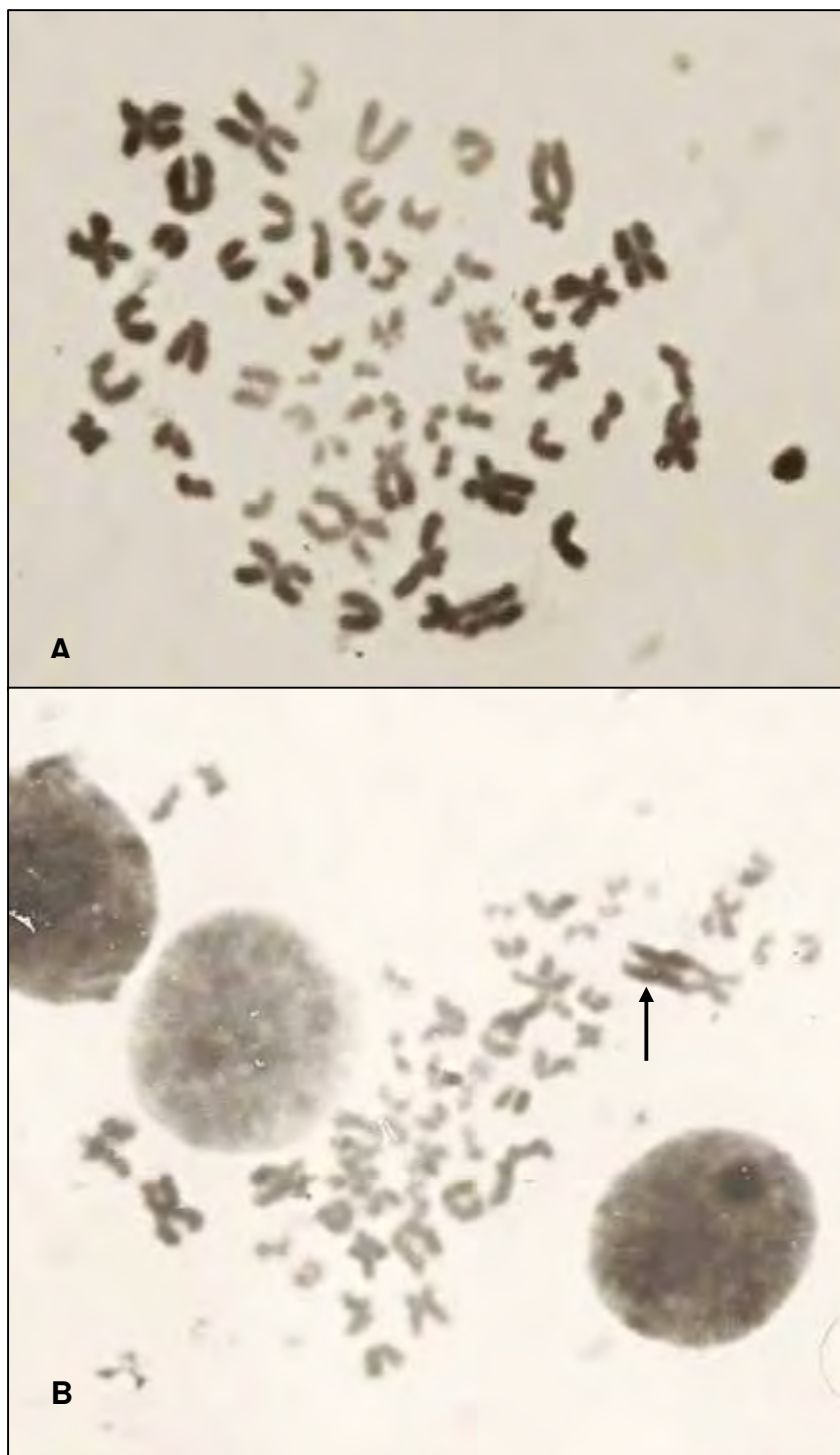


FIGURA 7 - Fotomicrografia de metáfases representativas - amostra de TVT: **A.** Coloração convencional (Giemsa); **B.** Banda C, a seta mostra a positividade do bandeamento-C no braço maior do segundo cromossomo submetacêntrico.



“A felicidade não está no fim da jornada, e sim em cada curva do caminho
que percorremos para encontrá-la.”
Autor Desconhecido

6. CONCLUSÕES

- A prevalência no Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu do diagnóstico citopatológico de TVT é o de aspecto plasmocitóide. Estes achados indicam diagnóstico tardio, sendo que durante o período de evolução ocorrem alterações na morfologia da célula tumoral, na fase de implantação, linfocitóide e posteriormente plasmocitóide;

- As células do TVT expressaram survivina, caspase-3, Ki-67 e COX-2. Por outro lado, não expressaram Bcl-2 e nem Bcl-6.

- A correlação estatística entre imunofenotipagem positiva e a morfologia celular do tumor foi prejudicada devido à quantidade inferior de casos de diagnósticos de TVT de padrão linfocitóide em relação ao plasmocitóide, tal como visto em pesquisas anteriores realizadas pelo grupo;

- O bandeamento C e a coloração convencional dos cromossomos foram realizados nas células de TVT, não foi possível observar diferença estatística na análise citogenética entre as diferentes morfologias do TVT devido à escassez de casos com diagnósticos de TVT linfocitóide em relação ao plasmocitóide.



"Ninguém deve se envergonhar por descobrir ter estado errado a vida inteira; isso significa que a pessoa está mais madura e mais inteligente hoje do que ontem."
Jonathan Swift

7. PERSPECTIVAS

- Tentar associar o aspecto macroscópico com a classificação citomorfológica do TVT, bem como com a duração e tipo do tratamento, alterações cromossômicas, tamanho celular e imunofenotipagens.

- Buscar compreender as alterações cariotípicas do TVT, utilizando ferramentas moleculares mais recentes.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

"Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo... Mas é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade..."

Walt Disney

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADAMS, E.W.; SAPP, W.J.; CARTER, L.P. Cytogenetic observations on the canine venereal tumor in long-term culture. **Cornell Vet.**, Ithaca, v.71, p.336-346, 1981.

ALBANESE, F. et al. Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with *Leishmania*-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin? **Vet. Dermatol.**, Oxford, v.13, n.5, p.243-246, 2002.

ALTIERI, D.C. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. **Prog. Cell Cycle Res.**, v.5, p.447-452, 2003.

ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. **Manual de imuno-histoquímica**. 1.ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. 270p.

AMARAL, A.S. **Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA**. 2005, 228f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

AMARAL, A.S. et al. Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003). **Rev. Port. Ciênc. Vet.**, Lisboa, v.99, n.551, 2004.

ANDRADE, F.H.E. **Detecção de inseticidas piretróides em tecido adiposo de neoplasia maligna de mama em cadelas**. 2008, 67f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

AOYAGI, K. et al. The expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, p21, and apoptosis in primary gastric lymphoma. **Surgery**, Saint Louis, v.132, n.1, p.20-26, 2002.

AWA, A.; SASAKI, M.; TAKAYAMA, S. An in vitro study of the somatic chromosomes in several mammals. **Jap. J. Zool.**, Tokyo, v.12, p.257-265, 1959.

BAKHLE, Y.S. COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. **Br. J Pharmacol.**, London, v.134, p.1137-1150, 2001.

BARCINSKI, M.A. Morte celular. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. (Eds). **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.57-63.

* Normas para referências bibliográficas ABNT - 2002

- BASSANI-SILVA, S. **Efeito da própolis sobre a agressividade do tumor venéreo transmissível canino: ensaios *in vitro***. 2005, 104f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BASSANI-SILVA, S. et al. Tumor venéreo transmissível – revisão. **Revista Pet & Food & Health & Care**, São Paulo, n.2, p.77-82, 2003.
- BEAM, S.L. et al. An immunohistochemical study of ciclooxigenase-2 expression in various feline neoplasms. **Vet. Pathol.**, Washington, v.40, n.5, p.496-500, 2003.
- BÉRGAMO, N.A. **Análise citogenética e molecular (oncogene K-RAS) em leiomiomas uterinos**. 1995, 128p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- BOL, D.K. et al. Cyclooxygenase 2 overexpression in the skin of transgenic mice results in supression of tumor development. **Cancer Res.**, Baltimore, v.62, n.9, p.2516-2521, 2002.
- BOSCOS, C.M.; TONTIS, D.K.; SAMARTZI, F.C. Cutaneous involvement of TVT in dogs: a report of two cases. **Canine Pract.**, Santa Barbara, v.24, n.4, p.6-11, 1999.
- BRANDÃO, C.V.S. et al. Tumor venéreo transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998 - 2000). **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, São Paulo, v.5, n.1, p.25-31, 2002.
- BREEN, M. et al. FISH mapping and identification of canine chromosomes. **J. Heredity**, Washington, v.90, n.4, p.27-30, 1999.
- CALDERON, C. **Avaliação da expressão da cicloxigenase 2 e do índice de proliferação celular dos matocitomas cutâneos caninos pela histopatologia, histoquímica e imunoistoquímica**. 2005, 106f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- CALVERT, C.A. Transmissible venereal tumor in the dog. In: KIRK, R.W. **Current veterinary therapy**. Philadelphia: Saunders, 1983. p.413-415.
- CAO, Y.; PRESCOTT, S.M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **J. Cell. Physiol.**, Philadelphia, v.190, n.3, p. 279-86, 2002.
- CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. **Exp. Cell Res.**, New York, v.60, p.315-319, 1970.
- CANIATTI, M. et al. Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. **Vet. Pathol.**, Washington, v.33, n.2, p.204-212, 1996.
- COHEN, D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. **Adv. Cancer Res.**, New York, v.43, p.75-112, 1985.
- COHEN, D. The transmissible venereal tumor of the dog – a naturally occurring allograft? A review. **Isr. J. Med. Sci.**, Jerusalem, v.14, n.1, p.14-19, 1978.

- COSTA, R.M.A.; MENCK, C.F.M. Genes de reparo de DNA. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. (Eds). **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.43-55.
- COWELL, R.L.; TYLER, R.D. Cytology of cutaneous lesions. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, Philadelphia, v.19, n.4, p.769-794, 1989.
- DALECK, C.L.M. et al. Avaliação de diferentes métodos diagnósticos do tumor venéreo transmissível (T.V.T.) em cães. **Ars Vet.**, Jaboticabal, v.3, n.2, p.187-194, 1987.
- DANK, G. et al. Bcl-2 and MIB-1 labeling indexes in cats with lymphoma. **J. Vet. Intern. Med.**, Lawrence, v.16, p.720-725, 2002.
- DAS, U.; DAS, A.K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Vet. Res. Commun.**, Amsterdam, v.24, n.8, p.545-556, 2000.
- DeNARDI, A.B. **Correlação da ciclooxygenase-2 com Ki-67, p53 e caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas**. 2007, 91f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- DEVERAUX, Q.L.; REED, J.C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v.13, p.239-252, 1999.
- DOMINGUES, M.A.C. **Significado Prognóstico da Expressão da Survivina e do p53 no Linfoma de Grandes Células B Difuso**. 2006, 87f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- DONG, M. et al. Inverse association between phospholipase A2 and COX-2 expression during mouse colon tumorigenesis. **Carcinogenesis**, Oxford, v.24, n.2, p.307-15, 2003.
- DONOGHUE, S. et al. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma. **Cancer Res.**, Baltimore, v.59, n.20, p.5386-5391, 1999.
- DORÉ, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. **Vet. Pathol.**, Washington, v.40, p.207-212, 2003.
- DU, J. et al. Expression of survivin, caspase-3 and p53 in surgical margin of laryngeal squamous cell carcinoma and their relationship. **Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi**, v.22, n.3, p.117-118, 2008.
- DUKERS, D.F. et al. Apoptosis in B-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues always involves activation of caspase-3 as determined by a new in situ detection method. **J. Pathol.**, Sussex, v.196, n.3, p.307-315, 2002.
- EBERHART, C.E. et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.107, n.4, p.1183-1888, 1994.
- 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. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, Hannover, v.107, n.5, p.175-180, 2000.

