

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/08/2019.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**



Anderson do Prado Duzanski

**Interação entre hospedeiro e tumor venéreo transmissível canino:
diversidade de células mononucleares e do complexo principal de
histocompatibilidade**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

**Botucatu
(2017)**

Anderson do Prado Duzanski

**Interação entre hospedeiro e tumor venéreo
transmissível canino: diversidade de células
mononucleares e do complexo principal de
histocompatibilidade**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

Botucatu
(2017)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Duzanski, Anderson do Prado.

Interação entre hospedeiro e tumor venéreo transmissível canino : diversidade de células mononucleares e do complexo principal de histocompatibilidade / Anderson do Prado Duzanski. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Noeme Sousa Rocha
Capes: 40100006

1. Cães - Doenças. 2. Tumores em animais. 3. Tumores venéreos veterinários. 4. Histocompatibilidade. 5. Imunidade celular. 6. Vincristina.

Palavras-chave: Cão; Imunidade celular tumoral; MHC classe I e II; TVTC; Vincristina.

Nome do autor: Anderson do Prado Duzanski

Título: Interação entre hospedeiro e tumor venéreo transmissível canino: diversidade de células mononucleares e do complexo principal de histocompatibilidade

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha
Presidente e orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa. Dra. Celmira Calderón
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
SVPA - UENP – Bandeirantes

Profa. Dra. Cláudia Valéria Seullner Brandão
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Data da defesa: 01 de Agosto de 2017.

Dedicatória

À Deus autor e Senhor da vida.

À Santíssima Virgem Maria, minha terna intercessora junto a Deus.

Aos meus amados pais José Carlos Duzanski e Maria Marta do Prado Duzanski.

À minha amada noiva Giovana Zangrande Negrisoló.

À minha tão querida e especial tia Natália Duzanski.

À minha saudosa avó Baba Anastácia Duzanski (in memoriam).

Agradecimentos

À **Deus** porque sem Ele, eu nada seria, nada poderia e nada teria. Pois em Vós Senhor, “vivemos, nos movemos e existimos” (At 17,28).

Sou Vosso, e tudo o que possuo é Vosso. Obrigado Senhor, por estar comigo.

À **Nossa Senhora Imaculada Conceição**, amável Mãe, pelas incontáveis graças recebidas. Obrigado Senhora pela tua inefável presença e amor de mãe.

Totus tuus ego sum mariae.

À minha orientadora, Profa. Dra. **Noeme Sousa Rocha** pela oportunidade, acolhida, orientação, contribuição científica e, sobretudo, pela confiança depositada em mim.

Obrigado Professora por tornar minha caminhada mais significativa.

Ao meu querido amigo da Colômbia, Dr. **Luis Mauricio Montoya Flórez**, pelas experiências compartilhadas, pelos ensinamentos carinhosamente passados, e por todas as diretrizes dadas durante a elaboração e execução deste estudo.

Obrigado pelo convívio pacífico, compreensão e amizade verdadeira.

À minha querida amiga Dra. **Haline Fêo Balletero** pela agradável convivência durante todo esse tempo, disposição, comprometimento, e, sobretudo pelo auxílio prestado com excelência durante a execução da parte experimental deste estudo.

Ao Prof. Dr. **Ramon Kaneno** e a pesquisadora Dra. **Graziela Romagnoli** do Laboratório de Imunologia de Tumores do Instituto de Biociências de Botucatu IBB-UNESP, pela colaboração nas análises em citometria de fluxo.

Agradeço

À pós-graduanda **Mariana Werneck** pelo apoio e importante colaboração nos procedimentos anestésicos e cirúrgicos dos animais estudados.

À pós-graduanda **Paula de Sanctis** pelo apoio, disposição e colaboração na produção e interface gráfica deste estudo.

Ao Prof. Dr. **Rogério Antônio de Oliveira**, pela colaboração nas análises estatísticas dos dados obtidos neste estudo.

Ao Prof. Dr. **José Maurício Sforcin** e à Dra. **Camila de Paula Freitas** que gentilmente aceitaram em participar da banca de exame geral de qualificação e que, com toda certeza, muito contribuíram na melhoria deste estudo.

Aos membros da banca de defesa Profa. Dra. **Celmira Calderón** e à Profa. Dra. **Cláudia Valéria Seullner Brandão** pelas observações, sugestões e elogios com os quais colaboraram para a finalização deste estudo.

Aos residentes **Mariane, Vinícius e Renato** do Setor de Cirurgia de Pequenos Animais da FMVZ-UNESP de Botucatu, pelo auxílio no tratamento dos animais.

A minha família, meus irmãos **Caroline e Bruno** que sempre me apoiaram, e aos meus pais **José Carlos e Maria Marta** pelos esforços dispensados, amor e incentivo na busca dos meus sonhos. Minha eterna gratidão a todos vocês.

À minha noiva **Giovana** pelo incondicional apoio e carinho, especialmente naqueles momentos difíceis pelos quais precisei passar. Obrigado amor, pela compreensão, incentivo, amor verdadeiro, e por tornar a minha vida melhor. Eu te amo 19.

À minha tia **Natália Duzanski**, pelo imenso amor de mãe, carinho, e apoio que me possibilitou chegar aqui. Mais uma vez você fez parte de uma importante jornada da minha vida. Com certeza as palavras aqui escritas não poderiam expressar minha eterna gratidão, respeito e amor por você tia. Obrigado.

Aos **funcionários** da Seção Técnica de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, e, especialmente, à secretária de Pós-Graduação em Patologia, **Vânia Soler**, pela gentileza, atenção e ajuda prestada com excelência.

Aos **funcionários** do Setor de Patologia Veterinária da FMVZ-UNESP de Botucatu, **Dona Deise, Maury Raul, Claudinei Domingues e Valéria** pela ajuda, disposição, simpatia e alegria compartilhada durante esse tempo de convívio.

Ao **CNPq** pela concessão de auxílio financeiro para realização deste estudo e a **Capex** pela importante bolsa de estudo.

*Se cheguei até aqui foi porque estive sobre ombros fortes.
A todos, o meu maior respeito, gratidão e máxima admiração.*

“Não basta a pesquisa sem maravilhar-se; não basta a circunspecção sem o júbilo, o trabalho sem a piedade, a ciência sem a caridade, a inteligência sem a humildade, o estudo sem a graça.”

São Boaventura (1218-1274)

RESUMO

DUZANSKI, A.P. **Interação entre hospedeiro e tumor venéreo transmissível canino: diversidade de células mononucleares e do complexo principal de histocompatibilidade.** 2017. 149 p. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

O tumor venéreo transmissível canino (TVTC) ocorre naturalmente em cães, sem predileção por raça ou sexo sendo transmitido durante o coito ou hábitos sociais. É também um tumor transplantável experimentalmente e tem sido utilizado como modelo para o estudo da relação entre tumor e hospedeiro. Apesar da maior infiltração inflamatória intratumoral e da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) estar associada à regressão do tumor, o papel central das células imunes do hospedeiro na evolução clínica do TVTC ainda não está claro. Neste estudo nós buscamos analisar a interação entre TVTC natural e hospedeiro, especialmente sob o ponto de vista da imunidade celular tumoral. Aqui nós identificamos e quantificamos por citometria de fluxo células T (CD3+, CD4+ e CD8+), células NK, células B, macrófagos, em amostras de sangue e de tumor, além da expressão imunohistoquímica de moléculas do MHC de classe I e II, sobretudo nas diferentes fases clínicas do tumor, assim como classificamos os subtipos citológicos do tumor e avaliamos o comportamento tumoral frente ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina em uma amostra de 22 cães com TVTC natural. A quimioterapia foi efetiva no tratamento da maioria dos casos. Encontramos predomínio de TVTC linfocitóide e que metástases e resistência quimioterápica ocorreram apenas nos tumores de fenótipo linfocitóide e misto. Identificamos aumento significativo na expressão de moléculas de MHC classe I e II na fase de regressão. As células T CD3+ estavam igualmente presentes nas fases de progressão e regressão. Porém, as células T (CD4+ e CD8+), células NK e macrófagos estavam mais presentes na fase de regressão, enquanto as células B estavam em maior quantidade na fase de progressão, mas não foi possível correlacionar a fase clínica do tumor com um único tipo predominante de infiltrado inflamatório intratumoral. Ainda, a fase clínica e o subtipo citológico do tumor natural não pareceram ser

