

**DANIELA STOCHMANN SILVA**

**DETECÇÃO DO GENE TP53 E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS p53,  
Bcl-2 E p63 NO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO**

**ARAÇATUBA – SP  
2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**" JÚLIO DE MESQUILA FILHO "**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO DE MEDICINA VETERINÀRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**DETECÇÃO DO GENE TP53 E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS p53,  
Bcl-2 E p63 NO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO**

**Daniela Stochmann Silva**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto**

**Co-orientação: Profa Dra. Tereza Cristina Cardoso Silva**

*Dissertação* apresentada à Faculdade de Odontologia – Unesp, Curso de Medicina Veterinária, Campus Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

**ARAÇATUBA – SP**  
**2010**

### **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Daniela Stochmann Silva – RG 25.848.609 e CPF 166.730.358-97**

nascida em 10 de novembro de 1976 na cidade de **São** Paulo, Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Anhembi Morumbi – SP em 2008, com ênfase em Patologia Clínica Veterinária e Citopatologia. Atualmente exerce atividades junto ao laboratório de Patologia Animal, UNESP.

Nasceste no lar que precisavas.  
Vestiste o corpo físico que merecias.  
Moras onde melhor Deus te proporcionou, de acordo com teu  
adiantamento.

Possuis os recursos financeiros coerentes com as tuas necessidades,  
nem mais, nem menos, mas o justo para as tuas lutas terrenas.  
Teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua  
realização.

Teus parentes e amigos são as almas que atraístes, com tua própria  
afinidade.

Portanto, teu destino está constantemente sobre teu controle.  
Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas, expulsas, modificas, tudo  
aquilo que te rodeia a existência.

Teus pensamentos e vontade são a chave de teus atos, atitudes são as  
fontes de atração e repulsão na tua jornada vivencial.

Não reclames, nem te faças de vítima.  
Antes de tudo, analisa e observa.  
A mudança está em tuas mãos.  
Reprograme tua meta,  
Busque o bem e viverás melhor.

**“Francisco Cândido Xavier”**

## DEDICATÓRIA

*“Nunca chegaria a lugar algum se não existissem as pessoas, estando elas presentes ou não*

*Sem elas não seria possível seguir, caminhar, viver*

*Elas são como um pilar em nossas vidas, mas muitas vezes não sabem disso,*

*E não é uma obrigação.*

*Não estou falando que qualquer pessoa, falo daquelas que, de alguma forma se importaram, se lembraram, sofreram e comemoram junto cada vitória.....*

*..... e até brigaram quando necessário!!!*

*Para descobrir quem são elas, não é fácil. É preciso sofrer, porque nos momentos mais difíceis é onde que elas aparecem, e ai sabemos, quem realmente são!*

*São como anjos que vieram com a missão de nos encorajar, apoiar, dar força, esperança, motivação. Ajudam como podem contribuem com que elas têm de melhor e de mais precioso.*

*E fazem tudo isso sem pedir nada em troca.*

*Quando reconhecemos quem são esses anjos que torcem por nós, não podemos deixá-los ir embora.*

*Impossível seguir sem eles!!!*

*Dedico a cada um, todos os momentos que passei durante o projeto que me levaram a sua conclusão.*

*Primeiro, claro, à minha mãe, pois, sei que mesmo distante vibrou por cada conquista, mais que qualquer pessoa no mundo.*

*Segundo, ao Márcio que com a maior paciência do mundo escutou todas as minhas reclamações, todas as minhas dúvidas, compartilhou também os bons momentos e me deu todo o apoio que estava em seu alcance.*

*A Dona Angela, que com seu carinho e sua sensibilidade, mesmo longe, podia sentir sua presença.*

*E também a minha avó e minha tia, que nunca se esqueceram.*

*“Sem vocês, eu não teria iniciado e não teria terminado o que comecei.”*

## **AGRADECIMENTOS**

Em um projeto sempre existe a contribuição de muitas pessoas e o meu não foi diferente. Muitos deixaram sua marca, para que essa etapa fosse concluída com louvor.

Primeiro quero agradecer ao meu pai, por sua colaboração e apoio durante esse período

Quero agradecer à minha orientadora Professora Maria Cecília Rui Luvizotto, por aceitar me orientar. Pela oportunidade e confiança que depositou em mim no desenvolvimento do projeto e também pelo apoio durante o período que fiquei em Araçatuba.

Quero agradecer à Professora Tereza Cristina, por auxiliar no meu projeto, com o maior carinho e paciência. Por ceder seu laboratório para o desenvolvimento da parte experimental, pela sua atenção e disponibilidade em resolver minhas dúvidas.

Agradeço ao Professor Alexandre Lima de Andrade, pelas sugestões para melhorar o artigo. E por toda a ajuda e apoio durante o projeto.

Agradeço ao Professor Marcio Moreira, por seus conselhos e por sua ajuda que me levou até a Profa. Maria Cecília e início do mestrado.

Agradeço ao Doutorando Rodrigo Lopes, que dedicou parte do seu tempo me auxiliando na parte experimental da pesquisa.

A professora Silvia Perri, por realizar a análise estatística do meu trabalho.

Agradeço a Magna, por sua paciência, e pelo auxílio no laboratório de histopatologia.

Agradeço ao Zé, pela boa vontade de nos ajudar com as necropsias e por sempre ter um cafezinho fresco a nossa disposição.

Agradeço aos meus cães, fonte de inspiração, Krica, Bella, Alvin e Thi.

Agradeço aos amigos que contribuíram cada um de sua forma, para a conclusão desse trabalho Camila Homem, Mayumi Gouveia, Milla Paiva, Aline Alvarenga, Augusto Schweigert, Ana Carolina Guedes, Vanessa Borges, Heitor Ferrari e Silmara Sakamoto.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	15
ABSTRACT	16
CAPÍTULO 1 – 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	17
1.1 TRANSMISSAO E ETIOLOGIA	18
1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PATOLOGICAS	21
1.3 CARACTERISTICAS HISTOPATOLOGICAS	22
1.4 CARACTERÍSTICAS CITOPATOLÓGICAS	23
1.5 SISTEMA IMUNOLÓGICO E TVTC	24
2. FAMÍLIA P53	26
3. FAMÍLIA BCL-2	29
4. OBJETIVO	31
5. CONCLUSAO	32
6. REFERENCIAS	33
CAPÍTULO 2 - ARTIGO DETECCAO DO GENE TP53 E EXPRESSAO DA PROTEÍNA P53, P63 E BCL-2 NO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO	44
1.INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS	47
2.2 DETECÇÃO DO GENE TP53 E TRANSCRIÇÃO DA SUA PROTEÍNA P53	48
2.2.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA	48



2.2.2 REAÇÃO DE RT-PCR ( <i>REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION</i> ) E PRODUÇÃO DA SONDA BIOTINILADA PARA O GENE TP53	48
2.2.3 REACAO DE HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	50
2.3. EXPRESSÃO DO RNAm CORRESPONDENTE AO GENE TP53 PELA REAÇÃO DE RT-PCR <i>IN SITU</i>	51
2.4 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS P53, P63 E BCL-2	52
2.4.1 IMUNOISTOQUIMICA PARA A DETECCAO DAS PROTEÍNAS P53, P63 E BCL-2	52
2.4.2 REACAO DE IMUNOFLUORESCENCIA PARA A DETECCÃO DAS PROTEÍNAS P53 E P63	53
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
3 RESULTADOS	54
3.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA	54
3.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA	55
3.2.1 HISTOPATOLOGIA	55
3.2.2 DETECCAO DO GENE TP53 POR RT-PCR <i>IN SITU</i> E ISH	57
3.2.3 IMUNOFLUORESCENCIA PARA P53 E P63	58
3.2.4 IMUNOISTOQUIMICA PARA P53 E P63	59
4 DISCUCAO	62
5 CONCLUSAO	66
REFERENCIAS	67
ANEXOS	70

**LISTA DE ABREVIATURAS**

µl - micro litro

µg – microgramas

µm–micromêtro

UI– Unidade Internacional

mM – micrometros

cDNA – fita complementar do RNA

DAB – diaminobenzidina 3,3

DAPI– 4'6 diamidino-2-fenilindole (1:1000)

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – deoxinucleotídeo

DTT – dethiltetriol

FITC – isotiocianato de fluoresceína

HE – hematoxilina-eosina

IF – imunofluorescência

IHQ – imunoistoquímica

ISH – hibridização *in situ*

PCR – reação em cadeia da polimerase

PBS – solução tamponada de fosfato

pH – potencial hidrogeniônico

pb – pares de base

RT-PCR - transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase

RNA<sub>m</sub> – ácido ribonucléico mensageiro

SSC – solução citrato de sódio

SDS – dodecil sulfato sódio

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Histopatológico das amostras de TVTC, corados com HE, evidenciando as diferentes fases de desenvolvimento tumoral (Pag. 55)

**Figura 2.** ISH e RT-PCR *in situ* exibindo o DNA correspondente ao TP53 representado e o seu respectivo RNAm, respectivamente (Pag. 56)

**Figura 3** Expressão de p53 e p63 pela técnica de imunofluorescência (Pag. 57).

**Figura 4.** Expressão de p53, p63 e Bcl-2 por imunohistoquímica (Pag. 58).

**Figura 5. A e B-** Gráficos resumindo, os dados obtidos por Imunohistoquímica e por imunofluorescência (Pag. 59).

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Detecção do DNA do TP53 e seu RNAm correspondente através das técnicas de RT-PCR/ISH ( Pag. 56).

**Tabela 2:** Imunofluorescência para expressão das proteínas p53 e p63, na com relação à intensidade e quantidade do sinal. (Pag. 57).

**Tabela 3:** Imunoistoquímica para as proteínas p53, p63 e Bcl-2, com relação à intensidade e quantidade do sinal (Pag. 58).