- FERREIRA, A.J.A. et al. Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. **J. Small Anim. Pract.**, Oxford, v.41, n.4, p.165-168, 2000.
- FISHMAN, A. et al. Comparing the genetic changes detected in the primary and secondary tumor sites of ovarian cancer using comparative genomic hybridization. **Int. J. Gynecol. Cancer**, Cambridge, v.15, p.261-266, 2005.
- FRANKS, L.M. O que é câncer? In: FRANKS, L.M.; TEICH, N. (Eds). **Introdução a biologia celular e molecular do câncer**. São Paulo: Roca, 1990. p.1-24.
- GASPAR, L.F.J. **Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com danos citogenéticos, taxa de proliferação e resposta clínica à quimioterapia**. 2005, 143f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- GERDES, J. et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v.138, p.867-873, 1991.
- GIANELLI, U. et al. BCL-6 gene mutations in primary cutaneous B-cell lymphomas. **Haematologica**, Roma, v.89, n.5, p.624-626, 2004.
- GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D.J. (Ed.) **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Iowa: Ames, 2002. p.45-117.
- GRAPHODATSKY, A.S. *et al.* A comparative chromosome map of the Arctic fox, red fox and dog defined by chromosome painting and high resolution G-banding. **Chromosom. Res.**, Oxford, v.8, p.253-263, 2000.
- GREATTI, W.F.P. et al. Índices proliferativos do tumor venéreo transmissível canino pelas técnicas do CEC e Ki-67 na citologia aspirativa com agulha fina. **Arch. Vet. Sci.**, Curitiba, v.9, n.1, p.53-59, 2004.
- GREEN, D.R. Apoptotic pathways: the roads to ruin. **Cell**, Cambridge, v.94, n.6, p.695-698, 1998.
- GREEN, D.; KROMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? **Trends Cell Biol.**, Cambridge, v. 8, n.7, p.267-271, 1998.
- GRIFFEY, S.M.; KRAEGEL, S.A.; MADEWELL, B.R. Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferating cell nuclear antigen (PCNA), ki-67 (MIB-1) and mitotics counts. **J. Comp. Pathol.**, Liverpool, v.120, p.321-332, 1999.
- GROSS, T.L. et al. Transmissible venereal tumor. In: GROSS, T.L. et al. (Eds.) **Skin diseases of the dog and cat – clinical and histopathologic diagnosis**. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 2005. p.800-803.

- GROSSMAN, H. B. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. **Urol. Oncol.**, v.22, n.3, p.265, 2004.
- HAHN, K.A. Chromosomal changes associated with cancer. In: MORRISON, W.B. (Ed). **Cancer in dogs and cats: medical and surgical management**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. p.53-59.
- HANSEN, M.F.; CAVENEE, W.K. Genetics of cancer predisposition. **Cancer Res.**, Baltimore, v.47, n.21, p.5518-5527, 1987.
- HAZAN, C. et al. Evaluation of the proliferative marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma. **Cancer**, Philadelphia, v.95, p.634-640, 2002.
- HASLER, A.H.; WEBER, W.T. Theriogenology question of the month. Transmissible venereal tumor (TVT). **J. Amer. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.216, n.10, p.1557-1559, 2000. Errata em: Theriogenology question of the month. **J. Amer. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.217, n.1, p.42, 2000.
- HATANAKA, E. **Contribuição à citogenética de *Caninae***. 1996, 112f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- HATAKA, A. **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas**. 2003, 90f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- HAWK, E.; LUBET, R.; LIMBURG, P. Chemoprevention in hereditary colorectal cancer syndromes. **Cancer**, Philadelphia, v.86, p.2551-2563, 1999.
- HAYES JR, H.M. et al. Canine transmissible venereal tumor: a model for Kaposi's sarcoma? **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.117, n.1, p.108-109, 1983.
- HEIM, S.; MITELMAN, F. Primary chromosome abnormalities in human neoplasia. **Adv. Cancer Res.**, New York, v.52, p.1-43, 1989.
- HSIAO, Y.W. et al. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.87, p.19-27, 2002.
- IQBAL, S.; ANDERSON, T.J.; MARSON, L.P. MIB-1 assessments in breast cancers. **Breast**, Edinburg, v.11, n.3, p.252-256, 2002.
- IKEGUCHI, M. et al. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. **Diagn. Mol. Pathol.**, New York, v.11, n.1, p.33-40, 2002.
- JANČÁRKOVÁ, N. et al. Chromosomal rearrangements and their relations to histopathological and clinical parameters in epithelial ovarian cancer. **Folia Biol.**, Praha, v.54, p.58-64, 2008.

- KAKPAKOVA, E.S. et al. Peculiarities of the karyotype of the transmissible sarcoma cells in the dog. **Vopr. Onkol.**, Leningrad, v.14, p.43-50, 1968.
- KAUR, P. et al. Survivin and Bcl-2 expression in prostatic adenocarcinomas. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.128, n.1, p.39-43, 2004.
- KIUPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Vet. Pathol.**, Washington, v.36, n.4, p.292-300, 1999.
- KNAPP, D.W. et al. Phase I trial of piroxicam in 62 dogs bearing naturally occurring tumors. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, Berlin, v.29, n.3, p.214-218, 1992.
- KNAUER, S.K. et al. Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. **FASEB J.**, Bethesda, v.21, p.207-216, 2007.
- KONSTANTINIDOU, A.E. et al. Caspase-3 immunohistochemical expression is a marker of apoptosis, increased grade and early recurrence in intracranial meningiomas. **Apoptosis**, v.12, p.695-705, 2007.
- KUROSU, K. et al. BCL-6 Mutations in Pulmonary Lymphoproliferative Disorders: Demonstration of an Aberrant Immunological Reaction in HIV-Related Lymphoid Interstitial Pneumonia **J. Immunol.**, Baltimore, v.172, n.11, p.7116-7122, 2004.
- LI, F. et al. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? **Int. J. Cancer**, New York, v.114, n.4, p.509-512, 2005a.
- LI, Z. et al. BCL-6 negatively regulates expression of the NF-kappaB1 p105/p50 subunit. **J. Immunol.**, Baltimore, v.174, n.1, p.205-214, 2005b.
- LIAO, K.W. et al. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.92, n.3-4, p.149-162, 2003.
- LIAO, Y.; LI, F.; HU, X. Expression and clinical significance of OPN and COX-2 in osteosarcoma. **ChinGer. J. Clin. Oncol.**, v.6, n.4, p.378-382, 2007.
- LOHR, C.V. et al. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with post fixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. **Vet. Pathol.**, Washington, v.34, p.212-221, 1997.
- MacEWEN, E.G. Transmissible venereal tumor. In: WITHROW, S.J., MacEWEN, E.G. (Eds). **Small animal clinical oncology**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p.651-656.
- MANNING, F.C.; PATIERNO, S.R. Apoptosis: inhibitor or instigator of carcinogenesis? **Cancer Invest.**, New York, v.14, n.5, p.455-465, 1996.
- MANOLACHE, M.; ROSS, W.M.; SCHIMD, M. Banding analysis of the somatic chromosomes of the domestic dog (*Canis familiaris*). **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, v.18, p.513-518, 1976.

- MAO, X.Y. et al. COX-2 expression in gastric cancer and its relationship with angiogenesis using tissue microarray. **World J. Gastroenterol.**, v.13, n.25, p.3466-3471, 2007.
- MARCHAL, T. et al. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumor. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.57, n.1-2, p.1-11, jun. 1997.
- MARTINEZ, A. et al. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.164, n.2 p.501-510, 2004.
- MAY, P.; MAY E. p53 et cancer. **Pathologie-Biologie**, Paris, v.43, n.3, p.165-173, 1995.
- MIHARA, M. et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. **Mol. Cell**, Cambridge, v.11, n.3, p.577-590, 2003.
- MIN, D.L. et al. Point mutation of 5' noncoding region of BCL-6 gene in primary gastric lymphomas. **World J. Gastroenterol.**, v.11, n.1, p.51-55, 2005.
- MOHANTY, G.C.; RAJYA, B.S. Growth and morphological characteristics of canine venereal tumor cells in vitro. **Vet. Pathol.**, Washington, v.14, n.4, p.420-425, 1977.
- MOORHEAD, P.S. et al. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. cell res.**, New York, v.20, p.613-616, 1960.
- MORALES, S.E.; GONZÁLEZ, C.G. The prevalence of transmissible venereal tumor in dogs in Mexico City between 1985 and 1993. **Veterinaria Mexico**, Mexico, v.26, n.3, p.273-275, 1995.
- MOZOS, E. et al. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. **Vet. Pathol.**, Washington, v.33, n.3, p.257-263, 1996.
- MUKARATIRWA, S.; GRUYS, E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. **Vet. Q.**, The Hague – Holanda, v.25, n.3, p.101-111, 2003.
- MURRAY, M. et al. A study of the cytology and karyotype of the canine transmissible venereal tumor. **Res. Vet. Sci.**, v.10, p.565-568, 1969.
- MURATA, H. et al. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v.94, n.2, p.451-455, 1999.
- MURGIA, C. et al. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. **Cell**, Cambridge, v.126, n.3, p.477-487, 2006.
- NASSAR, A. et al. Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v.16, n.2, p.113-120, 2008.
- NICHOLSON, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. **Cell Death Differ.**, v.6, n.11, p.1028-1042, 1999.