determinantes na resposta ao tratamento quimioterápico, assim como não encontramos diferença imune expressiva entre os subtipos citológicos do tumor, indicando, portanto, não haver diferença quanto à interação tumor/hospedeiro. Nossos achados em citometria de fluxo mostram que a maior presença de células T no microambiente tumoral antes do início da quimioterapia não favoreceu a regressão do tumor, ao contrário da população macrófágica que parece ter contribuído para o menor número de sessões quimioterápicas. Identificamos ainda que cães fêmeas e cães de raça, em geral, apresentaram maior presença de células mononucleares circulantes e infiltrantes, e que as fêmeas mostraram evidência de resposta mais favorável à remissão completa do tumor acompanhada de quimioterapia em comparação aos cães machos, uma vez que as fêmeas apresentaram maior infiltrado intratumoral de macrófagos. Por fim, nossos dados não sustentam uma forte evidência de regressão espontânea no TVTC natural. Mais estudos são necessários para melhor entender os mecanismos da interação entre células do tumor e hospedeiras e a sua implicação na imunidade antitumoral, uma vez que, na ausência de tratamento o tumor natural provavelmente não regride espontaneamente, pois o sistema imune do cão parece ser requisitado pelo tumor durante os eventos biológicos associados à tumorigênese e ao escape da imunovigilância.

Palavras-chave: Cão, TVTC, imunidade celular tumoral, MHC classe I e II, vincristina.

ABSTRACT

DUZANSKI, A.P. **Interaction between host and canine transmissible venereal tumor: diversity of mononuclear cells and major histocompatibility complex.** 2017. 149 p. Dissertation (Master in Pathology) - Medicine School Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

The transmissible venereal canine tumor (CTVT) occurs naturally in dogs, without predilection for race or gender being transmitted during intercourse or social habits. It is also an experimentally transplantable tumor and it has been used as a pattern for the study about the relationship between the tumor and the host. Despite the greater intratumoral inflammatory infiltration and the expression of major histocompatibility complex molecules (MHC) is associated with tumor regression, the central role of host immune cells in the CTVT clinical evolution is not clear yet. In this study we sought to analyze the interaction between natural and host CTVT, especially from the point of view of tumor cell immunity. Here we identify and quantify by flow cytometry cells T (CD3+, CD4+ e CD8+), cells NK, cells B, macrophages, in blood and tumor samples, besides the immune histochemical expression of MHC class I and II molecules, specially in the different clinical phases of the tumor as well as classifying the cytological subtypes of the tumor and evaluating the tumor behavior against the chemotherapy treatment with vincristine sulfate in a sample of 22 dogs with natural CTVT. Chemotherapy was effective in the treatment of most cases. We found a predominance of lymphocytoid CTVT and that metastases and chemotherapeutic resistance occurred only in tumors of lymphocytoid and mixed phenotype. We identified a significant increase in the expression of MHC class I and II molecules in the regression phase. T CD3+ cells were also present in the progression and regression phases. However, T cells (CD4 + and CD8 +), NK cells and macrophages were more present in the regression phase, while B cells were more in the progression phase, but it was not possible to correlate the clinical phase of the tumor with a single type prevalent of infiltrated intratumoral inflammatory. Moreover, the clinical and cytologic subtype of the natural tumor did not appear to be determinant in the response to the chemotherapeutic treatment, nor did we find an

expressive immune difference between the cytological subtypes of the tumor, indicating, therefore, that there was no difference in the tumor/host interaction. Our findings in flow cytometry show that the increased presence of T cells in the tumor microenvironment prior to the initiation of chemotherapy did not favor tumor regression, unlike the macrophagic population that appears to have contributed to the lower number of chemotherapy sessions. We also identified that female dogs and breed dogs in general had a higher presence of circulating and infiltrating mononuclear cells and that females showed evidence of a more favorable response to complete remission of the tumor accompanied by chemotherapy compared to male dogs, since females showed greater intratumoral infiltration of macrophages. Finally, our data do not support strong evidence of spontaneous regression in natural CTVT. More studies are necessary to better understand the mechanisms of interaction between tumor cells and hosts and their implication in antitumor immunity, since in the absence of treatment the natural tumor probably does not regress spontaneously, as the dog's immune system appears to be required by the tumor during the biological events associated with tumorigenesis and the escape of immunovigilance.

Key words: dog, CTVT, tumor cell immunity, MHC class I e II, vincristine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Painel de imunomarcção de moléculas de MHC classe I e II no tumor	126
Tabela 2 - Painel de imunomarcção de células mononucleares do sangue e do tumor	126
Tabela 3 - Características clínicas e demográficas dos 22 cães com TVTC genital.....	127
Tabela 4 - Distribuição e dados clínicos descritivos dos 22 cães com TVTC genital	128
Tabela 5 - Distribuição e dados descritivos referentes ao subtipo citológico, fase evolutiva e resposta à quimioterapia dos 22 cães com TVTC genital	129
Tabela 6 - Média, desvio padrão, amplitude de variação dos valores do hemograma de 22 cães com TVTC antes do início do tratamento quimioterápico	130
Tabela 7 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes às diferentes fases clínicas do TVTC	141
Tabela 8 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes aos diferentes subtipos citológicos do TVTC	141
Tabela 9 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes ao sexo dos cães com TVTC	142

Tabela 10 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes à raça dos cães com TVTC	142
Tabela 11 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes à idade dos cães com TVTC	143
Tabela 12 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes à resposta ao tratamento quimioterápico dos cães com TVTC	143
Tabela 13 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares comparando os resultados obtidos em amostras de sangue e de tumor.....	144

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fases do processo de edição imunológica do câncer	117
Figura 2 - Principais células do sistema imune inato e adaptativo e suas funções em resposta a uma célula tumoral	118
Figura 3 - Estrutura da molécula de complexo de histocompatibilidade maior (MHC) de classe I e II	119
Quadro 1 - Protocolo semiológico e terapêutico aplicado aos cães com TVTC.....	122
Figura 4 - Organograma da metodologia esquematizando amostras coletadas para análises dos 22 cães com TVTC	125
Figura 5 - Gráficos mostrando estratégia de análise por citometria de fluxo das células T (CD3+ CD4+ CD8+), células B (CD79), células NK (asialo GM1) e macrófagos (MAC 387) em amostras de sangue e de tumor dos cães com TVTC. Os <i>Gates</i> foram determinados com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) da população em estudo. Os valores foram expressos em porcentagem de células positivas para os marcadores em questão. Q1 representa (Positivo CD4+), Q2 (Duplo Positivo CD4+ e CD8+), Q3 (Positivo CD8+) e Q4 (Duplo negativo CD4+ e CD8+).....	127
Figura 6 - Apresentação clínica do tumor venéreo transmissível canino em cão fêmea. Massas protuberantes, multilobulares, necro-hemorrágicas aderidas em mucosa vaginal	133
Figura 7 - Apresentação clínica do tumor venéreo transmissível canino em cão macho. Massas vegetantes, multilobulares, necro-hemorrágicas em pênis	134

Figura 8 - Imagem ultrassonográfica demonstrando o parênquima esplênico alterado, com presença de estrutura heterogênea predominantemente ecogênica com áreas cavitárias em permeio, medindo aproximadamente 5,2 x 7,4cm, causando deslocando cápsula e alteração do contorno normal do órgão. Ao exame de Doppler colorido, apresentou evidente vascularização 135

Figura 9 - Citologia aspirativa por agulha fina no diagnóstico de tumor venéreo transmissível canino. Diferentes tipos citomorfológicos. (A) Fenótipo linfocitóide. Predomínio de oncócitos redondos, com núcleo tendendo a centralização. (B) Fenótipo plasmocitóide. Predomínio de oncócitos ovalados, com núcleo excêntrico. Coloração pelo Giemsa, 630x..... 136