# *Capítulo 1*

## RESUMO

O tumor venéreo transmissível canino (TVTC) é uma neoplasia transmitida entre cães saudáveis pelo contato direto de pele e/ou mucosas lesionadas. Face aos escassos estudos relacionados aos eventos celulares envolvidos nas fases de crescimento do TVTC, o presente estudo teve por objetivo identificar a presença do gene TP53 e o RNAm referente a proteína codificada, além de detectar a expressão das proteínas p53, Bcl-2 e p63 em cortes histológicos de 13 amostras de TVTC. Com relação à evolução da neoplasia, 46% das amostras foram consideradas em fase de progressão e 54% no estágio de regressão. Foram utilizadas as técnicas de hibridização *in situ* (ISH) e RT-PCR *in situ*, que demonstrou a presença do DNA homólogo ao TP53 e seu respectivo RNAm em 92,30% das amostras. A expressão das proteínas p53, p63 e Bcl-2 foram detectadas em 50%, 70% e 100% das amostras, respectivamente. A p63 foi expressa de forma evidente nas amostras em regressão, porém a p53 e a Bcl-2 não apresentaram relação com o estágio evolutivo do tumor e provavelmente não podem ser analisados como fatores de prognóstico do TVTC. Observou-se, nesse estudo que, através das técnicas de ISH e RT-PCR *in situ* foi possível detectar o DNA do TP53 e seus transcritos, porém esse fato não significou a transcrição da p53, devido aos baixos níveis de expressão nas análises quantitativa e qualitativa nas amostras de TVTC.

**Palavras chave:** Apoptose, RT-PCR *in situ*, hibridização *in situ*

## ABSTRACT

The canine transmissible venereal tumor (CTVT) is transmitted by direct contact of skin or mucosal presenting lesions. In fact, few reports have been found describing the cellular immune response related to the evolution of the tumor. The objective of this study was to identify the TP53 gen and its transcription in CTVT in different stages of evolution, collected from dogs (N=13) examined at veterinary school, UNESP, Aracatuba, SP, Brasil. In addition, it was also evaluated the expression of p53, p63 and Bcl-2 in histological sections by the use of immunohistochemistry assay. The p53, p63 and Bcl-2 were evident in 50, 70 and 100% of analyzed samples. Regarding to tumor evolution, 6 out of 13 were considered in a progressive stage (46%), was list 7 out of 13 were classified in a regressive stage (54%). The use of *in situ* hybridization and reverse transcriptase polymerase chain reaction *in situ* (RT-PCR), revealed that TP53 was present in all samples and P63 was more expressed than p53. Take all results together, the real role of those marker are extremely important to understand the biological behavior and to improve therapeutic procedures for CTVT.

**Key words: Apoptosis, *in situ* RT-PCR, *in situ* hybridization**

## 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Tumor Venéreo Transmissível canino (TVTC) é uma neoplasia transmitida naturalmente em cães suscetíveis por um mecanismo de transplantação de células tumorais viáveis (CHU et al., 2001b). Também conhecido como sarcoma de Stiker, foi reportado pela primeira vez em 1820 por Hüzzard e posteriormente por Delabere-Blaine (1928). Contudo, somente por um importante relato feito por Stiker entre os anos de 1905 – 1906 é que o tumor tornou-se reconhecido e, por muitos anos, chamado de Tumor de Stiker. Stiker descreveu essa neoplasia detalhadamente e constatou que se tratava de uma neoplasia transmissível com localização predominante venérea, segundo em citação de Chiti e Amber,(1992).

O TVTC é classificado como “neoplasia de células redondas” assim como os mastocitomas, histiocitomas, plasmocitomas e linfomas (VERMOOTEN et al., 1987). Os cães jovens, errantes e sexualmente ativos, são acometidos por essa neoplasia com maior frequência (ROGERS et al., 1998; MACEWEN et al.,2001; VERASCHIN et al., 2001). Possui distribuição mundial e maior incidência em regiões tropicais e subtropicais. Acomete os cães (*Canis familiaris*), e também pode acometer canídeos como raposas, coiotes e lobos (DAS et al., 2000; CHU et al.,2001b).

Recentemente, foi descrita outra neoplasia com comportamento semelhante ao TVTC, que ocorre em marsupiais carnívoros como o Demônio da Tasmânia. Ao



contrário do TVTC, essa neoplasia ocorre na região da face, nuca e cavidade oral, frequentemente evolui com metástases, ocasionando a morte do animal poucos meses após o aparecimento dos sintomas iniciais. Este neoplasma vem causando o declínio generalizado da população de Demônio da Tasmânia (*Sarcophilus harrisii*) (HAWKINS et al., 2006; LACHISH et al., 2007; MCCALLUM et al., 2007).

### **1.1. Transmissão e Etiologia**

O TVTC é normalmente transmitido pelo coito, mas pode afetar a pele por implantação de células tumorais no contato direto entre a pele e/ou mucosas lesionadas (COHEN, 1985; HIGGINS, 1996; DAS et al. 2000; MADEWELL, 2001; MURGIA et al., 2006; LIU et al, 2008). O mecanismo de transplantação ocorre quando células tumorais intactas do hospedeiro perdem a capacidade de expressar moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I e classe II, permitindo a transposição da barreira tecidual em um animal saudável por meio do contato entre a pele e/ou mucosa lesionadas (HIGGINS, 1996, MURGIA et al. 2006, LIU et al, 2008). Em células do TVTC transplantadas experimentalmente em ratos, observou-se que a transferência tumoral só é possível entre os animais que compartilham o mesmo MHC, ou quando há comprometimento da imunidade, pois, as células de TVTC induzem a uma resposta imune em um receptor saudável (MURGIA et al., 2006).

Pesquisas foram conduzidas pautadas na teoria de transplante do TVTC e sua etiologia. A teoria de transplantação era baseada no fato de que o transplante

experimental, só poderia ocorrer, por células tumorais vivas (COHEN, 1985). Outros estudos estabeleceram que o TVT foi originado de mutações induzidas por vírus, substâncias químicas ou radiações de células linfocitárias, e este clone de células tumorais teria, então, se disseminado por meio da transplantação alogênica (MURGIA et al., 2006).

Estudos com técnicas de imunohistoquímica, positivos para lisozima e alfa-1-tripsina, sugeriram que o TVT possuía origem mesenquimal e histiocítica (CATONE et al. 2003; PARK et al., 2006). Corroborando com essa hipótese, há relatos sobre a detecção de amastigotas de *Leishmania sp* no citoplasma de células do TVTC primário, extra-genital, de ocorrência natural (ALBANESE et al., 2002; CATONE et al., 2003).

Estudos citogenéticos, que sustentam a teoria da transmissão clonal, estão baseados no número de cromossomos dos cães,  $n=78$ , dos quais  $n=76$  são acrocêntricos. As células TVTC isoladas de animais de diferentes regiões geográficas, o número de cromossomos varia de  $n=57$ - $n=59$ , onde,  $n=15$  a  $n=17$  cromossomos são metacêntricos ou submetacêntricos. (WEBER et al., 1965; KAKPAKOVA et al., 1968; MURRAY et al., 1969; MURGIA et al., 2006).

Além dessas particularidades, aberrações cromossômicas constantes e muito específicas, como a identificação da inserção do elemento LINE-1 perto do oncogene c-myc no genoma do TVTC, está presente em grande parte das amostras coletadas de várias regiões no mundo. Esse rearranjo no genoma, não foi identificado em nenhum outro tecido normal de cães e pode ser utilizado como evidência para o diagnóstico do TVTC (CHU et al., 2001b; CHOI et al., 2002; LIAO

et al., 2003; DINGLI et al., 2006; MURGIA et al., 2006; PARK et al., 2006; VAZQUEZ-MOTA et al., 2008; REBBECK et al., 2009).

Murgia et al., (2009) e Rebbeck et al., (2009), confirmaram a transmissão clonal, quando verificaram que o padrão de polimorfismo dos microssatélites em TVTC de diferentes regiões do mundo, apresentavam grande evidência de origem monofilética. Variedades mitocondriais e de MHC sugerem que muitos clones de TVTC modernos, pertencem a dois grupos distintos, distribuídos em regiões ao redor do mundo (MURGIA et al., 2006).

A genética ancestral do TVTC foi recentemente investigada por Rebbeck et al., (2009), que determinaram que essa neoplasia provavelmente surgiu de um cão ou lobo, ao invés de um membro distante da família dos canídeos. Adicionalmente, Murgia et al., (2006), utilizaram polimorfismos de microssatélites para realizar a comparação de TVTC com tecidos normais de 85 raças de cães e 8 espécies de lobos, e verificaram que o TVTC apresentava forte identidade com os lobos. Variantes MHC encontradas em células tumorais também indicaram uma importante relação filogenética com esta espécie (Figura 1ne) (MURGIA et al., 2006).

Rebbeck et al., (2009), empregaram microssatélites para determinar a data de origem do TVTC. Tais estudos indicaram que o TVTC provavelmente surgiu a partir de único lobo, que existiu entre 7800 e 78000 anos atrás. Nos últimos tempos, um único clone se tornou dominante e se dividiu em 2 grupos com ampla

distribuição mundial. Tais evidências fazem do TVTC o mais antigo clone conhecido de células somáticas transplantáveis, conhecido (MURCHISON, 2009).

## **1.2. Características clínicas e patológicas**

O TVTC, afeta comumente a genitália externa em cães de ambos os sexos. Nos machos o tumor está localizado, mais comumente, na parte caudal do pênis, na glândula e, ocasionalmente, no prepúcio. Na cadela, é frequentemente encontrado na junção do vestíbulo e na região posterior da vagina e, ocasionalmente, no orifício uretral. (COHEN, 1985; VERMOOTEN, 1987; ROGERS, 1998; DAS et al. 2000; MADEWELL, 2001).

O TVT pode ocorrer como massa solitária ou neofomações múltiplas, em formato de couve-flor, ou como formas pendulares, nodulares, papilares ou multilobulares com aspecto de “couve-flor” (BROWN et al., 1980; GREATTI et al. 2004). O tumor é friável e a parte externa é comumente ulcerada e inflamada (BROWN et al., 1980). O tamanho pode variar de 3 a 12 cm de diâmetro (PARK et al, 2006).

Os sinais clínicos do TVTC genital são descarga vaginal ou prepucial sanguinolenta intermitente ou persistente, lesão ulcerativa na pele, dificuldade de exposição peniana, tumefação genital, lambadura excessiva na área genital (NAK et al., 2005; NAK et al., 2005; SILVA et al., 2007).