- OSHIMA, M. et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta 176 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **Cell**, Cambridge, v. 87, p. 803-809, 1996.
- OSHIMURA, M.; SASAKI, M.; MAKINO, S. Chromosomal banding patterns in primary and transplanted venereal tumors of the dog. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v.51, n.4, 1973.
- PASQUALUCCI, L. et al. Mutations of the *BCL6* proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v.101, n.815, 2003.
- PATHAK, S.; WURSTER-HILL, D.H. Distribution of constitutive heterochromatin in carnivores. **Cytogenet. Cell Genet.**, Basel, v.18, p.245-254, 1977.
- PATHAK, S.; VanTUINEN, P.; MERRY, D.E. Heterochromatin, synaptonemal complex, and NOR activity in the somatic and germ cells of a male domestic dog, *Canis familiaris* (Mammalia, Canidae). **Cytogenet. Cell Genet.**, Basel, v.34, p.112-118, 1982.
- PEDERSEN, L.M.; JURGENSEN, G.W.; JOHNSEN, H.E. Serum levels of inflammatory cytokines at diagnosis correlate to the bcl-6 and CD10 defined germinal centre (GC) phenotype and bcl-2 expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.128, n.6, p.813-819, 2005.
- PÉREZ, J. et al. Primary extragenital occurrence of transmissible venereal tumors: three case reports. **Canine Pract.**, Santa Barbara, v.19, n.1, p.7-10, 1994.
- PHILLIPS, B.S. et al. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v.12, n.2, p.111-117, 2000.
- PRESCOTT, S.M.; FITZPATRICK, F.A. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis **Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer**, Amsterdam, v.1470, n.2, p.M69-M78, 2000.
- PRESTON-MARTIN, S. et al. Increased cell division as a cause of human cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v.50, p.7415-7421, 1990.
- RECHAVI, G.; KATZIR, N.; RAMOT, B. Kaposi's sarcoma among AIDS patients: transmissible venereal tumor by cell engraftment? **Med. hypotheses**, Penrith, v.34, n.4, p.380-341, 1991.
- REED, J.C. The surviving saga goes in vivo. **J. Clin. Invest.**, New York, v.108, p.965-969, 2001.
- RICHARDSON, V.B.; SAPP, W.J.; ADAMS, E.W. The distribution of C-bands in canine transmissible venereal tumor cells. **Cornell Vet.**, Ithaca, v.77, n.2, p.161-167, 1987.
- ROBERT, M.; FRIEDLANDER, M.D. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. **N. Engl. J. Med.**, v.348, n.14, p.1365-1375, 2003.

- ROESL, S.; TILMANT, R.; DUCATELLE, R. p53 expression and apoptosis in melanomas of dogs and cats. **Res. Vet. Sci.**, v.70, p.19-25, 2001.
- ROGERS, K.S. Transmissible venereal tumor. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, Princeton, v.19, n.9, p.1036-1045, 1997.
- ROGERS, K.S.; WALKER, M.A.; DILLON, H.B. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, Lakewood, v.34, n.6, p.463-470, 1998.
- SARLI, G. et al. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v.14, p.25-34, 2002.
- SARSOTTI, E. et al. Bcl-6 mutation status provides clinically valuable information in early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, v.18, p.743-746, 2004.
- SCHERES, V.M.J.C. Identification of two Robertsonian translocations with a Giemsa banding technique. **Hum. Genet.**, New York, v.15, n.3, p.253-256, 1972.
- SCHMITZ, K.J. et al. Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for overall survival in intrahepatic cholangiocarcinoma. **Virchows Arch.**, Berlin, v.450, p.135-141, 2007.
- SHARMA, H. et al. Combined evaluation of expression of telomerase, survivin, and anti apoptotic Bcl2 family members in relation of differentiation and apoptosis in human head and neck cancers. **Head Neck**, New York, v.26, n.8, p.733-740, 2004.
- SILVA, R.L.A. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. (Eds). **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.29-42.
- SLAUSON, O.D.; COOPER, B.J. **Mechanisms of disease**. 3. ed. Missouri: Gosby, 2002. 445 p.
- SOBRAL, R.A.; TINUCCI-COSTA, M.; CAMACHO, A. Ocorrência do tumor venéreo transmissível em cães na região de Jaboticabal. **Ars Vet.**, Jaboticabal, v.14, n.1, p.1-10, 1998.
- SONH, S.K. et al. Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. **Am. J. Hematol.**, New York, n.70, p.101-107, 2003.
- STAEBLER, A. et al. Micropapillary serous carcinoma of the ovary has distinct patterns of chromosomal imbalances by comparative genomic hybridization compared with atypical proliferative serous tumors and serous carcinomas. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.33, p.47-52, 2002.
- STUART-HARRIS, R. et al. Proliferation markers and survival in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. **Breast**, Greenwich, v.17, n.4, p.323-334, 2008.
- SUMMER, A.T. A sample technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, New York, v.75, p.304-306, 1972.

SURH, Y.J. et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.480-481, p.243-68, 2001.

SUZANO, S.M.C. **Avaliação da proliferação celular, índice apoptótico e da expressão do p53 nos linfomas caninos.** 2007, 73p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SWITONSKI, M. et al. Report on the progress of standartization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. Committee for the Standardized Karyotype of the Dog (*Canis familiaris*). **Chromosom. Res.**, Oxford, v.4, p.306-309, 1996.

THOMPSON, H.J.; STRANGE, R.; SCHEDIN, P.J. Apoptosis in the genesis and prevention of cancer. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, Philadelphia, v.1, p.597-602, 1992.

TINUCCI-COSTA, M. Canine transmissible venereal tumor. **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, São Paulo, v.2, n.3, p.46-52, 1999.

TONINI, G. et al. Nuclear and cytoplasmic expression of survivin in 67 surgically resected pancreatic cancer patients. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v.92, p.2225-2232, 2005.

TSUJII, M. et al. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.94, p.3336-3340, 1997.

USHIDE, T. et al. Expression of survivin mRNA in dog tumors. **DNA Seq.**, England, v.16, n.5, p.329-334, 2005.

VANE, J.R. et al. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev Pharmacol Toxicol**, v.38, p.97-120, 1998.

VARASCHIN, M.S. et al. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais; formas de apresentação clínico-patológicas. **Clin. Vet.**, São Paulo, v.6, n.32, p.332-338, 2001.

VERMA, R.S. Oncogenetics: a new emerging field of cancer. **Mol. Gen. Genet.**, v.205, p.385-389, 1986.

VERMOOTEN, M.I. Canine transmissible venereal tumour (TVT): a review. **J./S. Af. Vet. Assoc.**, Pretoria, v.58, n.3, p.147-150, 1987.

WANG, W.; DUBOIS, R.N. Cyclooxygenase-2 derived prostaglandin E₂ regulates the angiogenic switch. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.101, n.2, p.415-416, 2004.

WANG, S.A. et al. Low histologic grade follicular lymphoma with high proliferation index: morphologic and clinical features. **Am. j. surg. pathol.**, New York, v.29, p.1490-1496, 2005.

WELLMAN, M.L. The cytologic diagnosis of neoplasia. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, Philadelphia, v.20, n.4, p.919-938, 1990.

WENDUM, D. et al. Cyclooxygenase-2 and its role in colorectal cancer development. **Virchows Arch.**, Berlin, v.445, p.327-333, 2004.

WESTPHAL, S.; KALTHOFF, H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. **Mol. Cancer**, v.2, n.6, 2003.

XIE, D. et al. Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin in primary and secondary human glioblastoma. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v.94, p.108-114, 2006.

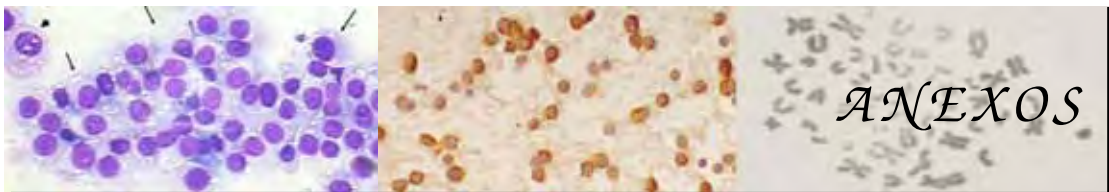
YANG, T.J. Transmissible venereal neoplasia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v.139, n.8, p.979-980, 1981.

YANG, F. et al. Chromosome identification and assignment of DNA clones in the dog using a red fox and dog comparative map. **Chromosom. Res.**, Oxford, v.8, p.93-110, 2000.

YANG, W.Y. et al. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. **J. Comp. Path.**, v.134, p.70-79, 2006.

YUNIS, J.J. Mid-prophase human chromosomes. The attainment of 2000 bands. **Hum. Genet.**, New York, v.56, n.3, p.293-298, 1981.

ZORNIG, M. et al. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer**, Amsterdam, v.1551, n.2, p.F-1-F37, 2001.



"Ainda que sejamos inábeis ao falar, se as nossas palavras forem ditas
com amor, terão o poder de mover as pessoas."
Mokiti Okada

Caso	RG	Cito nº	Data	Cidade	Raça	Sexo	Idade	Localização	Morfol.
1	134.833	889/05	9/12/2005	Barra Bonita	SRD	M	7a	pênis	Plasmo.
2	134.866	893/05	12/12/05	Botucatu	SRD	M	5a	massa em bulbo de pênis	Plasmo.
3	140.779	871/06	15/12/06	Botucatu	SRD	M	12a	massa em bulbo peniano	Plasmo.
4	141.149	42/07	16/1/2007		SRD	M	8a	massa ulcerada em pênis	Plasmo.
5	142.273	235/07	23/3/2007	Botucatu	Cocker Amer.	M	2a 5m	massa em base de pênis	Plasmo.
6	142.176	215/07	19/3/2007	Botucatu	SRD	M	2a	Aumento de volume em pênis	Plasmo.
7	140.485	264/07	2/4/2007	Botucatu	SRD	M	3a	massa em pênis - nódulos cutâneos todo o corpo	Plasmo.
8	142.611	reprod.	18/4/2007	Botucatu	SRD	F	4a	Fragmento - vagina	Plasmo.
9	124.434	320/07	23/4/2007	Botucatu	SRD	F	3a 3m	massa assoalho vaginal	Linfo.
10	142.754	329/07	24/4/2007		SRD	M	7a		Plasmo.
11	143.060	391/07	15/5/2007	Laranjal Paulista	Poodle	F	2a 10m	nódulo em vulva	Plasmo.
12	143.080	397/07	16/5/2007	Bauru	Border C.	F	4a	nódulo vaginal	Plasmo.
13	143.185	412/07	22/5/2007	Vitoriana	SRD	F	4a	massa em vulva	Plasmo.
14	143.257	reprod.	25/5/2007	Botucatu	SRD	F	7a	massa vaginal	Plasmo.
15	143.374	434/07	4/6/2007	Botucatu	SRD	M	6a	nódulo em pênis (peça cirúrgica)	Plasmo.
16	143.486	449/07	12/6/2007	Conchas	Fox Paul.	F	04a	massa em assoalho vaginal	Linfo.
17	143.898	518/07	5/7/2007	Botucatu	Fila brasil	F	3a 6m	massa vaginal	Plasmo.
18	143.885	512/07	12/7/2007	Bofete	SRD	F	6a	massa região anal	Plasmo.
19	144.049	539/07	17/7/2007	Botucatu	SRD	M	4a	massa região prepúcio	Plasmo.
20	140.485	542/07	17/7/2007		SRD	M	3a	massa região pênis (tem tb cutâneo) - recidiva??	Plasmo.
21	144.472	614/07	14/8/2007	Itatinga	Poodle	M	6a	massa couve-flor - glande - pênis	Plasmo.
22	144.488	616/07	15/8/2007	Botucatu	SRD	M	5a	massa - couve-flor - base - pênis	Plasmo.
23	144.420	628/07	20/8/2007	Botucatu	SRD	M	14a	massa - glande	Plasmo.
24	144.616	638/07	21/8/2007	Itapetininga	SRD	M	4a	massa em pênis (tem vários nódulos cutâneos)	Plasmo.
25	144.867	681/07	4/9/2007	Botucatu	SRD	M	5a	massa friável região do bulbo peniano	Plasmo.
26	144.972	698/07	11/9/2007	Iguaçu do Tietê	SRD	F	8a	tumor vulvar	Plasmo.
27	145.160	725/07	20/9/2007	Botucatu	SRD	M	5a	nódulo em bulbo peniano	Plasmo.
28	145.277	739/07	27/9/2007	Botucatu	Poodle	M	4a	massa em prepúcio	Plasmo.
29	CCZ	"-	"-	Botucatu	SRD	F	8a	massa em vagina e ânus	Plasmo.
30	145.894	812/07	31/10/07	São Manuel	SRD	F	1a	massa vaginal	Plasmo.