Figura 10 - Tumor venéreo transmissível canino. Expressão de critérios de malignidade. (A) Notar oncócitos maduro (seta preta) e imaturo (seta branca); células em raquete; célula fantasma; mitose; padrão grosseiro da cromatina; ranhura nuclear e nucléolo angular. Coloração pelo Papanicolau, 600x. (B) Célula binucleada (seta preta); anisocitose; hiperchromasia. Coloração pelo Giemsa, 630x..... 137

Figura 11 - Cariótipo de célula em cultura primária de TVTC. (A) Contagem de 72 cromossomos. (B) Contagem de 54 cromossomos. Números inferiores a 78 das células somática do cão 138

Figura 12 - Tumor venéreo transmissível canino. Fase de progressão tumoral. (A) Alta celularidade arranjada em cordões imersa em delicado estroma, 200x. (B) Oncócitos volumosos de citoplasma amplo e claro, 400x. Coloração pelo H.E..... 139

Figura 13 - Tumor venéreo transmissível canino. (A) Fase de regressão inicial. Presença de infiltrado inflamatório e moderado estroma. (B) Fase de regressão final. Colapso do parênquima tumoral devido intensa proliferação de tecido estromal. Coloração pelo H.E, 200x 140

Figura 14 - Baixa expressão de moléculas MHC classe I e II na progressão do TVTC. (A) MHC classe I, sistema de detecção Novolink™, Cromógeno Diaminobenzidina 3'3 (DAB), contracoloração Hematoxilina de Meyer, 400x. 141
(B) MHC classe II, sistema de detecção Envision™, Cromógeno Diaminobenzidina 3'3 (DAB), contracoloração Hematoxilina de Meyer, 400x...

Figura 15 - Elevada expressão de moléculas MHC classe I e II na regressão do TVTC. (A) MHC classe I, sistema de detecção Novolink™, Cromógeno Diaminobenzidina 3'3 (DAB), Contracoloração Hematoxilina de Meyer, 400x. 142
(B) MHC classe II, sistema de detecção Envision™, Cromógeno Diaminobenzidina 3'3 (DAB), Contracoloração Hematoxilina de Meyer, 400x.....

LISTA DE ABREVIATURAS

ACM-1	Antígeno específico de macrófagos
APC	Célula apresentadora de antígeno
BCG	Bacilo Calmette-Guérin's
BCR	Receptor de células B
Breg	Célula B regulatória
BSA	Albumina sérica bovina
CAAF	Citologia aspirativa por agulha fina
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
DC	Célula dendrítica
DMEM	Meio MEM modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfoxido
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
IFN-γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LINE-1	Elemento nuclear intercalante longo 1
MATs	Macrófagos associados a tumores
MDR1	Gene de resistência a múltiplas drogas
MDSC	Células supressoras derivadas mielóides
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NK	Natural Killer
PBS	Tampão fosfato-salino
P-gp	Glicoproteína-p
RE	Retículo endoplasmático
SFB	Soro fetal bovino
SRD	Sem raça definida
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
TAP	Proteína transportadora associada com o processamento do antígeno
TCR	Receptor de célula T
TFd	Fator de transferência dialisável

Th	Célula T auxiliar
TIL	Linfócitos T infiltrantes do tumor
TNF	Fator necrose tumoral
TNM	Tumor, Linfonodo, Metástase
Treg	Célula T regulatória
TVTC	Tumor venéreo transmissível canino
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	22
REVISÃO DE LITERATURA	23
1. TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO	24
1.1 Epidemiologia	26
1.2 Aspectos clínicos e diagnóstico	28
1.3 Biologia tumoral	31
1.3.1 <i>Características histológicas e citológicas</i>	33
1.4 Tratamento	34
2. INTERAÇÃO ENTRE SISTEMA IMUNE E TUMOR	37
2.1 Complexo Principal de Histocompatibilidade	40
2.1.1 <i>Apresentação de antígenos via MHC de classe I</i>	42
2.1.2 <i>Apresentação de antígenos via MHC de classe II</i>	43
2.2 Imunidade celular a tumores	43
2.2.1 <i>Células NK</i>	44
2.2.2 <i>Macrófagos</i>	46
2.2.3 <i>Células T</i>	48
2.2.4 <i>Células B</i>	51
2.3 TVTC de ocorrência natural e experimentalmente induzido implicados na resposta imunológico do hospedeiro	53
3. OBJETIVOS	57
3.1 Objetivo geral	57
3.2 Objetivos específicos	57
4. JUSTIFICATIVA	58
5. REFERÊNCIAS	59
CAPÍTULO 2	70
MANUSCRITO	71
CONCLUSÃO	106
ANEXOS	116
APÊNDICES	124

Apresentação

A presente dissertação de mestrado está estruturada em dois capítulos distintos. O primeiro trata de uma revisão bibliográfica, na qual o autor buscou sistematizar as principais informações pertinentes ao Tumor Venéreo Transmissível Canino, sobretudo no tocante a relação biologia tumoral e sistema imune do hospedeiro. O segundo capítulo consiste em um manuscrito modelo redigido para submissão em periódico científico. Portanto as seções *Introdução*, *Material e Métodos*, *Resultados e Discussão*, encontram-se no próprio manuscrito que representa este estudo na íntegra. O item *Conclusão*, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações gerais sobre o manuscrito contido neste estudo.

Capítulo 1

Revisão de literatura

1. TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO

O Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC) é uma das raras formas bem documentada de neoplasias transmissíveis. Comumente diagnosticado em cães sexualmente ativos e com livre acesso as ruas, o tumor tem estimulado diversas pesquisas, no que tange aos estudos oncológicos, genéticos e imunológicos, desde que Novinsky, em 1876, relatou o primeiro transplante experimental bem sucedido usando esta neoplasia (COHEN, 1978), além dos pesquisadores Smith e Washbourn, em 1898, terem demonstrado pela primeira vez a transmissão natural entre cães, quando 11 de 12 fêmeas cobertas por um macho portador da doença desenvolveram a lesão genital (ROGERS, 1997).

Após os estudos de Sticker, entre 1905-1906, o tumor ficou mundialmente conhecido como Linfossarcoma de Sticker ou Tumor de Sticker, em referência ao investigador (COHEN, 1985). A análise retrospectiva da literatura mostra que o tumor recebeu ao longo de sua história científica diversas sinonímias, tais como sarcoma infeccioso, granuloma venéreo, tumor venéreo contagioso, condiloma canino, linfoma venéreo, tumor de células reticulares transmissível, histiocitoma transmissível e hemoblastoma transmissível (ROGERS, 1997; AMARAL, 2004; GANGULY; DAS; DAS, 2013), revelando bastante controversa quanto a gênese tumoral.

Ainda hoje o tipo celular exato assim como o processo carcinogênico do TVTC é desconhecido. Estudos com antígenos de histocompatibilidade revelaram que o tumor não tem origem em células do hospedeiro modificadas (COHEN, 1985),

mas ocorre pela propagação natural através de transplantes celulares alogênicos, como aloenxerto (MURCHISON et al., 2014). O tumor é considerado o mais velho câncer de células somáticas já estudado e tem motivado esforços contínuos na determinação da sua origem (STRAKOVA; MURCHISON, 2015).

Características marcantes do tumor e que impulsionam interesse científico, incluem a fácil transplantação alogênica seguida de rápido crescimento no hospedeiro; a regressão espontânea observada no campo experimental e a superexpressão do gene de resistência a múltiplas drogas (MDR1) e da glicoproteína-p (P-gp) pelas células tumorais, possibilitando estudos sobre marcadores de proliferação celular, cinética tumoral e morte celular por apoptose (SANTOS et al., 2011), resistência quimioterápica (FLÓREZ et al., 2016a; DUZANSKI et al., 2016), além da interação entre câncer e sistema imune (SIDDLÉ; KAUFMAN 2015).