O TVTC também pode se desenvolver em locais extra-genitais como por exemplo, a pele, tecido subcutâneo, ao redor e nas cavidades oral e nasal. As

neoplasias extragenitais são bem circunscritas e podem medir de 2 a 5 cm (Das et al., 2000). Metástases são raras no TVTC, contudo podem ocorrer principalmente em filhotes e em cães com supressão do sistema imunológico. Os casos de metástases são frequentemente considerados extensões mecânicas do tumor primário, no entanto já foram relatadas metástases em linfonodos inguinais (ADAMS et al., 1970; MANNING et al, 1970; PARK et al.,2006), no fígado e intraocular (FERREIRA et al., 2000).

### **1.3. Características histopatológicas**

O TVTC, histologicamente quando corado por hematoxilina e eosina, é composto por células redondas, agrupadas ou dispostas em cordões, entremeadas por delicado estroma conjuntivo. Geralmente, são organizadas radialmente em torno de vasos sangüíneos e linfáticos e possuem alta relação núcleo:citoplasma, sendo o núcleo redondo, com cromatina variando de delicada a grosseira, com nucléolo proeminente e grande (DAS et al., 2000., SANTOS et al., 2005., PARK et al., 2006). O citoplasma é amplo e levemente acidofílico com seus limites pouco definidos (MUKARATIRWA et al, 2004).

De acordo com o estágio de desenvolvimento o tumor pode ser classificado em fase de progressão, fase inicial e final de regressão. A fase progressiva apresenta células redondas dispostas difusamente entremeadas por delicado estroma conjuntivo e presença freqüente de figuras de mitose. Na fase de regressão inicial, ocorre a infiltração de linfócitos tumorais (TILs), que estão

difusamente distribuídos ou associados ao estroma conjuntivo (LIAO et al.,2003; MUKARATIRWA et al, 2004). A fase final de regressão apresenta colapso do tecido neoplásico e presença freqüente de figuras apoptóticas (MUKARATIRWA et al, 2004).

#### **1.4. Características citopatológicas**

O exame citológico é uma ferramenta rápida, eficiente, de baixo custo e relativamente simples para o diagnóstico de TVTC (GREATTI et al., 2004). Quando submetido as colorações de Romanovsky, apresentam características observadas, tanto em neoplasias genitais e extragenitais, células redondas, com fronteiras citoplasmáticas distintas. O núcleo é oval ou redondo, localizado centralmente, com cromatina delicada e nucléolos grandes e evidentes; o citoplasma é ligeiramente acidofílico e finamente granular contendo vacúolos delicados; além de anisocariose, anisocitose, hipercromasia nuclear e macrocariose. (ERÜNAL-MARAL et al., 2000; DENICOLA, 2007). As mitoses são freqüentes e podem ser típicas ou atípicas, e são indicativas de proliferação de células tumorais (AMARAL et al., 2004). Figuras de apoptose também são observadas no exame citológico e se apresentam em maior quantidade em TVTC na fase de regressão (SANTOS et al., 2005). As células inflamatórias como linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos são observadas independente da fase de evolução da neoplasia (WELLMAN, 1990; BOSCO et al., 1999; ERÜNAL-MARAL et al., 2000; DAS et al., 2000; VARASCHIN et al., 2000; SANTOS et al., 2005).

Com o exame citopatológico é possível classificar o TVTC, com relação ao tipo celular predominante em linfocitóide, plasmocitóide e misto. O tipo linfocitóide apresenta predomínio de células com morfologia arredondada, citoplasma escasso e finamente granular, além da presença de vacúolos, núcleo redondo com cromatina grosseira e presença de um ou dois nucléolos evidentes; no plasmocitóide, a maior parte das células apresentam morfologia ovóide, menor relação núcleo:citoplasma e núcleo localizado excentricamente; e o tipo misto exhibe celularidade mista entre os tipos celulares descritos (GREATTI et al., 2004; AMARAL et al., 2004)

### **1.5. Sistema imunológico e TVTC**

O desenvolvimento do TVTC é mediado pelo sistema imune, onde a manifestação da doença representa o êxito da neoplasia em sobrepor o sistema imune do hospedeiro. Filhotes nascidos de cadelas que foram expostas ao TVTC são menos susceptíveis a contrair a neoplasia (MURCHISON, 2009). Em animais imunocomprometidos e que foram infectados experimentalmente por células viáveis de TVTC, houve progressão da doença e metástases, porém, aqueles que se recuperaram rapidamente, adquiriram imunidade contra implantações subsequentes (MURCHISON, 2009).

Em animais saudáveis o TVTC regride espontaneamente. A regressão é associada à infiltração de linfócitos e plasmócitos, assim como à necrose (PÉREZ et al., 1998) e apoptose (SANTOS et al., 2001).

A transição entre as fases de progressão e regressão do TVTC é acompanhada por um aumento significativo na infiltração de TILs (PEREZ et al., 1998; GONZALEZ et al. 2000, CHU et al., 2001a; HSIAO et al., 2002; MUKARATIRWA et al., 2004, 2006). O complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe I e classe II não são expressos ou estão presentes em apenas um subconjunto pequeno de células neoplásicas, durante a fase progressiva (COHEN et al., 1985; YANG et al., 1987; MIZUNO et al., 1994; PEREZ et al., 1998; HSIAO et al. 2002 ; MURGIA et al., 2006).

Curiosamente, uma proporção significativamente maior de células de TVTC expressam MHC classe I e classe II nas neoplasias na fase de regressão (YANG et al., 1987; PEREZ et al., 1998; HSIAO et al., 2002).

Liao et al., (2003), demonstrou que a proporção de linfócitos B do sangue periférico diminuí drasticamente com o crescimento do TVTC. A destruição dos linfócitos B é causada por substâncias liberadas por células tumorais, como proteínas citotóxicas, além de outras substâncias circulantes. As substâncias citotóxicas provocam apoptose dos linfócitos B na fase de progressão neoplásica (LIAO et al., 2003).

Hisao et al. (2004) demonstraram que as células de TVTC produzem fator de crescimento tumoral-b1 (TGFB1), e que essa citocina inibe a atividade das células natural killer (NK), assim como a infiltração de linfócitos citotóxicos. O efeito supressor do TGFB1 na atividade das células NK pode ser equilibrado pelo efeito da interleucina-6 (IL6), que é uma citocina pró-inflamatória secretada pelos linfócitos tumorais.



A expressão de MHC *in vitro* pelas células do TVTC pode ser induzida através do sinergismo entre interferon- $\gamma$  e IL-6 (HSIAO et al., 2008). A IL-6 pode induzir a expressão de MHC em TVTC *in vitro* e *in vivo*. Neste último pela presença de IL-15 (CHOU et al., 2009).

O TVTC na fase de progressão não induz ao reconhecimento imunológico regulado pelo MHC classe I e classe II e pelas células NK, pois nesta fase ele suprime a secreção de IL-6. Quando o nível de IL-6 secretado por linfócitos tumorais atinge um limiar, inicia-se sua atividade junto com interferon- $\gamma$ , permitindo a infiltração de linfócitos na neoplasia, ativando a expressão do MHC classe I e classe II nas células de TVTC e assim iniciar a regressão (HSIAO et al., 2004, HSIAO et al., 2008).

Salienta-se que figuras de apoptose, mitose, proliferação celular, fibrose e infiltração TIL são bons indicadores do estágio de desenvolvimento do TVTC e os mastócitos também desempenham um papel importante, visto que sua quantificação pode ser utilizada para prever o estágio de evolução tumoral. (MUKARATIRWA et al., 2006).

## **2. Família p53**

O TP53 é um dos mais importantes genes supressores associados ao desenvolvimento de neoplasias (VELDHOEN et al., 1998). Dado o importante papel desempenhado por ele, polimorfismos funcionais neste gene, podem afetar profundamente o desenvolvimento de tumores (OREN, 1999; TOLEDO & WHAL,

2006). O TP53 codifica a proteína nuclear, p53, com 393 aminoácidos capaz de se ligar a sequências específicas do DNA, agindo como um fator de transcrição (KELLEY & JOHNSON, 1994). A p53 possui a função de manter a integridade genômica e controlar o crescimento celular (PIETSCH et al., 2008). A expressão celular e a atividade da p53 estão estritamente relacionadas. A p53 tem uma meia vida curta (20 min.) e, portanto, está presente em níveis baixos no interior das células. A sua ativação ocorre em resposta ao estresse e à agentes que danificam o DNA celular, ocasionando a interrupção do ciclo celular, indução de senescência ou apoptose (Figura 2) (VOUSDEN e LU, 2002). Mais de 10 mutações no gene TP53 já foram descritas em diferentes neoplasias caninas (OREN, 1999; SETOGUCHI et al., 2001). Recentemente, também foram encontradas mutações no TP53 em TVTC. (CHOI et al., 2002; SÁNCHEZ-SERVÍN et al., 2009).

Moro et al., (2010) identificaram maior quantidade de células que expressavam a proteína p53 em TVTC transplantados, em fase de regressão quando comparado com CTVT de ocorrência natural. Esses achados sugeriram que provavelmente existem anormalidades funcionais no gene TP53 e seus transcritos (MORO et al., 2010). A perda da função da p53 é um evento comum em muitos tumores humanos e animais (FLORES et al., 2002; SENOO et al., 2004). A inativação da p53 não ocorre somente por meio de mutação e supressão da p53 em si, mas também pela interrupção de quaisquer das vias que regulam sua atividade protéica como a via da Mdm2 (DEYOUNG et al., 2007).

Quase uma década após a descoberta do gene TP53, dois outros genes relacionados foram identificados, o P63 e o P73 (KAGHAD et al., 1997; SCHMALE & BAMBERGER, 1997; OSADA et al., 1998; TRINK et al. 1998, YANG et al., 1998; ZENG et al., 2001). Semelhante a p53, a p63 é expressa em níveis maiores em células com lesão no DNA (PETITJEAN et al., 2008).