ANEXO B – Número de cromossomos e metáfases analisadas nos casos de TVT.

n° cromossomos	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62
Caso												
11	-	4	-	4	1	6	-	-	-	-	-	1
	Sangue com 78 cromossomos – TUMOR com 16 metáfases											
17	-	-	-	-	-	-	7	4	-	-	-	-
	TUMOR com 11 metáfases											
18	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	TUMOR com 03 metáfases											
19	-	-	-	-	-	-	10	8	5	-	-	-
	TUMOR com 23 metáfases											
23	-	-	-	2	-	1	6	4	3	2	2	-
	TUMOR com 20 metáfases											
24	-	-	-	1	1	3	10	-	-	-	-	-
	Sangue com 78 cromossomos – TUMOR com 15 metáfases											
25	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-
	Sangue com 78 cromossomos – TUMOR com 02 metáfases											
26	50 (1)	-	-	6	1	10	-	9	2	-	-	-
	Sangue com 78 cromossomos – TUMOR com 39 metáfases											
27	-	-	-	2	-	1	1	1	-	-	-	-
	Sangue com 78 cromossomos – TUMOR com 05 metáfases											
28	-	-	-	2	-	-	-	4	-	-	-	-
	Sangue com 78 cromossomos – TUMOR com 06 metáfases											
29	-	-	-	-	3	5	6	1	-	-	-	-
	Sangue com 78 cromossomos – TUMOR com 15 metáfases											



“Não se mede o valor de um homem pelas suas roupas ou pelos bens que possui. O verdadeiro valor do homem é o seu caráter, pensamentos e a nobreza de seus ideais”.

Charles Spencer Chaplin

**TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA:
“JOURNAL OF APPLIED GENETICS”**

**CYTOGENETIC STUDIES ON NATURAL TRANSMISSIBLE VENEREAL
TUMOUR IN DOGS (*Canis familiaris*)**

RUNNING TITLE: Canine transmissible venereal tumor

Autores: Sandra BASSANI-SILVA¹
Lígia Souza Lima Silveira da MOTA*²
Valquíria SANTILONI²
Luciano Santos da FONSECA¹
Noeme Sousa ROCHA¹

¹ Department of Veterinary Clinics, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, 18618-000, Brazil.

² Department of Genetics, Biosciences Institute, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, 18618-000, Brazil.

* corresponding author: Departamento de Genética – IB - UNESP

Lígia Souza Lima Silveira da MOTA

Distrito de Rubião Júnior s/nº

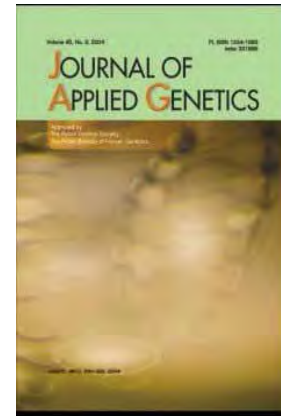
Botucatu/SP – Brasil

CEP: 18618-000

Fone/fax: + 55 14 3811-6229

e-mail: lmota@ibb.unesp.br

JOURNAL OF APPLIED GENETICS



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

JOURNAL OF APPLIED GENETICS publishes original papers, short communications (including case reports) and review articles on plant, human and animal genetics. The Journal is also open to papers on microbial genetics. The manuscript should be written in English (preferably in British English). Authors are encouraged to submit manuscripts by e-mail to mpie@igr.poznan.pl; wsob@igr.poznan.pl. Otherwise, one printed copy and a diskette or CD with the files should be sent to the Editorial Office. The text and tables should be saved in MSWord or RTF format (IBM PC), while figures, in JPEG or TIF format. Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract) and that is not under consideration elsewhere. The editors will do their best to inform the authors if the manuscript is accepted or rejected within a month of receipt. The length of the manuscript (A4 format, double-spaced, with all margins 3-4 cm) should not exceed: 15 pages for an original paper, 20 pages for a review article and 5 pages for a short communication. The first page must include the full name of the institution and the forename(s) and surname of the author to whom proofs and all correspondence will be sent, together with his/her full postal address, telephone and fax numbers and e-mail address. The submitted manuscripts are evaluated by reviewers. Every item is checked for style and grammar. The editors reserve the right to introduce corrections suggested by the journal's copy editor. Research involving human and animal subjects must have been approved by the local licensing committee (e.g. institutional review board) and a relevant statement should be included in the Materials & Methods section. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement confirming that informed consent was obtained from all subjects. Experiments involving human subjects must have been conducted according to the Declaration of Helsinki. Each original paper should principally contain the following items: (1) Title, authors names and the name of the institution where the study was carried out; (2) Abstract; (3) Key words; (4) Introduction; (5) Materials and methods; (6) Results; (7) Discussion; (8) Conclusions; (9) Acknowledgements; (10) References. Short communications and case reports should be composed of an abstract, the main body of the article (not subdivided), references and no more than one figure and/or one table. The

title should describe the contents of the paper as briefly as possible. A short running title not exceeding 45 characters, (including spaces) is also required. The abstract should give concise information on the significant content and conclusions of the paper in a form suitable for abstracting journals. It should not exceed 250 words. Key words - up to seven, should be arranged in alphabetical order and cover complete scientific names of all the studied organisms, the topic investigated and any special technique used. Abbreviations should be explained when they first appear in the text. Otherwise, only SI units and abbreviations should be used. Tables require captions and should be comprehensible without reference to the text. Graphs should be provided in Excel and they should be stored with original data. Autotypes (black and white ones are preferred) should be submitted in JPG format or TIF format with a resolution of no less than 300 dpi (at reproduction size). Diagrams and photographs should be referred to as "Figure" in the text and numbered consecutively throughout the paper. A guide to the appropriate position of each figure and table should be indicated on the margin of the text. Captions and legends to all figures should be typed on a separate sheet. Colour illustrations cost about 75 euro per printed page. References should include only published works, preferably those written in English. Citations of personal communications and unpublished results (including theses) must be avoided, unless absolutely necessary. Such citations may not appear in the reference list but only in the text as: (W. Black, pers. comm.) or (T. White 1998. Thesis, Univ. of California, Davis, CA, USA). Literature references need to be arranged alphabetically according to the first author, for example: Bai GH, Shaner G, Ohm H, 2000. Inheritance of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Theor Appl Genet* 100: 1-8. Falconer DS, Whyatt A, 1981. *Introduction to quantitative genetics*. 2nd edn. London: Longman. Kowalski JW, 1995. Clustering of highly expressed genes in rice chromosomal domains. In: Lincoln SE, Bowen D, eds. *Genetic markers in plant breeding*. Dordrecht: Kluwer Acad Publ: 553-560. Journal titles should be abbreviated according to the World List of Scientific Periodicals (or full if in doubt).

Galley proofs for correction will be sent to authors only once. Proof corrections must be marked as clearly as possible and should be returned within seven days on receipt. Twenty-five offprints will be provided free of charge.

Copyright. Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws. Permissions. Authors must obtain written permission from copyright owners for reprinting of figures, tables or text. A written permission is also necessary for a quotation from unpublished material.

Manuscripts and all editorial correspondence should be addressed to JOURNAL OF APPLIED GENETICS, Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, Poland. Tel: (+48 61) 65 50 282. Fax: (+48 61) 65 50 301. E-mail: mpie@igr.poznan.pl; wsob@igr.poznan.pl

CYTOGENETIC STUDIES ON NATURAL TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOUR IN DOGS (*Canis familiaris*)

RUNNING TITLE: Canine transmissible venereal tumor

Sandra BASSANI-SILVA¹; Lígia Souza Lima Silveira da MOTA^{*2}; Valquiria SANTILONI²; Luciano Santos da FONSECA¹; Noeme Sousa ROCHA¹

¹ Department of Veterinary Clinics, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, Sao Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, 18618-000, Brazil.

² Department of Genetics, Biosciences Institute, Sao Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, 18618-000, Brazil.

* corresponding author: Departamento de Genética – IB - UNESP

Lígia Souza Lima Silveira da MOTA

Distrito de Rubião Júnior s/nº

Botucatu/SP – Brasil

CEP: 18618-000

Fone/fax: + 55 14 3811-6229

e-mail: lmota@ibb.unesp.br

ABSTRACT

Transmissible venereal tumour (TVT) is characterized as a neoplasia of controversial origin. This study aimed to analyze, cytogenetically, TVTs of plasmocytoid and lymphocytoid morphology. For this, 30 dogs attended at the Veterinary Hospital of the School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry (FMVZ-UNESP, campus at Botucatu) were utilized. Due to the low incidence of lymphocytoid TVT (5.91%) in the region, it was not possible to make correlations between plasmocytoid and lymphocytoid types. In the analysis of metaphases obtained from peripheral blood culture, normal chromosomal pairings were observed in the species (2n=78). In 74.78% of the tumour cells analysed 56 to 58 chromosomes were found, which presented, on average, 17 chromosomes

of metacentric or submetacentric morphology. It is suggested that centric fusions of acrocentric elements contributed to the numeric increase of metacentric and submetacentric elements in TVT cells.

Key words: Cytogenetic; Chromosomal banding; Transmissible venereal tumour, dogs.

INTRODUCTION

Transmissible venereal tumour (TVT) is a round-cell neoplasia that has awakened great interest in oncology researchers due to its diverse characteristics, including its controversial origin (Mozos et al. 1996; Marchal et al. 1997; Mukaratirwa and Gruys 2003); furthermore, it constitutes an excellent investigative model for comparative neoplasia (Hsiao et al. 2002; Liao et al. 2003; Mukaratirwa and Gruys 2003). In the Pathology Service at the UNESP Veterinary Hospital, Botucatu campus – Brazil (HV-FMVZ-UNESP), it is the second most frequent neoplasia in dogs, behind only breast tumour (Amaral et al. 2004).

The cytopathological exam must be chosen for TVT diagnosis on account of its simplicity, low cost, lower risk and discomfort, besides the fact that it reduces distortion of cell morphology, which favours secure diagnosis (Daleck et al. 1987; Erunal-Maral et al. 2000; Bassani-Silva et al. 2003; Amaral et al. 2004).