A presença efetiva de mecanismos de evasão da imunovigilância caracterizados principalmente por subexpressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) durante a fase de progressão tumoral (HSIAO et al., 2002), assim como a conversão de seu microambiente para um estado de imunossupressão (HSIAO et al., 2004), caracterizam o TVTC como um modelo valioso para pesquisas sobre transplante de órgãos (BELOV, 2011), eficácia terapêutica de agentes imunoterápicos (DEN OTTER et al., 2015), e também neoplasia comparada, principalmente aquelas ligadas à baixa imunidade (REHAVI; KATZIR; RAMOT, 1991);

Mais recentemente o tumor tem possibilitado pesquisas aplicadas em estudos sobre a biologia evolutiva do câncer (UJVARI; PAPENFUSS; BELOV, 2016) e de

células-tronco envolvidas no processo carcinogênico (GRANDI et al., 2016).

1.1 Epidemiologia

Há relatos bem documentados do TVTC em todos os continentes, exceto na Antártica. O tumor prevalece mais em cães de áreas situadas em regiões tropicais e subtropicais e nos locais que não apresentam controle epidemiológico satisfatório de cães errantes (GANGULY; DAS; DAS, 2013). Foi descrita uma correlação positiva entre prevalência do tumor e países emergentes (STRAKOVA; MURCHISON, 2014).

O estudo da distribuição mundial do TVTC revelou que o tumor é endêmico em pelo menos 90 países, incluindo o Brasil, com prevalências médias entre 1-10% em países da América do Sul e Central, Ásia e África (STRAKOVA; MURCHISON, 2014). Vários estudos apontam o tumor como uma das principais neoplasias diagnosticada em cães (BABO; BERNARDO, 1999; BRANDÃO et al., 2002; SILVA et al., 2007; CHIKWETO et al., 2013; HUPPES et al., 2014; FÊO; FLÓREZ; ROCHA, 2016).

Na análise retrospectiva epidemiológica de Londres e Tailândia, Strakova e Murchinson (2014) notaram reduções constantes na prevalência do tumor após o advento de políticas públicas de responsabilidade civil da guarda de animais pets e de campanhas de esterilização em massa, que resultaram na total erradicação da doença. Do mesmo modo, rígidas políticas de quarentena para cães importados mantêm a Nova Zelândia livre da doença.

No Brasil, Amaral et al. (2004), observou que entre o período de 1994 e 2003, 17,1% dos laudos citopatológicos oriundos do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Botucatu, corresponderam ao diagnóstico de TVTC. No total, foram realizados 5.798 exames citológicos em cães. Durante o período analisado, o tumor foi a segunda neoplasia mais incidente em cães, e apresentou taxa de incidência anual entre 11,8% e 24,1%.

Não há predisposição do tumor em relação à raça, idade ou sexo (PARK et al., 2006), embora há estudos apontando maior ocorrência nas cadelas (BRANDÃO et al., 2002; SILVA et al., 2007) enquanto outros referem os machos como os mais acometidos (FÊO; FLÓREZ; ROCHA, 2016). Em geral, o tumor ocorre em animais sexualmente ativos, com idade entre 2 e 8 anos, e sem raça definida (GANGULY; DAS; DAS, 2013; HUPPES et al., 2014).

A principal via de transmissão do TVTC é o coito. O transplante de células tumorais ocorre por esfoliação celular e nidação à mucosa genital. No entanto, hábitos sociais caninos, tais como lambedura, mordedura e arranhadura, em que há perda da integridade da pele, (GANGULY; DAS; DAS, 2013), bem como hábitos maternos e parto também tem participação na transmissão (ROCHA; TREMORI; CARNEIRO, 2014).

Salvo a transmissão natural, o tumor pode ainda ser reproduzido experimentalmente por transplantação alogênica (COHEN 1978), xenogênica em modelos murinos (HOLMES, 1981), e em espécies filogeneticamente relacionadas, como raposas, coiotes e chacais (HIGGINS, 1966).

1.2 Aspectos clínicos e diagnóstico

O TVTC geralmente ocorre em sítios genitais, muito embora não raro também acomete sítios extragenitais (MASCARENHAS et al., 2014; REZAEI et al., 2016). O tumor pode ocorrer em diferentes regiões no cão, quer seja como um local primário de implantação ou então de metástase (FÊO; FLÓREZ; ROCHA, 2016). Um estudo aponta que 7 dos 90 casos do tumor estudados apresentaram implantação extragenital de origem primária, sendo apenas 1 de origem metastática (GUREL et al., 2002).

De um lado o tumor é considerado benigno, visto que sua presença no hospedeiro não costuma produzir alterações significativas à saúde e dificilmente há correlação com o óbito do hospedeiro (CHIKWETO et al., 2013), por outro lado, ao estudo citológico, o tumor apresenta diversas propriedades e características de malignidade (VALENÇOLA et al., 2015), além de potencial metastático (ROGERS; WALKER; DILLON; 1998).

Metástases de TVTC são consideradas incomuns (CALVERT; LEIFER; MACEWEN, 1982; VERMOOTEN, 1987; MILO; SNEAD, 2014), com ocorrência na maioria das vezes, estimada entre 0 e 5% dos casos (STRAKOVA; MURCHISON, 2014), acometendo olhos (FERREIRA et al., 2000), pele e tecido subcutâneo (SANTOS; CARDOSO; OLIVEIRA, 2011), linfonodos, tonsilas, cérebro, medula espinhal, músculos, glândula mamária, hipófise, rins, baço, pâncreas, fígado, pulmão, ovários, testículos (CHIKWETO et al., 2013; STRAKOVA; MURCHISON, 2014) e também os ossos (ABUOM; MANDE, 2006). Mas metástases em sítios extracutâneos ocorrem em apenas cerca de 1% dos cães

(CALVERT; LEIFER; MACEWEN, 1982).

Os principais sinais e queixas relatadas no atendimento clínico são a presença de secreção serossanguinolenta vaginal ou peniana, hematúria, tumefação genital, dificuldade de exposição peniana, odor fétido, lambedura excessiva (BRANDÃO et al., 2002), além de infecção parasitária por miíase (MOUTINHO et al., 1995).

Ao exame físico o tumor apresenta-se frequentemente como formações vegetantes multilobulares, em formato de couve-flor, de coloração rosácea, branca ou avermelhada, devido à intensa vascularização, podendo chegar a 15 cm de tamanho. Mas também pode existir como lesões em formas pendulares, nodulares e papilares. À palpação, o tumor é de consistência firme, mas friável - o que significa que sangra facilmente - e a superfície costuma exibir ulcerações (ROGERS, 1997; SILVA et al., 2007).

Nos machos, quando implantado em sítio genital, o tumor pode ser observado em qualquer parte do pênis e, ocasionalmente, no prepúcio. Contudo, o bulbo é a região mais afetada. Nas fêmeas, o tumor pode acometer a vagina, vestíbulo ou a junção vestíbulo-vaginal (GANGULY; DAS; DAS, 2013), podendo envolver também o orifício uretral, causar disúria e predispor a infecção do trato urinário (BATAMUZI; KRISTENSEN, 1996). Há casos ainda em que o tumor se estende da vagina ao útero (YANG, 1987).

Em muitos casos pode haver a extensão do tumor nasal para os seios maxilares e faringe, ou o envolvimento na cavidade oral, causando dispneia, espirros, epistaxe, halitose, epífora, e deformação facial (FÊO; FLÓREZ; ROCHA, 2016; REZAEI et al., 2016). Casos de TVTC envolvendo os olhos também foram descritos

(KOMNENOU et al., 2015).

O perfil hematológico de cães acometidos pelo tumor não costuma exibir alterações graves. Mas há menção de eritrocitose absoluta associada ao aumento sérico de eritropoietina como quadro clínico de síndrome paraneoplásica em cães apresentando grandes crescimentos tumorais, tanto no tumor transplantado (COHEN, 1985), como no naturalmente adquirido (DUARTE et al., 2006).

A suspeita diagnóstica ocorre através da história e dos sinais clínicos. Mas a confirmação diagnóstica de TVTC é feita pela citologia e histopatologia. O exame citológico costuma promover na maioria das vezes o diagnóstico conclusivo, devido a sua alta sensibilidade (ROCHA; TREMORI; CARNEIRO, 2014). As amostras celulares do tumor podem ser obtidas através de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) e de citologia de impressão ou imprint (SILVA et al., 2007; FÊO; FLÓREZ; ROCHA, 2016). São métodos simples minimamente invasivo e doloroso, de fácil execução e baixo custo (GANGULY; DAS; DAS, 2013). Ademais, a CAAF é útil quando se suspeita de metástases para linfonodos (ROCHA; TREMORI; CARNEIRO, 2014).