A proteína p63 está expressa em células tronco dos epitélios normais, protegendo essas células do processo de apoptose e coordenando sua diferenciação (DEYOUNG et al., 2007). Também é necessário para o desenvolvimento dos tecidos orgânicos, como já foi observado em glândulas mamárias (GAMA et al., 2003). Ela possui pelo menos seis isótopos, onde se observa uma isoforma  $\alpha$  íntegra, uma isoforma  $\beta$  truncada e uma isoforma  $\gamma$ . Estes isótopos (TAp63 $\alpha$ , TAp63 $\beta$  e TAp63 $\gamma$ ) possuem a habilidade de ativar a p53 e com isso, induzir a apoptose e bloquear o ciclo celular (DOHN et al., 2001). Entretanto, os outros três isótopos ( $\Delta$ Np63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\beta$  e  $\Delta$ Np63 $\gamma$ ) agem como dominante negativo à ação supressora tanto da p53 quanto dos isótopos TAp63 (DOHN et al., 2001). Apesar da homologia estrutural, não existem evidências de que o P63 seja um gene supressor tumoral como o TP53 (FLORES et al., 2002). O P63 também pode desempenhar um papel na senescência celular replicativa, por competir com sítios de ligação do TP53 ao DNA, ou ainda, por promover uma interação direta com a proteína p53 ligada ao DNA (DJELLOUL et al., 2002).

### **3. Família Bcl-2**

A família Bcl-2 é um grupo de proteínas indutoras e inibidoras da morte celular por apoptose (BORNER et al., 2003). Os membros da família Bcl-2 como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c, sendo denominados de reguladores antiapoptóticos (KIRKIN et al., 2004). Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (HENGARTNER et al., 2000).

A superexpressão da Bcl-2 tem sido associada com a p53 mutante (KUMARAGURUPARAN et al., 2006). A p53 pode induzir a apoptose provocando a permeabilização da membrana mitocondrial externa e formando complexos com as proteínas Bcl-2, resultando na liberação de citocromo c (MIHARA et al., 2003).

A homeostasia celular é mantida pelo controle da presença de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz a apoptose (PETROS et al., 2004).

Entre as proteínas mais estudadas, desta família, estão a Bax (pró-apoptótica) e a Bcl-2 (anti-apoptótica) a qual é superexpressa em adenomas e carcinomas colorretais em humanos (PETROS et al., 2004). As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), sendo que o equilíbrio entre ambos pode definir o balanço pró-apoptótico ou antiapoptótico celular (HENGARTNER et al., 2000).

Após um estímulo de morte celular, a Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, ou pelo sequestro da Bax ou, ainda, por competir com sítios que seriam ocupados pela Bax. A Bax também pode promover a apoptose por meio da interação com a mitocôndria, de forma independente da

interação com proteínas antiapoptóticas (KIRKIN et al., 2004). A superexpressão de Bcl-2 é um evento presente em neoplasias malignas associada significativamente com receptores hormonais (LINJAWI et al., 2004).

## REFERÊNCIAS

ADAMS, E.W., SLAUGHTER, L.J. (1970). A canine venereal tumor with metastasis to the brain, **Pathologia Veterinaria** 7: 498-502.

AMARAL, A.S., GASPAR, L.F.J., SILVA, S.B., ROCHA, N.S. (2004). Cytological diagnostic of transmissible venereal tumor in the Botucatu. region, Brazil (descriptive study: 1994-2003) **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**. 99 (551):167-171.

BORNER, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**. 39:615-47.

BOSCOS, C.M., TONTIS, D.K., SAMARTZI, F.C. (1999). Cutaneous involvement of TVT in dogs: a report of two cases. **Canine Practice**, 24(4):6-11.

BROWN, N.O., CALVERT, C. AND MACEWEN, E.G. (1980). Chemotherapeutic management of transmissible venereal tumour in 30 dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 176:983-986.

CATONE, G., MARINO G., POGLAYEN, G., et al.(2003). Canine transmissible venereal tumour parasitized by *Leishmania infantum*. **Veterinary Research Communications** 27:549–553.

CHITI, L., AMBER, E.I. (1992). Incidence of tumors seen at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zambia: a four year retrospective study. **Zimbabwe Veterinary Journal**, 3:143-147.

CHOI, Y.K., KIM, C.J. (2002). Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 gene in canine transmissible venereal tumor. **Journal of Veterinary Science** 3:285–292.

CHOU, P.C., CHUANG, T.F., JAN, T.R., GION, H.C., HUANG, Y.C., LEI, H.J. et al. (2009). Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 130: 25–34

CHU, R.M., LIN, J.Y., LIU, C.G., YANG, S.Y., HSEUH, W.C., HSIAO, Y.W., HUNG, S.W., PAO, H.N., LIAO, K.W. (2001a). Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. **Anticancer Research**. 21:4017–4024.

CHU, R.M., SUN, T.J., YANG, H.Y., WANG, D.G., LIAO, K.W., CHUANG, T.F. et al. (2001b). Heat shock proteins in canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 82:9–21.

COHEN, D. (1985). The canine transmissible venereal tumour: a unique result of tumour progression. **Advances in Cancer Research**, 43:75-112.

DAS, U., DAS, AK. (2000). Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Veterinary Research Communications** 24: 545-556.

DENICOLA, D. (2007). Round Cells in COWELL RL, TYLER RD, MEINKOTH JH, DENICOLA D.B. editors. Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat. 3 ed. **St. Louis, Mosby**. 68-69.

DEYOUNG, M.P., ELLISEN, L.W. (2007). p63 and p73 in human cancer: defining the network. **Oncogene**. 26:5169-5183.

DINGLI, D. AND NOWAK, A.M. (2006). Infectious tumour cells. **Nature**. 443(7):35–36.

DJELLOUL, S. et al. (2002). Differential protein expression, DNA binding and interaction with SV40 large tumour antigen implicate the p63-family of proteins in replicative senescence. **Oncogene**, 21: 981-89.

DOHN, M., ZHANG, S. & CHEN, X. (2001). P63alpha and deltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. **Oncogene**, 20: 3193-205.

ERÜNAL-MARAL, N., FINDIK, M., ASLAN, S. (2000). Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. **Deutsche Tierärztliesh Wochenschrift**, 107(5):175-180.

FERREIRA, A.J., JAGGY, A., VAREJAO, A.P., et al. (2000). Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. **Journal of Small Animal Practice**. 41:165–168.

FLORES, E.R., TSAI, K.Y., CROWLEY, D., SENGUPTA, S., YANG, A., MCKEON, F. AND JACKS, T. (2002). p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. **Nature**. 416:560–564.

GAMA, A., ALVES, A., GARTNER, F., AND SCHMITT, F. (2003). p63: A Novel Myoepithelial Cell Marker in Canine Mammary Tissues **Veterinary Pathology** 40:412–420.

GONZALEZ, C.M., GRIFFEY, S.M., NAYDAN, D.K., FLORES, E., CEPDA, R., CATTANEO, G., MADEWELL, BR. (2000). Canine transmissible venereal tumor: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumors in growth phase and during regression after chemotherapy. **Journal Comparative Pathology**. 122:241-248.



GREATTI, W.F.P., AMARAL, A.S., SILVA, S.B., GASPAR, L.F.J., BARBISAN, L.F., ROCHA, N.S. (2004). Proliferation indexes determination by CEC and Ki-67 in fine needle aspiration cytology of transmissible venereal tumor. **Archives of Veterinary Science**. 9(1):53-59.

HAWKINS, C.E., BAARS, C., HESTERMAN, H., JONES, G.J. H., LAZENBY, M.E.B, et al. (2006). Emerging disease and population decline of an island endemic, the Tasmanian devil *Sarcophilus harrisii*. **Biological Conservation** 131: 307–324.

HENGARTNER, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. **Nature**.;407:770-76.  
HIGGINS DA. (1996) Observations on the canine transmissible venereal tumor as seen in the Bahamas. **Vet. Rec.** 79:67-71.

HSIAO, Y.W., LIAO, K.W., CHUNG, T.F., LIU, C.H., HSU, C.D., CHU, R.M. (2008). Interactions of host IL-6 and IFN-gamma and cancer-derived TGF-beta1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. **Cancer Immunology, Immunotherapy**. 57:1091-1104.

HSIAO, Y.W., LIAO, K.W., HUNG, S.W., CHU, R.M. (2002). Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 87: 19–27.

HSIAO, Y.W., LIAO, K.W., HUNG, S.W., CHU, R.M. (2004). Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF-beta 1 and restores the lymphokine-activated killing activity. **Journal of Immunology** 172: 1508–1514.

KAGHAD, M., BONNET, H., YANG, A., CREANCIER, L., BISCAN, J.C., VALENT, A., et al. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. **Cell**. 90:809-819.

KAKPAKOVA, E.S., POGOSYANZ, E.E., PONOMARKOV, V.I. (1968). Peculiarities of the karyotype of the transmissible sarcoma cells in the dog. **Vopr Onkol** 14:43-50.

KANAYA, N., OKUDA, M., TOYAMA, N., OIKAWA, T., INOKUMA, H., MORIMOTO, M., HAYASHI, T., UNE, S., NAKAICHI, M., TAURA, Y., TSUJIMOTO, H. AND ONISHI, T. (2002). Detection of the anti-P53 antibodies in dogs with tumors. **Journal Veterinary Medicine Science**, 64, 973–979.

KATZIR, N., ARMAN, E., COHEN, D., GIVOL, D., RECHAVI, G. (1987). Common origin of transmissible venereal tumors (TVT) in dogs. **Oncogene** 1:445–448.

KELLEY, M.J., JOHNSON, B.E. (1994) Genetic mechanisms of solid tumor oncogenesis. **Advanced Internal Medicine**, 39:93-122.

KIRKIN, V., JOOS, S., ZORNIG, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta** 1644:229–249.

KUMARAGURUPARAN, R., PRATHIBA, D., NAGINI, S. (2006). Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. **Research in Veterinary Science**, 81: 218–224.

LACHISH, S., MCCALLUM, H., JONES, M. (2009). Demography, disease and the devil: life-history changes in a disease-affected population of Tasmanian devils (*Sarcophilus harrisii*). **Journal of Animal Ecology** 78: 427–436.

LIAO, K.W., LIN, Z.Y., PAO, H.N., KAM, S.Y., WANG, F.I., CHU, R.M. (2003). Identification of canine transmissible venereal tumor cells using in situ polymerase chain reaction and the stable sequence of the long interspersed nuclear element **J Vet Diagn Invest**, 15:399-406.

LINJAWI, A., KONTOGIANNEA, M., HALWANI, F., EDUARDES, M., METERISSIAN, S. (2004). Prognostic significance of p53, Bcl-2 and Bax expression in early breast cancer. **Journal of the American College of Surgeons**. 198:83–90.