In the Pathology Service of HV-FMVZ-UNESP, the TVTs have been classified as plasmocytoid, lymphocytoid or mixed (lymphoplasmocytoid), both in cytological and histological material (Amaral et al. 2004). In completed studies, plasmocytoid TVTs presented greater frequency of nuclear abnormalities, associated with greater expression of p-glycoprotein (which is related to resistance to chemotherapy in diverse tumours, principally in humans), greater resistance to antitumoural action of propolis *in vitro* and almost all cases of plasmocytoid-type metastases, shown to be more aggressive than

lymphocytoid ones (AS Amaral 2005. Thesis, FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brazil; S Bassani-Silva 2005. Dissertation, FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brazil; LFJ Gaspar 2005. Thesis, FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brazil).

Murgia et al. (2006), analysing an amplified fragment of TVT mitochondrial DNA, observed differences in the sequence between the tumours and concluded that the ancestral clone of TVT is divided into two subclasses, each of which is distributed among many countries.

The normal diploid pairing of the domestic dog (*Canis familiaris*) presents 78 chromosomes, all autosomes of acrocentric morphology, the largest submetacentric one being chromosome X while chromosome Y is the smallest of these. On the other hand, cytogenetic studies accomplished on TVT cells showed wide deviation in the chromosome number found in the normal karyotype, presenting between 57 and 59 chromosomes, among which several are of submetacentric morphology, thus suggesting the occurrence of rearrangements (Cohen 1978; Cohen 1985; Vermooten 1987; Rogers 1997; Hasler and Weber 2000; MacEwen 2001). Such rearrangements must be of a balanced type, in other words, without either loss or gain of genetic material; and these include reciprocal translocations and centric fusions (Hahn 1998).

The determination of the significance of numerical and/or structural aberrations in pathogenesis of neoplastic transformation by the study of chromosomes is important since such knowledge could be utilized in personalized patient care decisions (that is, diagnosis and/or prognosis) (Hahn 1998). According to the same author, cytogenetic studies have helped to demonstrate the clonal nature of a majority of neoplasias and to identify changes in somatic genetic sequences that occur in a neoplastic clone.

A recent work shows that certain genetic alterations can be an important adjunct to the clinical data and, potentially, may be considered a relevant new marker for predicting tumour prognosis, drug sensitivity or cancer risk (Jančarkova et al. 2008).

OBJECTIVES

To analyse, cytogenetically, samples of peripheral blood and of tumoural tissue by the techniques of conventional colouring and C- and G-bandings, for the purpose of evaluating karyotypical alterations in plasmocytoid and lymphocytoid TVTs.

MATERIAL AND METHODS

Clinical data from animals

This research was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of FMVZ-UNESP, Botucatu campus. It utilized 30 dogs attended at the Veterinary Hospital, without restriction to sex, breed or age, with cytological diagnosis of transmissible venereal tumour.

Collection of tumoural material

Confirming the diagnosis of TVT by Giemsa colouring, samples of the lesion were collected by puncture without aspiration, or by exfoliation, for confection of cytological preparations, utilised subsequently for evaluation of cell morphology, plasmocytoid or lymphocytoid, according to Amaral et al. (2004).

A second aspiration was performed, this time suspending the cells in 4.5 mL of RPMI 1640 culture medium, which was stored in polypropylene tubes for later cytogenetic analysis.

Collection of peripheral blood

Peripheral blood samples of 3 to 5 mL were collected from each animal, in previously heparinised disposable syringes (Liquemine® – Roche Laboratory) to accomplish culturing

of lymphocytes according to the technique described by Moorhead et al. (1960), with modifications.

Cytogenetic analysis

Obtainment of metaphasic tumour cells

The cell suspension was centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes. After removal of the supernatant, 5mL of hypotonic KCl solution (0.075M) was added. The material was incubated for 40 minutes at 38°C and then centrifuged again at 1500 rpm for 5 minutes. The material was fixed and washed several times in fixative solution 3:1 of methanol and acetic acid, until the supernatant was observed to be limpid. The final pellet was resuspended in 0.5 mL of fixative solution prior to preparation of the slides.

Method of chromosomal analysis

The first slide from each sample was coloured with 5% Giemsa solution in phosphate buffer 0.06M, pH 6.8 for 2 minutes. Under light microscopy metaphases were sought in these slides to calculate the modal chromosome number. In peripheral blood samples 12 cells were analysed from each animal to verify the normal karyotypic pattern of the species. In tumour samples all the metaphases found were analysed.

G- and C-bandings of both normal and tumoural cells were obtained following the procedures of Scheres (1972) and Summer (1972), respectively. Analysis of results followed the chromosomal pattern established by Switonski et al. (1996) and Reimann et al. (1999).

RESULTS

Clinical data from animals

In the experimental group constituted by 30 animals, there was a predominance of dogs Without Defined Breed (23 animals). Preferential localization of the tumour was genital (25 cases – 83.4%); there was one extragenital case (3.3%), and four cases (13.3%) in which TVT was also present extragenitally (body, ocular and anal nodules) (Figure 1).

Cytomorphological evaluation

After determination of the cytomorphological pattern of the tumour, the presence of plasmocytoid pattern was verified in 93.34% of cases, followed by lymphocytoid (6.66%) (Figure 2).

Cytogenetic analysis

In the analysis of metaphases obtained from peripheral blood, it was observed that the cells presented the normal number of normal diploid chromosomes ($2n=78$) in the species (Figure 3). The canine G-banding karyotype and its respective metaphase are displayed in Figure 4.

Cytogenetic analysis of tumour cells was possible in only 11 of the 30 TVT samples collected in this study. From the 115 total metaphases analysed in conventional Giemsa solution, it could be observed that the diploid number of these cells presented wide deviation in relation to the normal chromosome number for the species. In 74.78% of cells analysed 56 to 58 chromosomes were found, and these presented on average, 17 chromosomes of metacentric or submetacentric morphology (Figure 5). Figure 6 presents the karyotype coloured for G-banding and the respective metaphase obtained in tumour cells. The C-banding pattern in normal and tumour cells can be observed in Figure 7.

DISCUSSION

It is widely accepted that one of the most difficult mammalian karyotypes to work with is that of the domestic dog, *Canis familiaris* (Breen et al. 1999). The high number of

diploid chromosomes and their morphological similarities cause difficulties in distinguishing the smaller autosomes. By the use of G-banding, only 21 larger autosomes and the sex chromosomes have been standardized internationally and established into a standard karyotype (Switonski et al. 1996; Breen et al. 1999; Yang et al. 2000). The remaining 17 autosomes cannot be identified only by banding patterns, and the use of molecular markers is necessary to distinguish among them (Graphodatsky et al. 2000).

According to Manolache et al. (1976), Pathak and Wurter-Hill (1977) and Pathak et al. (1982), in metaphases obtained from peripheral blood of dogs coloured for C-banding, in the centromeric regions of the autosomes there is a quantity of constituted heterochromatin that varies from moderate to almost undetectable. This was also observed in the present study. The X chromosome possesses positive C-marking in the centromeric region and in the first proximal half of the long arm and chromosome Y presents an intensely coloured long arm. According to E Hatanaka 1996 (Dissertation, CCBS-UFSC, Sao Carlos, SP, Brazil), the most evident positive C-bands are found in the centromeres of autosomal pairs seven and eight, with other positive bands also being observed more clearly in the centromeres of other chromosomes in the domestic dog karyotype. Therefore, variations in colouring pattern of heterochromatic regions were already described.

In TVT slides coloured for C-banding, it can be observed that in some metaphases the greater arm of the second submetacentric chromosome presented positive C-band, in agreement with Oshimura et al. (1973). Nevertheless, in other metaphases of the same case, the marking occurred in the long arm of the fourth chromosome. According to Richardson et al. (1987), cells of TVT presented positive C-bands in the majority of chromosomes, with a marked preference for centromeric regions, which was not observed in our analysis.

In accord with the findings of Kakpakova et al. (1968) and Richardson et al. (1987), the diploid number in tumour cells varied widely in relation to the normal chromosome number for the species. It is suggested that centric fusions of acrocentric elements contributed to the numerical increase of metacentric elements observed in TVT cells, as did the rearrangements, as observed previously by Cohen (1978), Vermooten (1987), Rogers (1997) and Adams et al. (1981).

Based on the analysis of metaphases obtained from peripheral blood samples of canine TVT carriers as well as from their tumour samples, it can be verified that the alterations found in the karyotype are limited to those around the tumour itself. The similarity of karyotypes in canine TVTs in different countries indicates the stability of chromosomal alterations in these cells.

Hahn (1998) reported that the rearrangements occurring in TVT cells must be of the balanced type, and these include reciprocal translocations and centric fusions.

As the number of lymphocytoid TVTs was small, it was not possible to observe whether there is a difference in the cytogenetic analysis between the plasmocytoid and lymphocytoid tumours. Due to the literature citations that, in most instances, report that the typical morphology of tumours is similar to that of the lymphocytoid and given the similarity between these citations and the findings in the present study (where there was predominance of the plasmocytoid pattern), it is suggested that there is a chromosomal difference between the two TVT cell types.

Cytogenetic studies of cancers in dogs are not as advanced as those in humans due to problems with identification of all the chromosomes by the classic banding techniques (Switonski et al. 2004). The authors reported that there are two principal strategies for cytogenetic mapping, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and somatic cell

hybridization, and that the FISH technique plays a greater role in identification of loci of interest.

Jančarkova et al. (2008) accomplished genetic tests in ovarian cancer in women by means of conventional methods (direct culture and G-banding) and molecular methods such as FISH with probes of the whole chromosome and comparative genomic hybridization (CGH). These authors observed that the efficiency of karyotyping employing the conventional analysis methods was low, as was that obtained by utilizing the FISH technique. The most indicated method was shown to be CGH. It was also verified that patients with tumours containing less than seven aberrations possessed longer survival from presenting better therapeutic response. The study showed that tumours with amplifications of the chromosomal arms 1p, 10p, 20q and deletion of 5q had greater risk of recurrence; in other words, associations were found among prognostic factors as well as between the number of aberrations in tumour cells and the prognosis. The authors concluded that the number of aberrations in ovarian cancer cells appear to be an important prognostic marker, especially when associated with young ages.

The observations by Switonski et al. (2004) and Jančarkova et al. (2008) permit us to state that the use of molecular techniques in TVT can aid in identifying whether there is genetic differentiation between the plasmocytoid and lymphocytoid types, as well as in predicting the number of applications necessary for the remission of TVT. According to LFJ Gaspar (2005. Thesis, FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brazil), the number of applications varies according to the TVT cell type in which the greater the number of cell atypies, the higher the number of applications and, according to Jančarkova et al. (2008), tumours with fewer aberrations present better therapeutic response.

CONCLUSIONS

The plasmocytoid aspect is prevalent in the Pathology Service of FMVZ – UNESP – Botucatu in the cytopathological diagnosis of TVT. These findings indicate late diagnosis during the evolution period featuring alterations in tumour cell morphology in the implantation phase, lymphocytoid and, subsequently, plasmocytoid.