Métodos diagnósticos adicionais incluem a análise imunoistoquímica e citogenética (GANGULY; DAS; DAS, 2013). Os diagnósticos diferenciais, principalmente em cães com lesões em áreas não-genitais, incluem o linfoma, carcinomas de células basais, melanoma, mastocitoma e histiocitoma (VERMOOTEN, 1987).

1.3 Biologia tumoral

O TVTC é um tipo incomum de tumor transmissível, classificado como uma neoplasia indiferenciada de células redondas, e que pode mostrar à medida do fenótipo tumoral, variação no comportamento biológico e na resposta quimioterápica (DUZANSKI et al., 2016). A literatura centrada na biologia tumoral, especialmente na interação entre tumor e sistema imune é pouco compreendida. Além disso, o tumor não tem caracterização definida quanto à origem citogenética (UJVARI; PAPENFUSS; BELOV, 2016).

Há muitos estudos controversos e não conclusivos sobre a linhagem celular do TVTC. Alguns estudos imunoistoquímicos apontam para a origem mesenquimal e histiocítica do tumor, pois os oncócitos apresentaram imunoreatividade a vimentina, alfa-1-antitripsina, lisozima, antígeno específico de macrófagos (ACM-1) e foram negativos para as citoceratinas, S100, CD117, CD3, CD20, CD79, PAX 5, Melan A, alfa-actina de músculo liso (MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997; FLÓREZ et al., 2016b).

Esta hipótese foi ampliada quando células de TVTC foram encontradas sendo parasitadas por formas amastigotas de *Leishmania*, precisamente como acontece com macrófagos (ALBANESE et al., 2002; CATONE et al., 2003), porém essa tendência histiocítica para o tumor não tem sido observada em todos os estudos (MASCARENHAS et al., 2014). Por outro lado, é possível que a ausência de imunomarcagem em alguns casos ocorra em função de certo grau de heterogeneidade com relação ao imunofenótipo do tumor (O'NEILL, 2011). Atualmente os estudos

descrevem uma origem em linhagem mielóide (UJVARI; PAPENFUSS; BELOV, 2016).

De outra parte, estudos citogenéticos e imunológicos sustentam a teoria da contínua transplantação celular alogênica. Acredita-se que o TVTC originou-se há aproximadamente 11.000 anos atrás em lobos ancestrais do leste asiático (MURCHISON et al., 2014; STRAKOVA; MURCHISON, 2015), e que ao longo da história evolutiva da doença, instabilidades genéticas teriam gerado mutações de caráter cumulativo, estabilizadas após passagens subsequentes (MURGIA et al., 2006).

Enquanto no cão o cariótipo normal é de 78 cromossomos, dos quais 76 são acrocêntricos e um par sexual é metacêntrico, células do tumor exibem ampla variação no número de cromossomos, entre 56 a 68 (FLÓREZ et al., 2016b), onde 15 a 17 cromossomos são metacêntricos ou submetacêntricos (MURGIA et al., 2006). Porém o número de braços cromossômicos e a quantidade de DNA das células do tumor são iguais aos das células normais do cão (COHEN, 1978). As diferenças cromossômicas observadas entre o tumor e o cão podem ser resultados de fusões equilibradas, que terminam em rearranjo de material genético (MURGIA et al., 2006).

Tudo isso somado à identificação do cariótipo aneuplóide, bem como às características cromossômicas particulares, a exemplo da inserção do elemento LINE-1 no gene C-MYC em todos os TVTCs analisados em regiões geográficas distintas (FONSECA et al., 2012; LIMA et al., 2016), corrobora a origem comum e a teoria do transplante contínuo de células a gerações.

1.3.1 Características histológicas e citológicas

Histologicamente o TVTC exhibe um arranjo de células redondas ou ovais, distribuídas em padrão difuso e sustentadas por um escasso tecido estromal vascular. As células neoplásicas são grandes, apresentam núcleos grandes, redondos e hipercromáticos, geralmente com nucléolo proeminente. O citoplasma é granular, levemente eosinofílico, vacuolizado e com contornos distintos. Figuras mitóticas e infiltrado inflamatório são observados, particularmente plasmócitos linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, podendo variar de acordo com a fase clínica do tumor (ERÜNAL-MARAL; FINDIK; ASLAN, 2000).

As amostras citológicas do tumor normalmente exibem grande quantidade de células redondas ou ovais individualizadas, que variam entre 14 a 30 µm, caracterizadas por citoplasma com contornos bem delimitados, contendo múltiplos vacúolos dispersos. A vacuolização citoplasmática é uma característica marcante nas amostras citológicas do tumor. Ainda, os núcleos são excêntricos ou centrais, apresentam contornos regulares, cromatina agregada e nucléolos proeminentes. É comum observar anisocitose, anisocariose e macrocariose (AMARAL et al., 2007).

A relação núcleo:citoplasma varia conforme os tipos citomorfológicos do TVTC, plasmocitóide e linfocitóide. O tipo linfocitóide é composto por 60% ou mais de células redondas, com alta relação núcleo:citoplasma, caracterizadas por citoplasma vacuolinizado de aspecto granular fino, núcleos redondos, tendendo a centralização. Já o tipo plasmocitóide é composto por 60% ou mais de células ovais, com baixa relação núcleo:citoplasma, apresentam citoplasma vacuolinizado em

abundante quantidade e núcleo excêntrico. Quanto ao tipo misto, ambas as populações celulares plasmocitóide e linfocitóide são observadas, porém com nenhuma das populações excedendo 59% do total de células (AMARAL et al., 2007).

A classificação citomorfológica do TVTC parece implicar diferenças no comportamento tumoral. Estudos mostram que os tumores de fenótipo plasmocitóide estão associados a maior frequência de anormalidades nucleares e nucleolares, maiores índices mitóticos e de proliferação celular (marcador Ki-67), expressão de P-gp, além de menor quebra de DNA no teste do cometa. Em condições clínicas, estes achados podem aumentar as chances de metástases, recidivas e resistência quimioterápica (DUZANSKI et al., 2016).

1.4 Tratamento

Entre as formas de tratamento descritas estão a radioterapia, crioterapia, cirurgia, quimioterapia e mais recentemente a imunoterapia (GANGULY; DAS; DAS, 2013). A escolha de uma terapia específica ou associação delas pode depender da localização e do estadiamento do tumor, assim como do fenótipo do TVTC (DUZANSKI et al., 2016).

A cirurgia foi durante muito tempo o tratamento preconizado (IDOWU, 1984), mas a dificuldade em delimitar as margens de segurança do tumor e a localização, muitas vezes inacessível, implica em alta taxa de recidiva. Além disso, por ser um tratamento cruento, há um alto risco de transplantação de células tumorais na ferida cirúrgica e em outros sítios por contaminação de luvas e instrumentais

cirúrgicos (GANGULY; DAS; DAS, 2013).

A crioterapia é uma alternativa a cirurgia cruenta. Age destruindo as células neoplásicas por congelamento, com mínimo dano à área adjacente, tendo como vantagem principal a ausência dos efeitos colaterais nocivos da radioterapia e da quimioterapia. Apesar disso, somente produz resultados satisfatórios em tumores pediculados, não disseminados e de fácil exposição. Tende a apresentar alto índice de recidiva quando utilizada como terapia única (GOLOUBEFF; OLIVEIRA, 1999).

O TVTC está entre os mais radiosensíveis de todos os tumores caninos. Em geral, a radioterapia apresenta excelentes resultados em pouco tempo, e pode ser indicada para os casos sem metástases, crônicos e que não responderam aos tratamentos com quimioterápicos. Entretanto, a necessidade de equipamento especializado, mão-de-obra qualificada e os custos inviabilizam o seu emprego (ROGERS; WALKER; DILLON, 1998).