LIU, C.C., WANG, Y.S., LIN, C.Y., CHUANG, T.F., CHEN, M.F., CHIANG, H.C., CHU, R.M. (2008). 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**, 57:479–491.

MACEWEN, E.G. (2001). Transmissible venereal tumor, In: Withrow S.J. & MacEWEN EG. **Small Animal Clinical Oncology**. J.B. Lippincott, Philadelphia. 651-655.

MADEWELL, R.B. (2001). Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 15(4):334-340.

MANNING, P.J., MARTIN, P.D. (1970). Metastasis of canine transmissible venereal tumor to the adenohypophysis, **Pathologia Veterinaria** 7:148-52.

MCCALLUM, H., TOMPKINS, D.M., JONES, M., LACHISH, S., MARVANEK, S., LAZENBY, B. et al. (2007). Distribution and impacts of Tasmanian devil facial tumor disease. **EcoHealth** 4: 318-325.

MIHARA, M., ERSTER, S., ZAIKA, A., PETRENKO, O., CHITTENDEN, T., PANCOSKA, P., MOLL, UM. (2003). P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. **Molecular Cell** 11:577-590.

MIZUNO, S., FUJINAGA, T., HAGIO, M. (1994). Role of lymphocytes in spontaneous regression of experimentally transplanted canine transmissible venereal sarcoma. **Journal of Veterinary Medical Science**. 56: 15–20.

MORO, J.V., TINUCCI-COSTA, M., SILVEIRA, A.C.T., GERALDI, D.G., ALESSI, A.C. (2010). Reactivity of p53 protein in canine transmissible venereal tumor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 62(2):318-323.

MUKARATIRWA, S., CHIWOME, T., CHITANGA, S., BHEBHE, E. (2006). Canine Transmissible Venereal Tumour: Assessment of Mast Cell Numbers as Indicators of the Growth Phase. **Veterinary Research Communications**. 30:613-621.

MUKARATIRWA, S., GRUYS, E. (2004) Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. **Veterinary Quarterly** 25:101-111.

MURCHISON, E.P. (2009). Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. Review. **Oncogene**. 27:S19-S30.

MURGIA, C., PRITCHARD, K.J., KIM, S., FASSATI, A., and WEISS, A.R. (2006) Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. **Cell** 126:447-487.

MURRAY, Q.M., JAMES, H. AND MARTIN, W.B. (1969). A study of the cytology and karyotype of the canine transmissible venereal tumour. **Research in Veterinary Science**, 10:565-568.

NAK, D., NAK, Y., CANGUL, I.T., TUNA, B. (2005). A Clinico-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. **Journal Of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical**. 52:366-370.

OREN, M. (1999). Regulation of the p53 tumor suppressor protein. **Journal of Biological Chemistry**. 274:36031-36034.

OSADA, M., OHBA, M., KAWAHARA, C., ISHIOKA, C., KANAMARU, R., KATOH, I., et al.(1998). Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. **Nature Medicine**. 4:839–843.

PARK, M.S., KIM, Y., KANG, M.S., OH, S.Y., CHO, D.Y., SHIN, N.S., KIM, D.Y. (2006). Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 18:130-133.

PEREZ, J., DAY, M.J., MOZOS, E. (1998). Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 64: 133–147.

PETITJEAN, A., RUPTIER, C., TRIBOLLET, V., HAUTEFEUILLE, A., CHARDON, F., CAVARD, C, et al.(2008). Properties of the six isoforms of p63: p53-like regulation in response to genotoxic stress and cross talk with DeltaNp73. **Carcinogenesis**. 29:273–281.

PETROS, A.M., OLEJNICZAK, E.T., FESIK, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biophysics and Molecular Biology**.1644:83-94.

REBBECK, C.A., THOMAS, R., BREEN, M., LEROI, A.M., BURT, A. (2009). Origins and evolution of a transmissible cancer. **Evolution** 63:2340–2349.

ROGERS, K.S., WALKER, M.A. & DILLON, H.B. (1998). Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association** 34:463-470.

SÁNCHEZ-SERVÍN, A., MARTÍNEZ, S., CÓRDOVA-ALARCON, E., FAJARDO, R. (2009). TP53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor. **Journal of Veterinary Science**. 10(4): 353-355.

SANTOS, F.G.A., VASCONCELOS, A.C., NUNES, J.E.S., CASSALI, G.D., PAIXAO, T.A., MORO, L. (2005). The canine Transmissible Venereal Tumor – General Aspects and Molecular Approach (Review). **Bioscience Journal**. 21:41-53.

SCHMALE, H., BAMBERGER, C. (1997). A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. **Oncogene**. 15:1363–1367.

SENOO, M., MANIS, J.P., ALT, F.W., AND MCKEON, F. (2004). p63 and p73 are not required for the development and p53-dependent apoptosis of T cells. **Cancer Cell** 6:85–89.

SETOGUCHI, A., SAKAI, T., OKUDA, M., MINEHATA, K., YAZAWA, M., ISHIZAKA, T., WATARI, T., NISHIMURA, R., SASAKI, N., HASEGAWA, A., TSUJIMOTO, H. (2001). Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, 62, 433-439.

SILVA, M.C.V., BARBOSA, R.R., SANTOS, R.C., CHAGAS, R.S.N., COSTA, W.P. (2007). Avaliação Epidemiológica, Diagnóstica e Terapêutica do Tumor Venéreo Transmissível (TVT) na população canina atendida no Hospital Veterinário da UFERSA **Acta Veterinaria Brasília**, 1(1):28-32.

TOLEDO, F. AND WHAL, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. **Nature Reviews**, 6:909–923.

TOMITA, Y., MARCHENKO, N., ERSTER, S., NEMAJEROVA, A., DEHNER, A., KLEIN, C., et al. (2006). WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via

the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. **Journal of Biological Chemistry**; 281:8600–8606.

TRAIL, P.A. (1985). Canine transmissible venereal sarcoma: quantification of T-lymphocyte subpopulations during progressive growth and spontaneous tumour regression. **Journal of the National Cancer Institute**. 74 (2):461-467.

TRINK, B., OKAMI, K., WU, L., SRIURANPONG, V., JEN, J., SIDRANSKY, D. (1998). A new human p53 homologue. **Nature Medicine**. 4:747-748.

VAZQUEZ-MOTA, N., SIMÓM-MARTINEZ, J., CÓRDOVA-ALARCON, E., LAGUNES, L., FARJADO, R. (2008). The T963C mutation of TP53 gene does not participate in the clonal origin of canine TVT. **Veterinary Research Communications**, 32:187-191.

VELDHOEN, N., MILNER, J. (1998). Isolation of canine p53 cDNA and detailed characterization of the full length canine p53 protein. **Oncogene**. 16:1077-1084.

VERASCHIN, M.S., WOUTERS, F., BERNINS, V.M.O., SOARES, T.M.P., TOKURA, V.N., DIAS, M.P.L.L. (2001). Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais: formas de apresentação clínico-patológicas. **Clínica Veterinária**. 6(32):332-38.

VERMOOTEN, M.I. (1987). Canine transmissible venereal tumor (TVT): a review. **Journal of the South African Veterinary Association** 58(3):147-150

VOUSDEN, K.H, LU, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. **Nature Reviews Cancer**. 2:594–604.

WEBER, W.T., NOWELL, P.C., HARE, W.C. (1965). Chromosome studies of a transplanted and a primary canine venereal sarcoma. **Journal of the National Cancer Institute** 35:537-547.

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

YANG, A., KAGHAD, M., WANG, Y., GILLETT E, FLEMING M.D, DÖTSCH, V., et al.(1998). p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. **Molecular Cell**. 2:305–316.

YANG, A., KAGHAD, M., WANG, Y., GILLETT E, FLEMING ,M.D., DÖTSCH, V., et al. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. **Molecular Cell**. 2:305-316.

YANG, T.J. (1987). Metastatic transmissible venereal sarcoma in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association** 190:555-556.

ZENG X, ZHU Y, LU H. (2001). NBP is the p53 homolog p63. **Carcinogenesis**. 22:215-219.



# *Capítulo 2*

## DETECÇÃO DO GENE TP53 E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS p53, Bcl-2 E p63 NO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO

DANIELA STOCKMANN<sup>1</sup>; HEITOR FERRARI<sup>2</sup>; ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE<sup>1</sup>; TEREZA CRISTINA CARDOSO<sup>2</sup>; MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO<sup>1</sup>

1- UNESP- Univ. do Estado de São Paulo, Departamento DCCRA, Curso Medicina Veterinária, Laboratório de Patologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil;

2- UNESP- Univ. do Estado de São Paulo, Departamento DAPSA, Curso Medicina Veterinária, Laboratório de Virologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil;

### RESUMO

O tumor venéreo transmissível canino (TVTC) é uma neoplasia transmitida entre cães saudáveis pelo contato direto de pele e/ou mucosas lesionadas. Face aos escassos estudos relacionados aos eventos celulares envolvidos nas fases de crescimento do TVTC, o presente estudo teve por objetivo identificar a presença do gene TP53 e o RNAm referente a proteína codificada, além de detectar a expressão das proteínas p53, Bcl-2 e p63 em cortes histológicos de 13 amostras de TVTC. Com relação à evolução da neoplasia, 46% das amostras foram consideradas em fase de progressão e 54% no estágio de regressão. Foram utilizadas as técnicas de hibridização *in situ* (ISH) e RT-PCR *in situ*, que demonstrou a presença do DNA homólogo ao TP53 e seu respectivo RNAm em 92,30% das amostras. A expressão das proteínas p53, p63 e Bcl-2 foram detectadas em 50%, 70% e 100% das amostras, respectivamente. A p63 foi expressa de forma evidente nas amostras em regressão, porém a p53 e a Bcl-2 não apresentaram relação com o estágio evolutivo do tumor e provavelmente não podem ser analisados como fatores de prognóstico do TVTC. Observou-se, nesse estudo que, através das técnicas de ISH e RT-PCR *in situ* foi possível detectar o DNA do TP53 e seus transcritos, porém esse fato não significou a transcrição da p53, devido aos baixos níveis de expressão nas análises quantitativa e qualitativa nas amostras de TVTC.