The C and G chromosomal banding techniques as well as conventional Giemsa colouring were realized in TVT cells. It was not possible to observe difference in the cytogenetic analysis between the different TVT morphologies due to the scarcity of cases with diagnoses of Lymphocytoid TVT in relation to the plasmocytoid.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research had financial support from the Supporting Research Foundation of the State of Sao Paulo (FAPESP – 05/53802-0).

REFERENCES

- Adams EW et al. 1981. Cytogenetic observations on the canine venereal tumor in long-term culture. *Cornell Vet* 71: 336-346.
- Amaral AS et al. 2004. Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003). *Rev Port Ciênc Vet* 99: 167-171.
- Bassani-Silva S et al. 2003. Tumor venéreo transmissível – revisão. *Revista Pet & Food & Health & Care* 2:77-82.
- Breen M et al. 1999. FISH mapping and identification of canine chromosomes. *J Heredity* 90: 27-30.
- Cohen D, 1978. The transmissible venereal tumor of the dog – a naturally occurring allograft? A review. *Isr J Med Sci* 14: 14-19.
- Cohen D, 1985. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. *Adv Cancer Res* 43: 75-112.
- Daleck CLM et al. 1987. Avaliação de diferentes métodos diagnósticos do tumor venéreo transmissível (T.V.T.) em cães. *Ars Vet* 3 : 187-194.
- Erüinal-Maral N et al. 2000. Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 107: 175-180.

- Graphodatsky AS et al. 2000. A comparative chromosome map of the Artic fox, red fox and dog defined by chromosome painting and high resolution G-banding. *Chromosom Res* 8: 253-263.
- Hahn KA, 1998. Chromosomal changes associated with cancer. In: MORRISON WB, ed. *Cancer in dogs and cats: medical and surgical management*. Baltimore: Williams & Wilkins: 53-59.
- Hasler AH, Weber WT, 2000. Theriogenology question of the month. Transmissible venereal tumor (TVT). *J Amer Vet Med Assoc* 216: 1557-1559 and 217: 42.
- Hsiao YW et al. 2002. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol* 87: 19-27.
- Jančárková N et al. 2008. Chromosomal rearrangements and their relations to histopathological and clinical parameters in epithelial ovarian cancer. *Folia Biol* 54: 58-64.
- Kakpakova ES et al. 1968. Peculiarities of the karyotype of the transmissible sarcoma cells in the dog. *Vopr Onkol* 14: 43-50.
- Liao KW et al. 2003. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Vet Immunol Immunopathol* 92: 149-162.
- MacEwen EG, 2001. Transmissible venereal tumor. In: Withrow SJ, MacEwen EG eds. *Small animal clinical oncology*. Philadelphia: W.B. Saunders: 651-656.
- Manolache M et al. 1976. Banding analysis of the somatic chromosomes of the domestic dog (*Canis familiaris*). *Can J Genet Cytol* 18: 513-518.
- Marchal T et al. 1997. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumor. *Vet Immunol Immunopathol* 57: 1-11.
- Moorhead PS et al. 1960. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20: 613-616.
- Mozos E et al. 1996. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. *Vet Pathol* 33: 257-263.
- Mukaratirwa S, Gruys E, 2003. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology - A review. *Vet Q* 25: 101-111.
- Murgia C et al. 2006. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell* 126: 477-487.
- Oshimura M et al. 1973. Chromosomal banding patterns in primary and transplanted venereal tumors of the dog. *J Natl Cancer Inst* 51: 1197-1203.
- Pathak S et al. 1982. Heterochromatin, synaptonemal complex, and NOR activity in the somatic and germ cells of a male domestic dog, *Canis familiaris* (Mammalia, Canidae). *Cytogenet Cell Genet* 34: 112-118.
- Pathak S, Wurster-Hill DH, 1977. Distribution of constitutive heterochromatin in carnivores. *Cytogenet Cell Genet* 18: 245-254.

- Reiman et al. 1999. Working with canine chromosomes: current recommendations for karyotype description. *The American Genetic Association* 90: 31-34.
- Richardson VB et al. 1987. The distribution of C-bands in canine transmissible venereal tumor cells. *Cornell Vet* 77: 161-167.
- Rogers KS, 1997. Transmissible venereal tumor. *Compend Contin Educ Pract Vet* 19: 1036-1045.
- Scheres VMJC, 1972. Identification of two Robertsonian translocations with a Giemsa banding technique. *Hum Genet* 15: 253-256.
- Summer AT, 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304-306.
- Switonski M et al. 1996. Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. Committee for the Standardized Karyotype of the Dog (*Canis familiaris*). *Chromosom Res* 4: 306-309.
- Switonski M et al. 2004. The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics. *J Appl Genet* 45:195-214.
- Vermooten MI, 1987. Canine transmissible venereal tumour (TVT): a review. *J/S Af Vet Assoc* 58: 147-150.
- Yang F et al. 2000. Chromosome identification and assignment of DNA clones in the dog using a red fox and dog comparative map. *Chromosom Res* 8: 93-110.

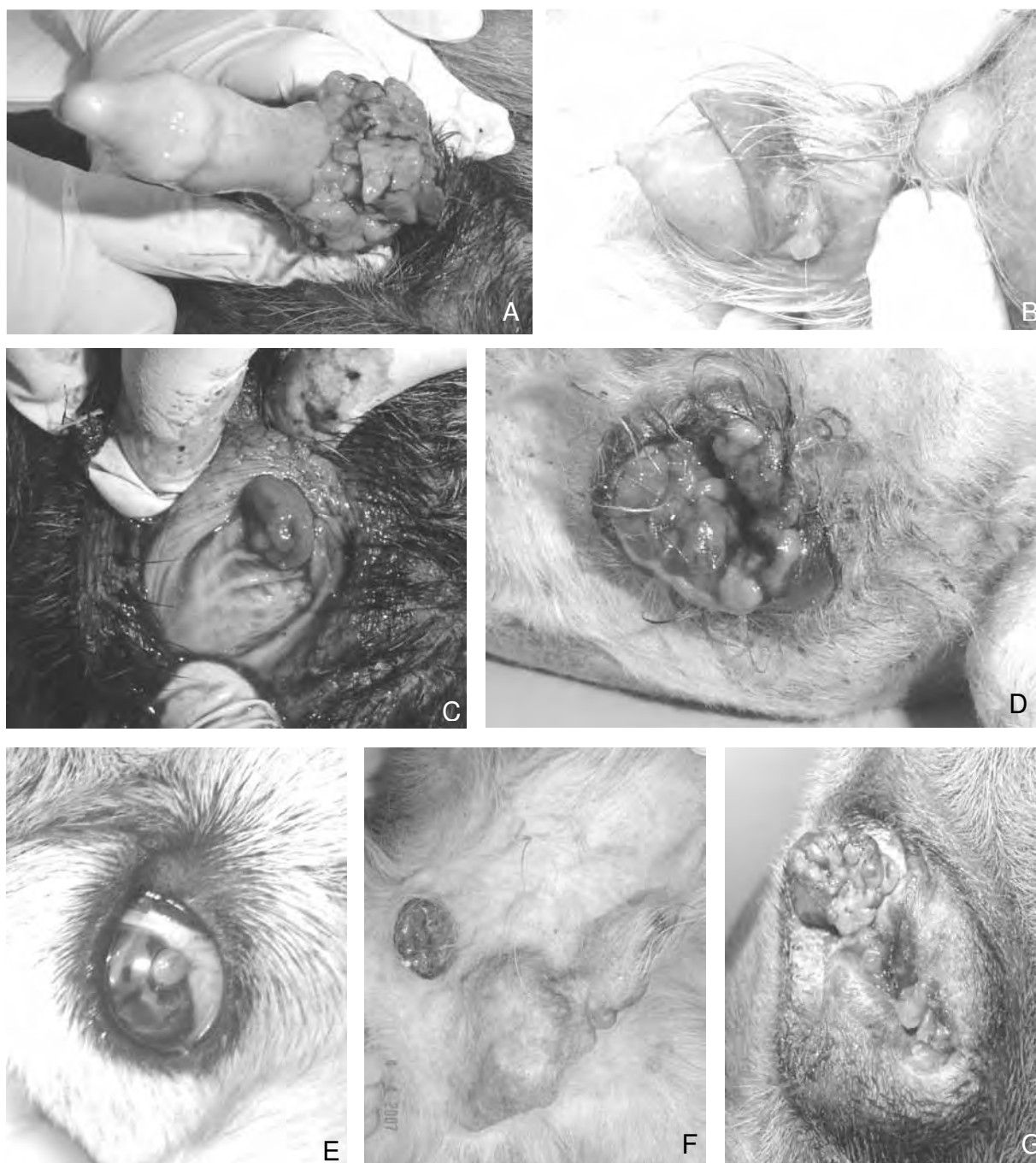


FIGURE 1 - Forms of clinical presentation of canine transmissible venereal tumour: **A. to D.** genital forms; **E.** ocular; **F.** multiple cutaneous tumours; **G.** localization in anal mucosa. Observe cauliflower aspect (**A, D and G**) and **smooth** aspect (**B, C and E**).