Devido à boa resposta de regressão tumoral e relativa baixa toxicidade quando comparada aos demais quimioterápicos, a quimioterapia com sulfato de vincristina tem se mostrado eficaz no tratamento do TVTC, constituindo o tratamento de eleição. O protocolo terapêutico consiste de três a oito aplicações intravenosas da droga, na dose de 0,5 a 0,75 mg/m², semanalmente (SILVA et al., 2007; HANTRAKUL et al., 2014).

A vincristina é um alcaloide derivado da vinca, que age ligando-se a proteínas microtubulares do fuso mitótico, causando interrupção na metáfase. Provoca alterações em diversas linhagens celulares podendo implicar em alguns efeitos colaterais. No cão há menção de anorexia, vômito, constipação, diarreia, necrose da

mucosa do trato gastrointestinal, dor abdominal, depressão, hiperestesia, ataxia (HAMILTON et al., 1991; MARTINS et al., 2014), infertilidade temporária (SARATSIS; YPSILANTIS; TSELKAS, 2000), embora a toxicidade hematológica, caracterizada por leucopenia, trombocitopenia e anemia é o efeito colateral mais comumente descrito (ALLEMAN; HARVEY, 1991; HANTRAKUL et al., 2014).

A P-gp é um produto do gene MDR-1 que age como uma bomba de efluxo dependente de energia transportando fármacos para a parte externa das células (AZEREDO; UCHÔA; COSTA, 2009). Ambas as superexpressões do gene MDR-1 e da P-gp pelas células do TVTC já foram descritas, e parecem desempenhar um papel importante na resistência intrínseca à quimioterapia (GERARDI et al., 2014; FLÓREZ et al., 2016a).

Em casos de tumores resistentes à vincristina, as drogas indicadas incluem a doxorrubicina ou a ciclofosfamina (ROGERS, 1997). Contudo, alguns estudos mostram o potente efeito antitumoral das avermectinas (ivermectina e selamectina) quando associadas à vincristina para o tratamento de tumores resistentes em função da sua capacidade de inibir a expressão da P-gp pela célula tumoral e reduzir a resistência quimioterápica (DIDIER; LOOR, 1996; GRIFFIN et al., 2005; LAPA et al., 2012).

Quanto à imunoterapia, até agora, a utilização do Bacilo Calmette-Guérin's (BCG) (ROGERS et al., 1997), do fator de transferência dialisável (TFd), do RNA anti-TVTC (TINUCCI-COSTA, 1994), de interleucinas (CHOU et al., 2009; CHUANG et al., 2009; DEN OTTER et al., 2015), e de vacina com células dendríticas (DCs) (PAI et al., 2011) vem sendo estudados e os resultados, apesar de

variáveis, indicam que a imunoterapia é um meio promissor e favorável ao tratamento do tumor.

Por outro lado, é um tratamento de longo prazo, aproximadamente 50 dias, envolvendo aplicações intratumorais, semanalmente (ROGERS 1997). Estas aplicações levam ao aparecimento de edema e necrose nos tumores provocando intensa exsudação sanguinolenta e odor pútrido, o que normalmente desencoraja os proprietários a dar continuidade ao tratamento (TINUCCI-COSTA,1999).

Como forma de prevenir o TVTC é altamente recomendável a esterilização dos cães, assim como o impedimento aos hábitos de vida livre, em cumprimento a responsabilidade civil objetiva aos donos pela guarda dos cães.

5. REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. p.389.
2. Abuom TO, Mande JD. Transmissible Venereal Tumor with Subcutaneous and Bone Metastasis in a Dog. *The Kenya Veterinarian*. 2006; 30(1): 10-12.
3. Albanese F, Poli A, Millanta F, Abramo F. Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with *Leishmania*-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin? *Vet Dermatol*. 2002;13(5):243-246.
4. Alleman AR, Harvey JW. The morphological effects of vincristine sulfate on canine bone marrow cells. *Vet Clin Pathol*. 1993;22(2):36-41.
5. Amaral AS, Bassani-Silva S, Ferreira I, Fonseca LS, Andrade FHE, Gaspar LFJ, Rocha NS. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. *Rev Port Ciên Vet*. 2007; 103:563–564.
6. Amaral AS, Gaspar LF, Bassani-Silva S, Rocha NS. Cytological diagnostic of transmissible venereal tumor in the Botucatu region, Brazil (descriptive study: 1994-2003). *Rev. Port. Ciên. Vet*. 2004; 99(551):167–171.
7. Azeredo FJ, Uchôa FT, Cost TD. Papel da Glicoproteína-P na Farmacocinética e nas Interações Medicamentosas. *Rev. Bras. Farm*. 2009; 90(4): 321-326.
8. Babo V, Bernardo KC. Tumor venéreo transmissível canino: 159 casos. *A Hor Vet*. 1999; 19(110): 76-77.
9. Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, Paulos CM. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Front Immunol*. 2014; 5(276): 1-10.
10. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392:245–252.
11. Batamuzi EK, Kristensen F. Urinary tract infection: the role of canine transmissible venereal tumour. *J Small Anim Pract*. 1996; 37(6):276-279.
12. Belov K. The role of the Major Histocompatibility Complex in the spread of contagious cancers. *Mamm Genome*. 2011; 22:83–90.
13. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 1987; 329(6139):506-512.

14. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:287-320.
15. Borghaei H, Smith MR, Campbell KS. Immunotherapy of cancer. *Eur J Pharmacol.* 2009; 625(1-3):41-54
16. Bos R, Sherman LA. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res.* 2010; 70(21):8368-8377.
17. Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(5):373-382.
18. Bradley LM. Migration and T-lymphocyte effector function. *Curr Opin Immunol* 2003; 15(3):343-348.
19. Brandão CS, Borges AG, Ranzani JT, Rahal SC, Teixeira CR, Rocha NS. Tumor venéreo transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). *Rev Ed Cont Med Vet Zootec,* 2002; 5(1): 25-31.
20. Calvert CA, Leifer CE, MacEwen EG. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1982;181(2):163-4.
21. Catone G, Marino G, Poglayen G, Gramiccia M, Ludovisi A, Zanghì A. Canine transmissible venereal tumour parasitized by *Leishmania infantum*. *Vet Res Commun.* 2003; 27(7): 549-553.
22. Chandler JP, Yang TJ. Canine transmissible venereal sarcoma: distribution of T and B lymphocytes in blood, draining lymph nodes and tumors at different stages of growth. *Bra J Cancer.* 1981; 44(4):514-521.
23. Chikweto A, Kumthekar S, Larkin H, Keshaw CDP, Sharma TRN, Bhaiyat MI. Genital and Extragenital Canine Transmissible Venereal Tumor in Dogs in Grenada, West Indies. *OJVM.* 2013; 3(2): 111-114.
24. Chou PC, Chuang TF, Jan TR, Gion HC, Huang YC, Lei HJ, Chen WY, Chu RM. Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009; 130(1-2):25-34.
25. Chu RM, Lin CY, Liu CC, Yang SY, Hsiao YW, Hung SW et al. Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. *Anticancer Res.* 2001;21: 4017-4024.

26. Chuang TF, Lee SC, Liao KW, Hsiao YW, Lo CH, Chiang BL, Lin XZ, Tao MH, Chu RM. Electroporation-mediated IL-12 gene therapy in a transplantable canine cancer model. *Int J Cancer*. 2009; 125(3):698-707.
27. Cohen D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. *Adv Cancer Res*. 1985; 43:75-112.
28. Cohen D. The transmissible venereal tumor of the dog--a naturally occurring allograft? A review. *Isr J Med Sci*. 1978; 14(1):14-19.
29. Den Otter W, Hack M, Jacobs JJ, Tan JF, Rozendaal L, Van Moorselaar RJ. Treatment of transmissible venereal tumors in dogs with intratumoral interleukin-2 (IL-2). A pilot study. *Anticancer Res*. 2015; 35(2):713-717.
30. Delamarre L, Holcombe H, Mellman I. Presentation of Exogenous Antigens on Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Molecules Is Differentially Regulated during Dendritic Cell Maturation. *J Exp Med*. 2003; 198(1): 111–122.
31. Didier A, Loor F. The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs*. 1996; 7(7):745-751.
32. Dorner BG, Smith HR, French AR, Kim S, Poursine-Laurent J, Beckman DL, Pingel JT, Kroczeck RA, Yokoyama WM. Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol*. 2004; 172: 3119–3131.
33. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol*. 2006;90:51-81.
34. Drumond KO, Quessada AM, Silva SMM, Costa FAL, Silva LS, Pinho FA, Lopes RRF. Transmissible venereal tumor treated with autohemotherapy. *Acta Sci Vet*. 2013;41: 1107.
35. Duarte R, Niero R, Doretto JS, Manzan RM, Kogika MM. Eritrocitose associada a tumor venéreo transmissível em cão: relato de caso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2006; 58(6):1018-1023.
36. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004; 21(2):137-148.
37. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002; 3(11):991-998.