**Palavras chave:** Apoptose, RT-PCR *in situ*, hibridização *in situ*

## 1. INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível canino (TVTC) é uma neoplasia transmitida naturalmente entre cães suscetíveis, de ambos os sexos. (CHU et al., 2001b; VAZQUEZ-MOTA et al, 2008). Esta neoplasia possui fases de desenvolvimento que podem ser facilmente identificadas por meio do exame histopatológico, classificadas como as fases de proliferação ou progressão, início de regressão e final de regressão das células tumorais (MUKARATIRWA et al.,2004). Um estudo das células de TVTC, juntamente com células somáticas isoladas de cães, provenientes dos cinco continentes, demonstrou que todas as células tumorais possuem íntima relação genética e diferem das células somáticas dos cães hospedeiros. (MURGIA., et al, 2006)

O gene TP53 está envolvido na inibição da replicação do DNA, regulando a transcrição da fase G1 para a fase S, e da fase G para fase M do ciclo celular, promovendo ou inibindo a síntese do RNAm. Sua função é proteger a integridade do DNA, induzindo o processo de apoptose quando existem danos irreparáveis (PIETSCH et al., 2008). Este gene apresenta mutações em neoplasias humanas e caninas (KANAYA et al. 2002; LEE et al. 2004). Estudo recente em TVTC de ocorrência natural, transplantados e refratários a tratamento, apontou para a positividade de alteração funcional no TP53 e seus produtos (MORO et al., 2010). Mutações no TP53 já haviam sido referidas no TVTC (SÁNCHEZ-SERVÍN et al, 2009).

A proteína p53, codificada pelo gene TP53, é responsável por regular o ciclo celular, a apoptose e senescência (TOLEDO et al., 2006). As mutações

presentes neste gene alteram as funções da p53, modificando sua conformação molecular o que a torna mais estável, propiciando sua identificação pela técnica de imunohistoquímica (IHC).

Outros membros pertencentes à família da p53, também importantes na avaliação do prognóstico de neoplasias, são a p73 e a p63 (DI COMO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2007). O gene P63, raramente apresenta mutações e a alteração mais comum encontrada em neoplasias é a sua super expressão (LEFKIMMIATIS et al., 2009). Sua proteína transcrita possui seis isômeros, onde três deles apresentam domínio de transcrição N-terminal semelhante a p53 capaz de ativar o gene TP53, induzindo a apoptose e o bloqueio do ciclo celular (DOHN et al., 2001; DEYOUNG et al., 2007). O P63 ainda está presente nas células tronco dos epitélios normais, sendo expresso, principalmente, nas células basais do epitélio estratificado coordenando sua diferenciação e impedindo a apoptose (DOHM et al., 2001; ADORNO et al., 2009).

A proteína p53 também interage com membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 (MIHARA et al., 2003 ;TOMITA et al., 2006). Há evidências de que a p53 regula a apoptose independente da transcrição no interior da mitocôndria pela regulação da atividade dos membros da família Bcl-2 (CORY AND ADAMS, 2002; FRENZEL et al., 2009). O equilíbrio entre as proteínas anti-apoptóticas pertencentes à família Bcl-2 desencadeia a cascata de apoptose. A Bcl-2 é particularmente importante, pois, que inibe a liberação do citocromo c mantendo a integridade da membrana mitocondrial e assim impede a apoptose (KUMARAGURUPARAN et al., 2006).

Face à amplitude de pesquisas básicas relacionadas aos eventos celulares, em tecidos normais e neoplásicos, constituiu objetivo do presente trabalho pesquisar em amostras de TVTC a presença do gene TP53 por hibridização *in situ* (ISH), seu respectivo RNAm pela RT-PCR *in situ* e também investigar a expressão das proteínas p53, p63 e Bcl-2 pelos métodos de imunofluorescência (IF) e imunoistoquímica (IHQ).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Descrição das amostras**

Foram utilizadas 13 amostras de TVTC obtidas do arquivo do Laboratório de Patologia Veterinária da UNESP campus de Araçatuba. As amostras foram selecionadas com os seguintes critérios de inclusão (CI): cães adultos; de ambos os sexos, sem tratamento clínico prévio; com localização, nas fêmeas, em região de vulva, vagina e região perineal, e nos machos em prepúcio, pênis e bolsa testicular. Uma amostra da neoplasia obtida a fresco de uma fêmea adulta que foi mantida em meio de cultura celular para posterior análise. As amostras foram fixadas em solução de formaldeído a 10% por 48 horas e processados de acordo com a técnica de inclusão em parafina. Fragmentos histológicos foram seccionados (3 - 4 $\mu$ m) e corados pela Hematoxilina e Eosina, e os espécimes foram analisados por microscopia de luz.

## **2.2. Detecção do gene TP53 e transcrição da sua proteína p53**

### **2.2.1. Extração e purificação do RNA tecidual**

Foi utilizado um fragmento 2,0 g de massa tumoral suspeita de TVT, localizada na porção genital externa, com diagnóstico positivo na histopatologia. O fragmento sofreu digestão enzimática inicial e foi realizada a individualização das células por adição de 5,0 ml de meio essencial mínimo (MEM, Gibco-BRL–Canada, USA) em placas de cultivo celular individuais com diâmetro de 3 cm (Nunc®) suplementado com a adição de 1,0 ml de tripsina 0.25% (Gibco-BRL) a temperatura de 37 °C, em estufa de CO<sub>2</sub>. Após visualizar o sobrenadante contendo células em suspensão, foi realizada uma centrifugação a 2.000 g e o sedimento submetido à extração do RNA total com o KIT PureLink® viral RNA/DNA (Invitrogen™- Carlsbad, CA) seguindo as recomendações do fabricante. Ao final do procedimento, o RNA foi quantificado por espectrofotometria para avaliação da qualidade e quantidade em Biofotômetro®, (Eppendorf®, HA, Alemanha).

### **2.2.2. Reação de RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) e produção da sonda biotinizada para o gene TP53**

Os procedimentos gerais de cada etapa descrita a seguir foram adaptados aos descritos anteriormente (NUOVO, 2001; NUOVO, 2007). Os iniciadores (primers) foram desenhados para amplificar 276-pb na região conservada correspondente ao gene codificador da proteína p53, localizado nos exons 3

(posição no genoma 608), e 8 (posição no genoma 884), relativos às sequências disponíveis no GenBank(\*) referentes ao TVTC.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na reação de RT-PCR

Tipo do Primer	Sequência nucleotídica
Sense	TTG CCA GCT GGC GAA GAC CTG
Antisense	TGC CTT ATG AGC CAC CCG AGGT

LOPES et al, 2010

Para o controle interno das reações de RT-PCR foi realizada a amplificação do *house keep* gene, beta-actina canina como descrito anteriormente (LOPES et al., 2010). Todas as reações de transcrição reversa e reação de PCR foram realizadas segundo preconiza Lopes et al. (2010). Para cada reação foram utilizados 5µL de RNA tecidual para a transcrição reversa com o uso das enzimas Superscript® III, 2U. As reações de PCR foram realizadas seguindo as recomendações do Kit *TaqPlatinum High Fidelity* com os ciclos de 94°C por 1 min para denaturação, 48°C por 1 min para anelamento e 72°C por 2 min para extensão, durante 35 ciclos repetidos em um termociclador marca Eppendorf®, modelo Mastercycler. A extensão final foi 5 min à temperatura de 72°C. Os produtos foram visualizados por eletroforese em 1,5% agarose, com 0,5µg/ml de brometo de etídeo, detectados e documentados pelo sistema. Com a utilização do primer *reverse* acoplado a biotina, o produto final da reação de PCR foi utilizado como sonda de DNA para a reação de ISH *in situ*.

### 2.2.3. Reação de hibridização in situ

Com o objetivo de verificar sequências de DNA homólogas ao fragmento da sonda biotinilada foi conduzida a reação de hibridização nos cortes histológicos dos 13 tumores analisados. A reação de hibridização iniciou-se com a desparafinização e re-hidratação e lavagens dos cortes histológicos, seguidas pelo aquecimento dos produtos de RT-PCR (sonda biotinilada) a 98 °C por 8 min, mantidos em 4 °C diluídos na concentração de 2µg/µl em uma solução de hibridização (50% de formamida, 5% soro albumina bovina, 0,02% de SDS e solução de citrato de sódio 5X – SSC). Em seguida, foram adicionados aos cortes histológicos, a solução de hibridização, e os mesmos aquecidos a mesma temperatura e tempo com os adaptadores de blocos intercambiáveis. Em uma câmara úmida, foram acondicionados os cortes histológicos recobertos com produtos biotinilados por 18 horas, selados com parafilme. Transcorrido o período de incubação, os parafilmes foram removidos e as lâminas lavadas em solução de hibridização sem SDS e com valores decrescentes de solução de citrato de sódio: 0,1X SSC (solução citrato de sódio) (D) e 1X SSC (C), aquecidas em banho Maria à 56°C por 15 minutos cada. Assim os cortes foram re-fixados com paraformaldeído 4% por 20 min. O sinal foi detectado com a utilização do kit PermanentRed® (DakoCytomation®, Carpinteria, CA) com o uso da enzima fosfatase alcalina. Ao final os mesmos foram contra-corados com hematoxilina aquosa de Harris e montados com o meio Faramount (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO). A visualização e documentação das lâminas foram realizadas pelo



microscópio da marca Zeiss®, modelo Axion Image A.1 e Software marca Zeiss®, modelo AxioVision 4.7.