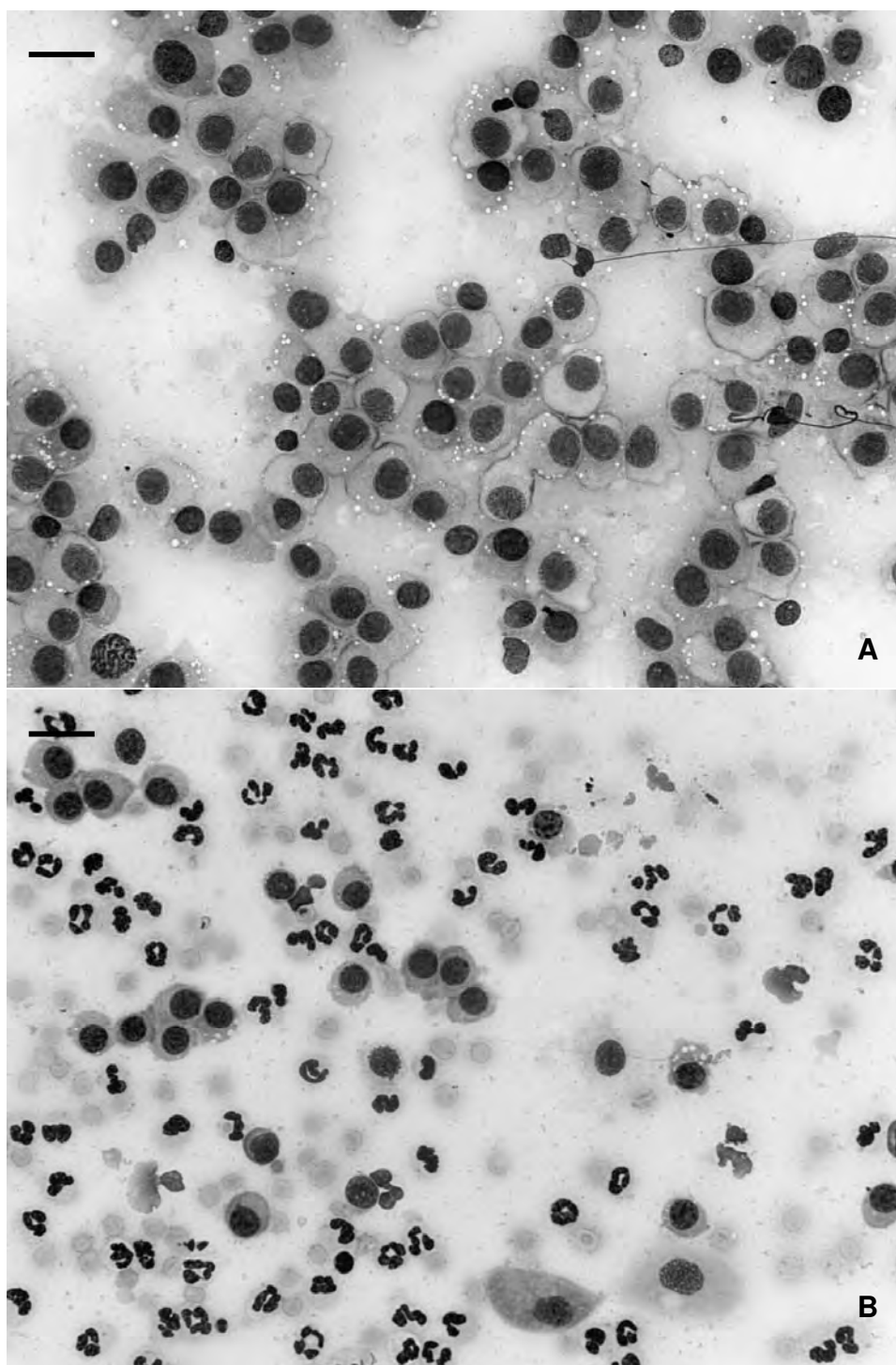


FIGURE 2 - Cytological samples of transmissible venereal tumour of different cytomorphological types: **A.** plasmocytoid pattern (ovoid cells predominant, ample cytoplasm and eccentric nucleus); **B.** lymphocytoid pattern (round cells predominant, scarce cytoplasm and high nucleus-to-cytoplasm ratio). Giemsa, bar: 20µm.

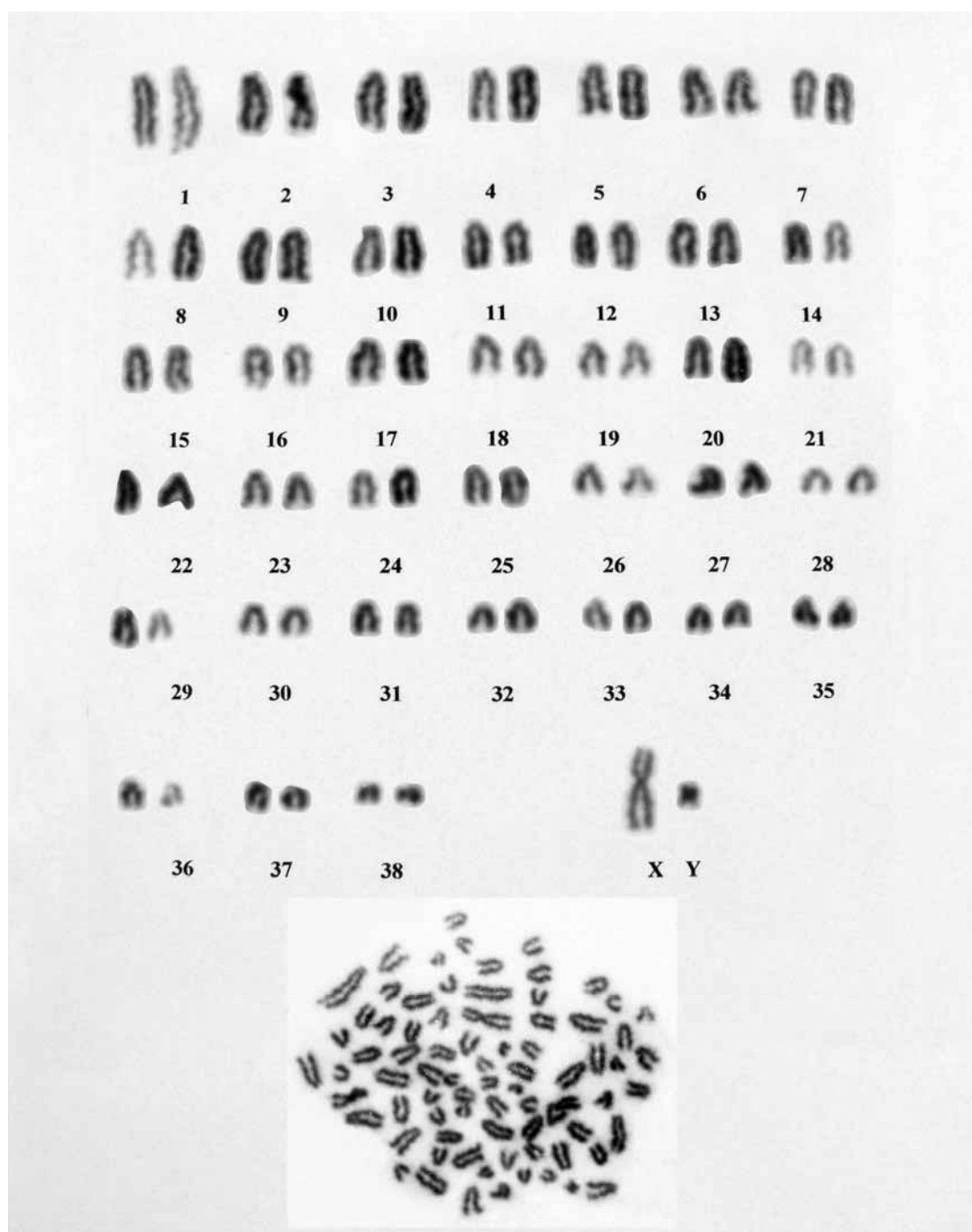


FIGURE 3 - Giemsa stained karyotype of normal male blood cell and the representative metaphase spread.

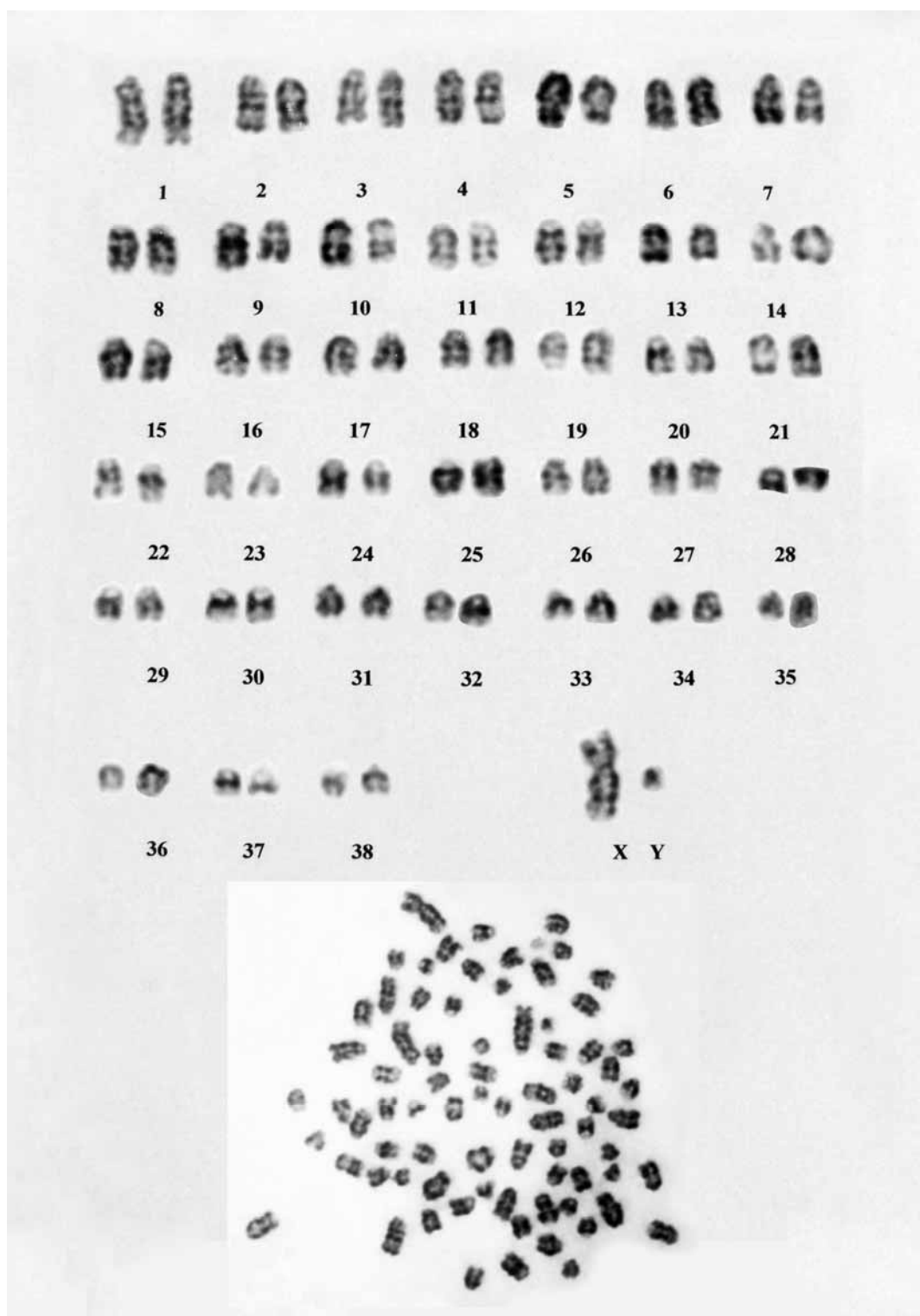


FIGURE 4 - G-band karyotype of normal male blood cell and the representative metaphase spread.