38. Duzanski AP, Fêo HB, Montoya LM, Seullner CV, Rocha NS. Canine Transmissible Venereal Tumor: Is its biological behavior changing? *Anat Rec (Hoboken)*. 2016.
39. Epstein RB, Bennett BT. Histocompatibility typing and course of canine venereal tumors transplanted into unmodified random dogs. *Cancer Res*. 1974; 34:788–793.
40. Felton MA, Yang TJ. Role of humoral immunity in progressive and regressive and metastatic growth of the canine transmissible venereal sarcoma. *Oncology*. 1988; 45(3): 210-213.
41. Fêo HB, Flórez LMM, Rocha NS. Tumor venéreo transmissível canino: análise da casuística 2008-2014 no hospital veterinário de Botucatu. *Vet e Zootec*. 2016; 23(3): 409-418.
42. Ferreira AJ, Jaggy A, Varejão AP, Ferreira ML, Correia JM, Mulas JM, Almeida O, Oliveira P, Prada J. Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. *J Small Anim Pract*. 2000; 41(4):165-168.
43. Floréz LMM, Fêo HB, Silva GN, Yamatogi RS, Aguiar AJ, Araújo JP, Rocha, NS. Cell cycle kinetics, apoptosis rates and gene expressions of MDR-1, TP53, BCL-2 and BAX in transmissible venereal tumour cells and their association with therapy response. *Vet Comp Oncol*. 2016a.
44. Flórez LMM, Ballesteros HF, Duzanski AP, Paulo R.O, Bersano PRO, Lima JF, Cruz FL, Mota LS, Rocha NS. Immunocytochemical characterization of primary cell culture in canine transmissible venereal tumor. *Pesq. Vet. Bras*. 2016b; 36(9):844-850.
45. Fonseca LS, Mota LSL, Colodel MM, Ferreira I, Brandão CVS, Rocha NS. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: association between different phenotypes and the insertion LINE-1/c-myc. *Rev Colomb Cienc Pecu*. 2012; 25: 402-408.
46. Fremd C, Schuetz F, Sohn C, Beckhove P, Domschke C. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology*. 2013; 2(7):e25443.
47. Ganguly B, Das U, Das K. Canine transmissible venereal tumour: a review. *Vet Comp Onc* 2013; 11(4):1–12.
48. Gerardi DG, Tinucci-Costa M, Silveira ACT, Moro JV. Expression of P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein, glutathione-S-

- transferase pi and p53 in canine transmissible venereal tumor. *Pesq. Vet. Bras.* 2014; 34(1):71-78.
49. Goloubeff B, Oliveira HP. Tratamento criocirúrgico de tumores e fístulas, em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 1999; 51(5):463-470.
50. Grandi F, Miot HA, Cogliati B, Rocha NS. A Review of tumor initiating cells in veterinary oncology and potencial implications in canine transmissible venereal tumours. *Research and Reviews.* 2016.
51. Gray D, Gray M, Barr T. Innate responses of B cells. *Eur J Immunol* 2007; 37(12):3304-3310.
52. Griffin J, Fletcher N, Clemence R, Blanchflower S, Brayden DJ. Selamectin is a potent substrate and inhibitor of human and canine P-glycoprotein. *J Vet Pharm Therap.* 2005; 28(3):257-265.
53. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010; 140(6):883-899.
54. Gurel A, Kuscü B, Gulanber EG, Arun SS. Transmissible Venereal Tumors Detected in the Extra- genital Organs of Dogs. *Is J of Vet Med.* 2002; 57(2): 1-8.
55. Hamilton TA, Cook JR Jr, Braund KG, Morrison WB, Mehta JR. Vincristine-induced peripheral neuropathy in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;198(4):635-638.
56. Hantrakul S, Klangkaew N, Kunakornsawat S, Tansatit T, Poapolathep A, Kumagai S, Poapolathep S. Clinical pharmacokinetics and effects of vincristine sulfate in dogs with transmissible venereal tumor (TVT). *J Vet Med Sci.* 2014; 76(12):1549-1553.
57. Higgins DA. Observations on the canine transmissible venereal tumour as seen in the Bahamas. *Vet. Rec.* 1966; 79:67-71.
58. Holmes JM. Measurement of the rate of death of canine transmissible venereal tumour cells transplanted into dogs and nude mice. *Res Vet Sci.* 1981; 30(2):248-250.
59. Hsiao YW, Liao KW, Chung TF, Liu CH, Hsu CD, Chu RM. Interactions of host IL-6 and IFN-c and cancer-derived TGF-b1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57:1091-1104.

60. Hsiao YW, Liao KW, Hung SW, Chu RM. Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF- β 1 and restores the lymphokine-activated killing activity. *J Immunol*. 2004; 172(3):1508–1514.
61. Hsiao YW, Liao KW, Hung SW, Chu RM. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002; 87(1-2):19–27.
62. Huppes RR, Silva CG, Uscategui RAR, De Nardi AB, Souza FW, Tinucci Costa M, Amorim RL, Pazzini JM, Faria JLM. Tumor venéreo transmissível (tvt): estudo retrospectivo de 144 casos. *Ars Vet*. 2014; 30(1): 13-18.
63. Idowu AL. A retrospective evaluation of four surgical methods of treating canine transmissible venereal tumor. *J Small Anim Pract*. 1984; 25:193-198.
64. Jessy T. Immunity over inability: The spontaneous regression of cancer. *J Nat Sci Biol Med*. 2011;2(1):43-49.
65. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(5):273-290.
66. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000; 343(10): 702-709.
67. Komnenou AT, Thomas AL, Kyriazis AP, Poutahidis T, Papazoglou LG. Ocular manifestations of canine transmissible venereal tumour: a retrospective study of 25 cases in Greece. *Vet Rec*. 2015;176(20):523.
68. Lapa FAS, Andrade SF, Gervazoni ER, Kaneko VM, Sanches OC, Filho LRAG. Histopathological and cytological analysis of transmissible venereal tumor in dogs after two treatment protocols. *Colloq Agra*. 2012; 8(1):36-45.
69. Liao K, Hung S, Hsiao Y, Bennett M, Chu R. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2003; 92(3-4):149-62.
70. Lima CRO, Faleiro MBR, Rabelo RE, Vulcani VAS, Rubini MR, Torres FAG, Moura VMBD. Insertion of the LINE-1 element in the C-MYC gene and immunoreactivity of C-MYC, p53, p21 and p27 proteins in different morphological patterns of the canine TVT. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2016; 68(3):658-666.
71. Liu CC, Wang YS, Lin CY, Chuang TF, Liao KW, Chi KH, Chen MF, Chiang HC, Chu RM. Transient downregulation of monocyte-derived

- dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an in vivo canine model of transmissible venereal tumor. *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57(4):479-491
72. Maccalli C, Scaramuzza S, Parminani G. TNK cells (NKG2D+ CD8+ or CD4+T lymphocytes) in controlo f human tumors. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:801-808.
73. Marchal T, Chabanne L, Kaplanski C, Rigal D and Magnol JP: Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumor. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997; 57: 1-11.
74. Martins BC, Martins GC, Horta RS, Torres BBJT, Branco SEMT, Lavalle GE. Sensory-Motor Neuropathy Due to Vincristine Treatment in a Dog. *Acta Sci Vet.* 2014; 42:59.
75. Mascarenhas MB, Peixoto PV, Ramadinha RR, Yamasaki EM, Costa SZR, Driemeiers D, Sonnes L, França TN. Immunohistochemical study of genital and extragenital forms of canine transmissible venereal tumor in Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2014; 34(3):250-254.
76. Milo J, Snead E. A case of ocular canine transmissible venereal tumor. *Can Vet J.* 2014;55(1):1245-1249.
77. Mizuno S, Fujinaga T, Hagio M. Role of lymphocytes in spontaneous regression of experimentally transplanted canine transmissible venereal sarcoma. *J Vet Med Sci.* 1994; 56(1):15-20.
78. Moutinho FQ, Sampaio GR, Teixeira CR, Sequeira JL, Laufer R. Tumor venéreo transmissível com metástases cutâneas em um cão. *Cienc R.* 1995; 25(3):469-471.
79. Mozos E, Mendez A, Gomez-Villamandos JC, de Las Mulas J and Perez J: Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. *Vet. Pathol* 33: 257-263,1996.
80. Mukaratirwa S, Gruys E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *The Veterinary Quarterly.*2003; 25(3): 101-111, 2003.
81. Murchison EP, Wedge DC, Alexandrov LB, Fu B, Martincorena I, Ning Z, Tubio JM, Werner EI, Allen J, De Nardi AB, Donelan EM, Marino G, Fassati A, Campbell PJ, Yang F, Burt A, Weiss RA, Stratton MR. Transmissible [corrected] dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. *Science.* 2014; 343(6169):437-440.

82. Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss RA. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*. 2006; 126(3):477-487.
83. Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(12):823-836.
84. Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M, Sato T, Habu S, Tashiro H, M Sato, Ohta A. Distinct Role of Antigen-Specific T Helper Type 1 (Th1) and Th2 Cells in Tumor Eradication in Vivo. *J Exp Med*. 1999; 190(5): 617–628.
85. Old LJ, Boyse EA. Immunology of Experimental Tumors. *Annu. Rev. Med*. 1964;15:167–186.
86. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res*. 2011;71:3505–3515.
87. O'Neill ID. Concise review: transmissible animal tumors as models of the cancer stem-cell process. *Stem Cells*. 2011; 29(12):1909-1914.
88. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29(8):1093-1102.
89. Pai CC, Kuo TF, Mao SJ, Chuang TF, Lin CS, Chu RM. Immunopathogenic behaviors of canine transmissible venereal tumor in dogs following an immunotherapy using dendritic/tumor cell hybrid. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011; 139(2-4):187-199.
90. Park, M, Kim Y, Kang M, Oh S, Cho D, Shin N, Kim D. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. *J Vet Diagn Invest*. 2006; 18: 130-133.
91. Pérez J, Day MJ, Mozos E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998;64(2):133-147.
92. Powers RD. Immunologic properties of canine transmissible venereal sarcoma. *Am J Vet Res*. 1968; 29(8): 1637-1645.
93. Rechavi G, Katzir N, Ramot B. Kaposi's sarcoma among AIDS patients: transmissible venereal tumour by cell engraftment? *Med. Hypotheses*. 1991; 34(4):380-341.

94. Reuschenbach M, Doeberitz M, Wentzensen N. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol Immunother.* 2009; 58(10):1535-1544.
95. Rezaei M, Azizi S, Shahheidaripour S, Rostami S. Primary oral and nasal transmissible venereal tumor in a mix-breed dog. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2016; 6(5):443-445.
96. Rocha NS, Tremori TM, Carneiro JAM. Fine Needle Aspiration Cytology in the Diagnosis of Canine Cutaneous Transmissible Venereal Tumor— Case Report. *OJVM.* 2014; 4: 204-209.
97. Rogers KS. Transmissible venereal tumor. *Comp Cont Educ Pratic Vet.* 1997; 19(9):1036-1045.
98. Rogers K, Walker M, Dillon H. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. *JAAH,* 1998; 34(6): 463-470.
99. Rudd CE. CD4, CD8 and the TCR-CD3 complex: a novel class of protein-tyrosine kinase receptor. *Immunol Today.* 1990; 11(11):400-406.
100. Santos IFC, Cardoso JMM, Oliveira KC. Metástases cutâneas de tumor venéreo transmissível canino – Relato de caso. *Medvep.* 2011; 9(31):639-645.
101. Santos FGA, Moro L, Cassali GD, Paixão TA, Campos PP, Silva SS, Vasconcelos AC. Cell proliferation markers in the transplanted canine transmissible venereal tumor. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.,* 2011; 63(6):1345-1352.
102. Santos FGA, Vasconcelos AC, Nunes JES, Cassali GD, Paixão TA, Martins AS; Silva SS. Apoptosis in the transplanted canine transmissible venereal tumor during growth and regression phases. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2008; 60(3):607-612.
103. Saratsis P, Ypsilantis P, Tselkas K. Semen quality during vincristine treatment in dogs with transmissible venereal tumor. *Theriogenology.* 2000; 53(5):1185-1192.
104. Schwartz M, Zhang Y, Rosenblatt JD. B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *J Immunother Cancer.* 2016;4:40.
105. Sengupta N, MacFie TS, MacDonald TT, Pennington D, Silver AR. Cancer immunoediting and "spontaneous" tumor regression. *Pathol Res Pract.* 2010; 206(1):1-8.

106. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107-1111.
107. Siddle HV, Kaufman J. Immunology of naturally transmissible tumours. *Immunology*. 2015;144(1):11-20.
108. Silva MCV, Barbosa RR, Santos RC, Chagas RSN, Costa WP. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no hospital veterinário da UFERSA. *Act Vet Bras*. 2007; 1(1): 28-32.
109. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005;42(4):501-10.
110. Stockmann D, Ferrari HF, Andrade AL, Lopes RA, Cardoso TC, Luvizotto MCR. Canine transmissible venereal tumours: aspects related to programmed cell death. *BJVP*. 2011; 4:67-75.
111. Strakova A, Murchison EP. The cancer which survived: insights from the genome of an 11000 year-old cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2015; 30:49-55.
112. Strakova A, Murchison EP. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. *BMC Vet Res*. 2014; 10:168.
113. Street SE, Hayakawa Y, Zhan Y, Lew AM, MacGregor D, Jamieson AM, Diefenbach A, Yagita H, Godfrey DI, Smyth MJ. Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells. *J Exp Med*. 2004; 199:879-884.
114. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*. 2001; 97(1):192-197.
115. Tinucci-Costa M. Utilização do fator de transferência dialisável (TFd) e RNA imune na imunoterapia de cães portadores naturais do tumor venéreo transmissível canino (TVT) [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp; 1994.
116. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3(2):133-146.
117. Ugel S, De Sanctis F, Mandruzzato S, Bronte V. Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3365-3376.

118. Ujvari B, Papenfuss AT, Belov K. Transmissible cancers in an evolutionary context. *Inside the cell*. 2016; 1(1):17-26.
119. Valençola RA, Antunes TR, Sorgatto S, Oliveira BB, Godoy KCS, Souza AI. Aspectos citomorfológicos e frequência dos subtipos do tumor venéreo transmissível canino no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Acta Veterinaria Brasilica*. 2015; 9(1):p.82-86.
120. Vermooten MI. Canine transmissible venereal tumor (TVT): a review. *J S Afr Vet Assoc*. 1987; 58(3):147-50.
121. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. 2015; 35:185-198.
122. Wagner JL, Burnett RC, Storb R. Organization of the canine major histocompatibility complex: current perspectives. *J Hered*. 1999; 90(1):35-38.
123. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*. 2008; 27:5932–5943.
124. Yang TJ, Jones JB. Canine Transmissible Venereal Sarcoma: Transplantation Studies in Neonatal and Adult Dogs. *J Nat Cancer Inst*. 1973; 51(6): 1915-1918.
125. Yang TJ. Metastatic transmissible venereal sarcoma in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. 1987; 190(5):555-556.
126. Yuan A, Hsiao YJ, Chen HY, Chen HW, Ho CC, Chen YY, Liu YC, Hong TH, Yu SL, Chen JJ, Yang PC. Opposite Effects of M1 and M2 Macrophage Subtypes on Lung Cancer Progression. *Sci Rep*. 2015; 5:14273.