### **2.3. Expressão do RNAm correspondente ao gene TP53 pela reação de RT-PCR *in situ***

A técnica de RT-PCR *in situ* possui como princípio a detecção e amplificação de sequências de RNAm no tecido. Todas as reações foram conduzidas em um termociclador marca Eppendorf®, modelo Mastercycler com bloco intercambiável para adaptação de lâminas de histopatologia. Uma digestão proteolítica inicial com 10 µg/ml de proteinase K por 30 minutos foi realizada para favorecer a disponibilidade das seqüências de RNA. A reação foi interrompida com tampão Tris-HCl pH 7,4, 6 mM de MgCl e 2 mM de CaCl e aquecimento à 95 °C por 5min. A reação de RT-PCR *in situ* foi conduzida em uma única etapa. Para tanto, as lâminas foram recobertas com a mistura do kit Superscript III/One Step RT-PCR: A reação foi conduzida nas seguintes condições: 1 X Reaction Mix com a Superscript III/Taq Polimerase Platinum High Fidelity 2,5UI e os primers descritos no item 2.2.2. As condição de tempo, temperaturas e ciclos foram idênticas as já descritas, com exceção do número de ciclos, que nesta reação foram 5 ciclos somente. Para se evitar amplificações inespecíficas, após o término da reação de RT-PCR *in situ*, foi iniciada uma etapa de hibridização com a mesma sonda descrita no item 2.2.2, e as mesmas condições de hibridização descritas no item 2.2.3. O sinal foi detectado com a utilização do kit Permanent Red®, com o

uso da enzima fosfatase alcalina. Ao final as mesmas foram contra-coradas com hematoxilina aquosa de Harris e montados com o meio Faramount (Sigma-Aldrich®). A visualização e documentação das lâminas foram obtidas com o auxílio do microscópio da marca Zeiss®, modelo Axion Image A.1 e Software marca Zeiss®, modelo Axio Vision 4.7.

## **2.4. Expressão das proteínas p53, p63 e Bcl-2**

### **2.4.1. Imunoistoquímica para detecção das proteínas p53, p63 e Bcl-2**

As secções de TVTC, aderidas em lâminas previamente revestidas por poli-lisina pura, foram desparafinizadas, hidratadas e lavadas com água destilada. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por meio da imersão das lâminas em solução de metanol/acetona e peróxido de hidrogênio, por 30 min. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica onde as secções sofreram aquecimento em forno microondas e estavam submersas em tampão citrato pH 6,0 , por 3 minutos na potência média. Assim que as lâminas atingiram temperatura ambiente, foi iniciado o bloqueio das ligações inespecíficas, através da imersão dos cortes em uma solução de água destilada e leite em pó a 10%. Após lavagem com PBS, estes cortes foram submetidos à incubação com os anticorpos primários monoclonais para cada proteína, do laboratório Sigma-Aldrich®, sob refrigeração (-4°C), “*over night*” na diluição de 1:500 para o anticorpo p63, 1:100 para p53 e 1:500 para o Bcl-2. Os controles negativos foram feitos a partir da omissão do anticorpo primário. Após lavagens com PBS os cortes

histológicos foram incubados com o anticorpo secundário biotinilado (kit LSAB - Dako), seguindo-se de lavagens com solução tampão e a incubação com o anticorpo secundário Kit Dako®. A coloração foi realizada empregando-se o kit Fast red Tr/Nafthal As-Mx Alkaline Phosfatase Substrate (DakoCytomation®). Ao final, os mesmos foram contra-corados com hematoxilina aquosa de Harris e montados com o meio Faramount (Sigma-Aldrich®).

#### **2.4.2. Reação de imunofluorescência para detecção das proteínas p53 e p63**

A imunofluorescência para os anticorpos p53 e p63 foi conduzida conforme rederido em 2.4.1. Todas as lâminas foram submersas em formaldeído por 10 minutos para a fixação dos cortes e tratadas em seguida com Triton 0,5%, em PBS, por 30 minutos. Os cortes de tecido foram incubados “over night” sob refrigeração, após a adição dos anticorpos primários p53 (Sigma-Aldrich®, diluição 1:100) e p63 (Sigma-Aldrich®, diluição 1:500). Em seguida, iniciou-se a incubação com o anticorpo secundário, onde foram utilizados os fluorocromos Cy3 (ExtrAvidin®-Cy3, Sigma-Aldrich®, diluição 1:200) e FITC (ExtrAvidin®-FITC, Sigma-Aldrich®, diluição 1:100). Esses marcadores conjugados foram adicionados sobre os cortes e incubados à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora. Os controles negativos foram preparados pela omissão do anticorpo primário. Para a contra coloração utilizou-se iodeto dipropideo para o FITC e DAPI para Cy3, ambos na diluição 1:1000, por 15 minutos.

## 2.5. Análise estatística

Cada secção, dentre os métodos aplicados, foi avaliada por dois observadores “cegos”, e com os dados obtidos foi realizada a análise descritiva e aplicado o teste de correlação de Spearman.

A avaliação microscópica semi-quantitativa foi realizada individualmente no tecido de TVTC e submetida à imunomarcação para Bcl-2, p53 e p63, imunofluorescência para os anticorpos p53 e p63 e a detecção do gene TP53 no núcleo das células através de ISH e seu RNAm correspondente no citoplasma através de RT-PCR *in situ* (microscópio Zeiss®, Axion Image A.1 - objetiva de 40x e 100x, com câmera integrada). Fotomicrografias foram obtidas com o software Zeiss®, AxioVision 4.7. As avaliações foram realizadas pelo método semi-quantitativo baseado em escores de quantidade e de intensidade de células positivas em campos escolhidos aleatoriamente. A quantidade foi expressa em: 1 = ocasional (<10%); 2 = positivo (10-30%); 3 = numeroso (30-70%); 4 = evidente (> 70%). A intensidade foi classificada como: 0 = negativo; 1 = mínimo; 2 = moderado; 3 = intenso (OLIVEIRA et al., 2006).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Análise macroscópica

Todas as formações neoplásicas possuíam aspecto macroscópico predominante de massas poliposas ou nodulares, pedunculares, algumas com aspecto proliferativo semelhante à “couve-flor”, e com superfície vermelho-

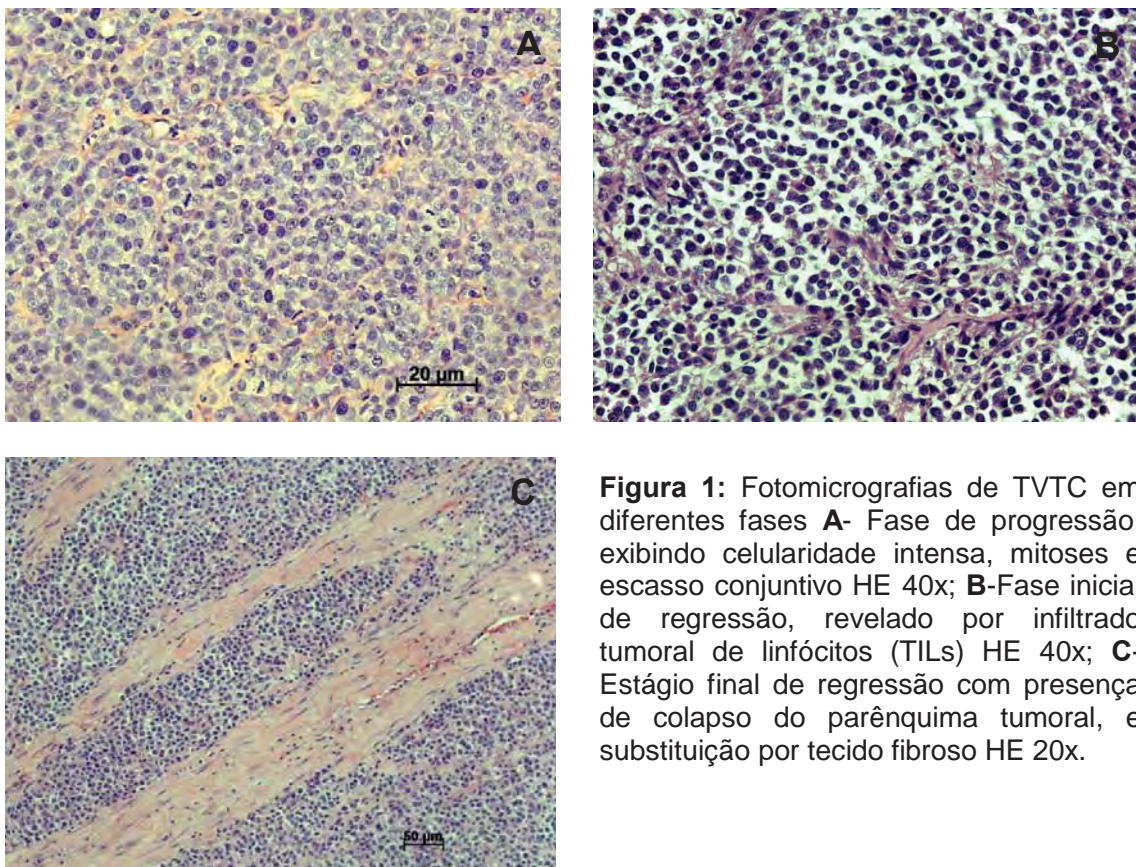
brilhante. As massas tumorais apresentavam consistência friável, liberando fragmentos de tecido à simples manipulação. As amostras foram selecionadas segundo o CI descrito no item 2.1.

## **3.2. Análise microscópica**

### **3.2.1. Histopatologia**

As amostras de TVTC analisadas microscopicamente apresentaram morfologia de células redondas, dispostas em forma de folhas, grupos ou em cordões, separados por tecido conjuntivo delicado. Estas células, que geralmente se organizavam radialmente em torno de vasos sanguíneos e linfáticos, possuíam alta relação núcleo:citoplasma; onde o núcleo exibia forma variando de oval à redonda, com cromatina frouxa, grosseira ou granular. O nucléolo era evidente, bem definido e múltiplo em algumas células. O citoplasma era amplo, levemente acidofílico e de limites pouco definidos. A classificação histológica foi realizada segundo os critérios descritos por, Mukaratirwa et al, (2004). Entre as amostras analisadas, 46% (6/13) delas apresentavam características do estágio de progressão tumoral, isto é, celularidade intensa, inúmeras figuras de mitoses típicas e atípicas, imersas em delicado estroma (Fig. 1A). Observou-se ainda, infiltrado mononuclear e polimorfonuclear discretos, com predomínio de linfócitos, particularmente nas superfícies de mucosas ulceradas. No início da fase regressiva do TVTC, observado em 23% (3/13) das amostras, já havia evidência do estroma conjuntivo e portando menor celularidade tumoral. Permeando as

células neoplásicas, que exibiam intensa atividade mitótica (Fig.1B) observou-se também infiltrado de linfócito tumoral (TILs). No estágio de regressão final, detectado em 31% (4/13), foi identificada proliferação de estroma conjuntivo formando bandas entre as células neoplásicas, redução da atividade mitótica, figuras de apoptose frequentes em meio a focos de necrose coagulativa (Fig. 1C).