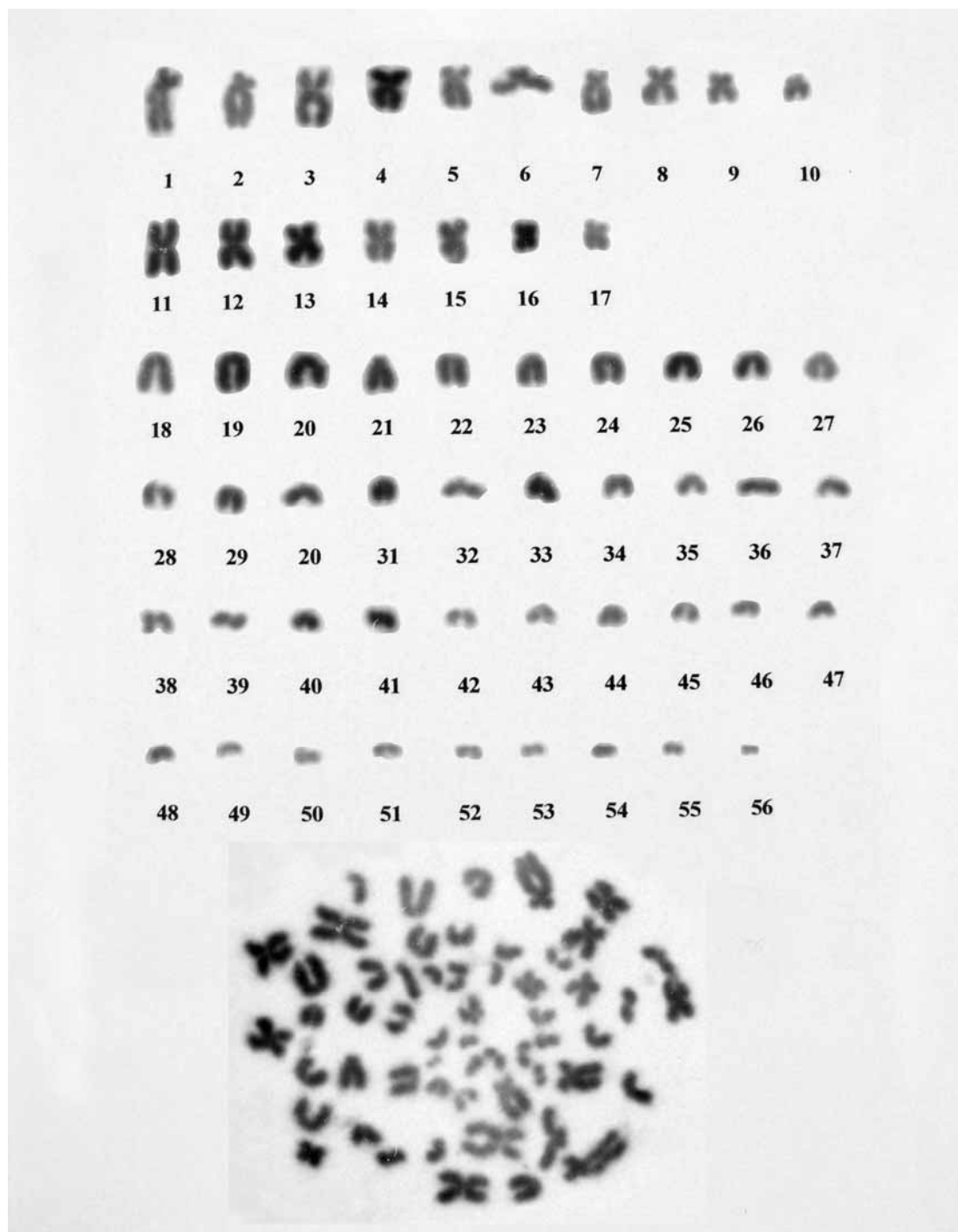


FIGURE 5 - Giemsa stained karyotype of a transmissible venereal tumour cell and the representative metaphase spread.

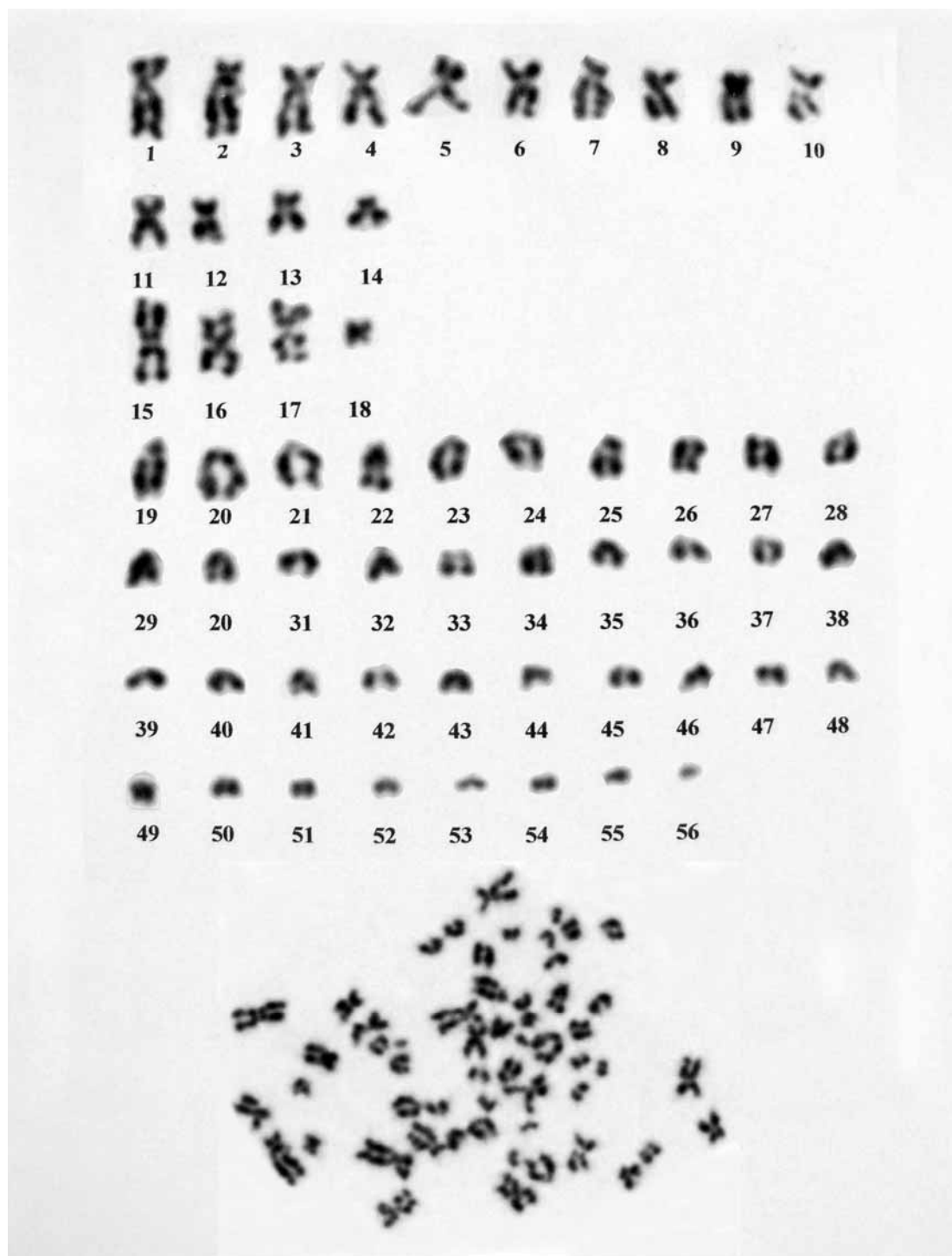


FIGURE 6 - G-band karyotype of a transmissible venereal tumour cell and the representative metaphase spread.

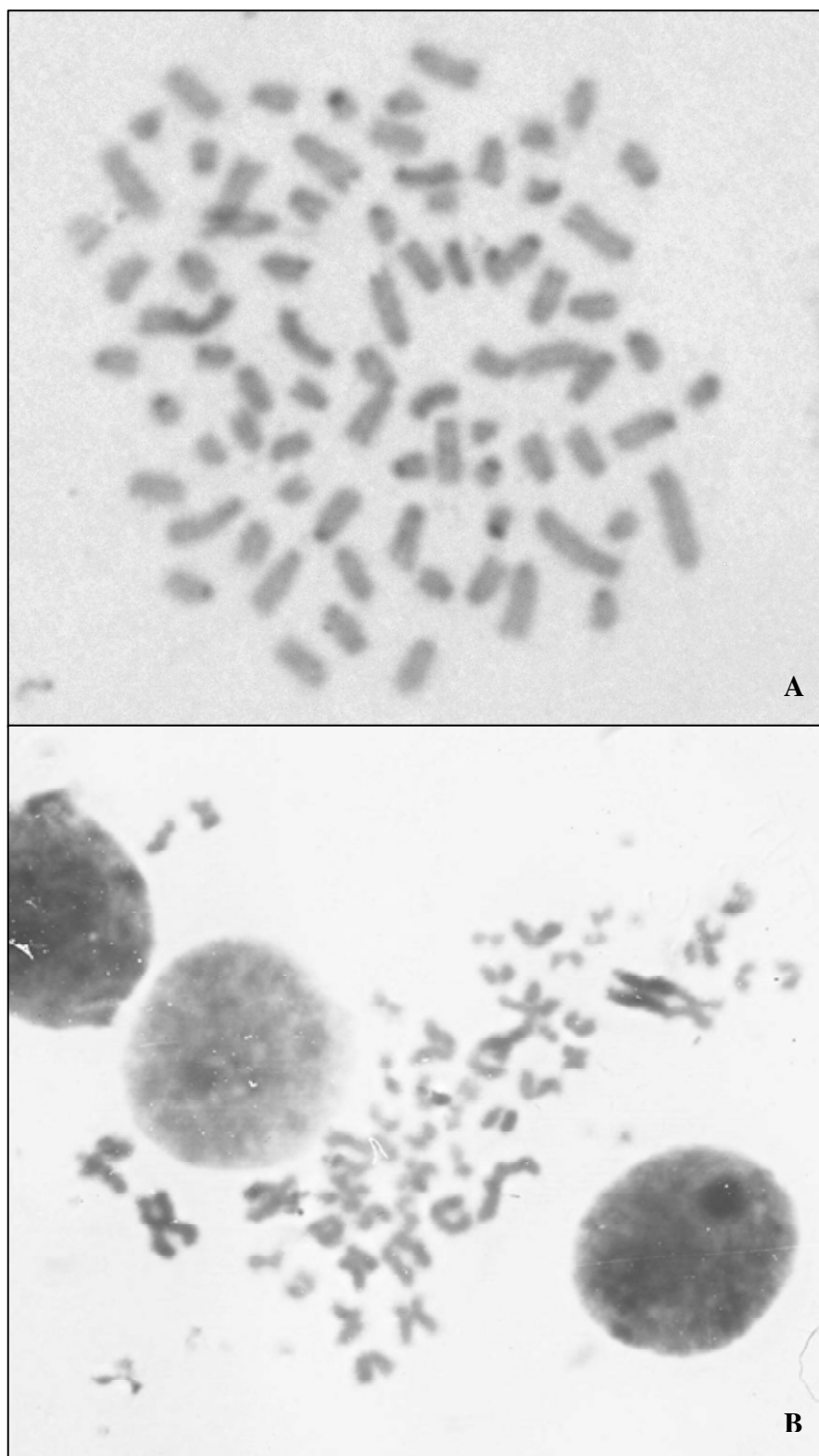


FIGURE 7 - Photomicrograph of representative metaphases- C Band: **A.** peripheral blood from normal dog - observe centromeric regions coloured for C-banding; **B.** sample of TVT - positivity of C-banding in longer arm of the second submetacentric chromosome.