**Figura 1:** Fotomicrografias de TVTC em diferentes fases **A-** Fase de progressão, exibindo celularidade intensa, mitoses e escasso conjuntivo HE 40x; **B-**Fase inicial de regressão, revelado por infiltrado tumoral de linfócitos (TILs) HE 40x; **C-** Estágio final de regressão com presença de colapso do parênquima tumoral, e substituição por tecido fibroso HE 20x.

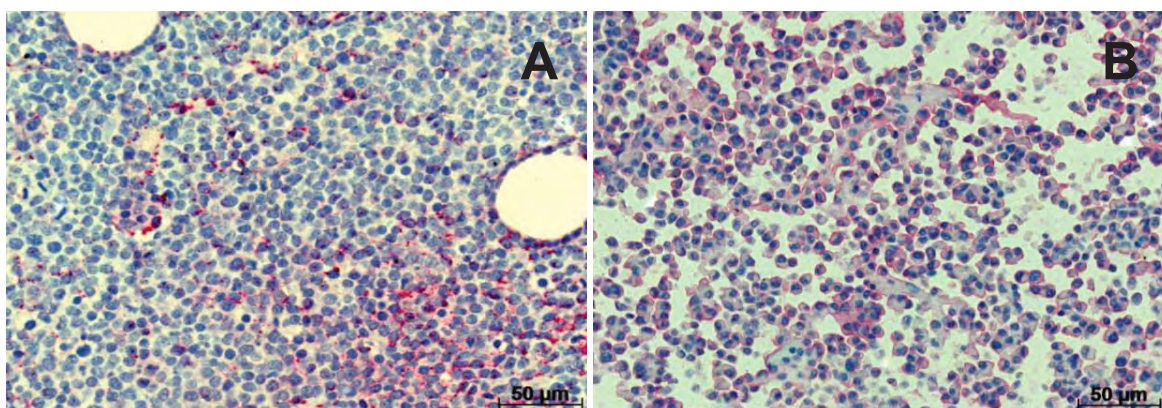


### 3.2.2. Detecção do gene TP53 por RT-PCR *in situ* e ISH

A tabela 1 demonstra a positividade, bem como, a intensidade das reações para a detecção do DNA referente ao TP53 e seu RNAm correspondente evidenciadas pelas técnicas de RT-PCR *in situ* e ISH. As células classificadas como positivas na ISH exibiram pontilhado vermelho intenso no núcleo e na RT-PCR as células apresentaram citoplasma manchado de vermelho (Fig.1 A e B).

**Tabela 1.** Detecção do DNA do TP53 e seu RNAm correspondente através das técnicas de RT-PCR/ISH. Araçatuba, SP

Detecção do genoma celular e transcrição					
Scores	ISH (DNA)	RT-PCR (RNAm)	Scores	ISH (DNA)	RT-PCR (RNAm)
<10%	5	4	0	1	1
10-30%	4	7	1	2	1
30-70%	2	1	2	4	7
>70%	2	1	3	6	4



**Figura 2.** Fotomicrografias de TVTC submetido às técnicas de ISH e RT-PCR *in situ* exibindo respectivamente: **A-** evidência do DNA correspondente ao TP53 representado por pontos vermelhos no núcleo das células; **B-** evidência do RNAm representado por coloração avermelhada no citoplasma das células neoplásicas.

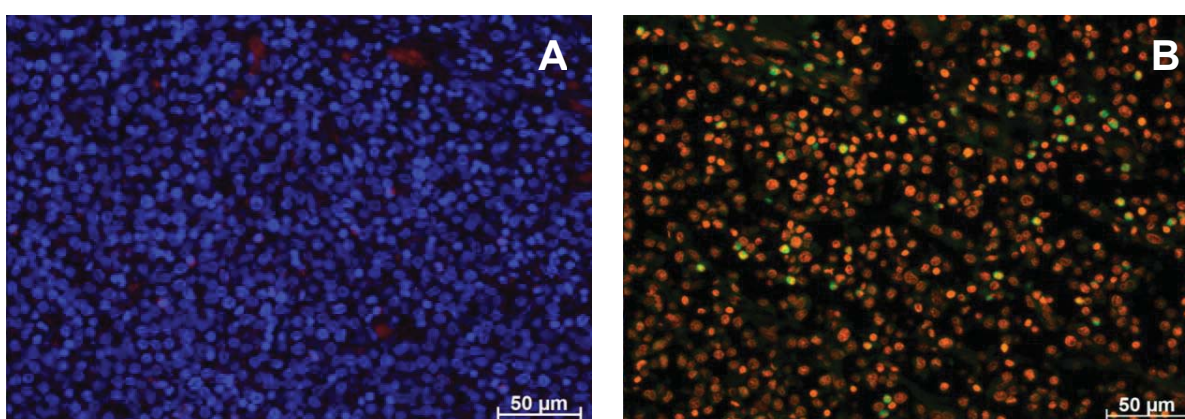
### 3.2.3 Imunofluorescência para p53 e p63

Na expressão das proteínas p53 e p63, demonstradas na tabela 2, as células do TVTC submetidas à IF apresentaram pontos no citoplasma de coloração verde ou vermelha para os cromógenos fluorescentes FITC (Fig.3A) e Cy3 (Fig.3B) quando positivas. Todas as secções reagiram para o anticorpo p63

**Tabela 2:** Resultado da expressão das proteínas p53 e p63, na imunofluorescência com relação à intensidade e quantidade do sinal. Araçatuba, SP.

Expressão das proteínas p53 e p63 (imunofluorescência)					
Scores	Quantidade		Scores	Intensidade	
	p53	p63		p53	p63
<10%	3	2	0	1	0
10-30%	4	5	1	2	2
30-70%	2	1	2	5	3
>70%	1	2	3	2	5

A análise estatística apresentou correlação significativa entre p53 e p63 na intensidade da expressão para  $p < 0,05$  ( $p = 0,0531$ ).



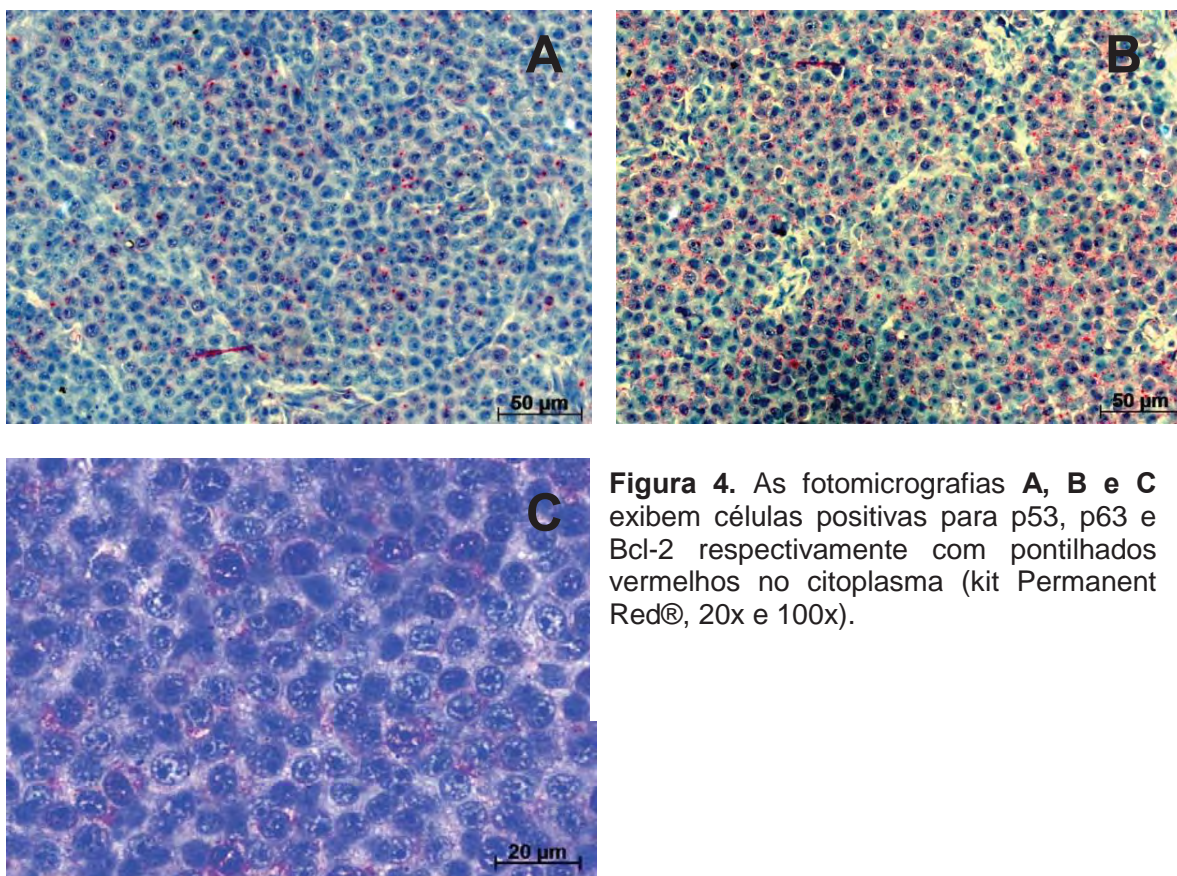
**Figura 3.** Fotomicrografias de secções de TVTC marcadas para p53 e p63 por imunofluorescência apresentando respectivamente: **A-** células com núcleo azul e quando positivas para p53 exibem no citoplasma coloração vermelha fluorescente (Cromógeno – Cy3); **B-** células com núcleo laranja-avermelhado, quando positivas exibem no citoplasma coloração verde fluorescente (Cromógeno - FITC).



A expressão das proteínas p53, p63 e Bcl-2 nas células de TVTC, submetidas à imunohistoquímica, foram caracterizadas por depósitos vermelhos no citoplasma quando positivas (Fig. 4 A e B). Os resultados, com relação à quantidade de células positivas e a intensidade da reação, são observados na tabela 3.

**Tabela 3:** Resultado da expressão das proteínas p53, p63 e Bcl-2 na IHQ com relação à intensidade e quantidade do sinal. Araçatuba, SP.

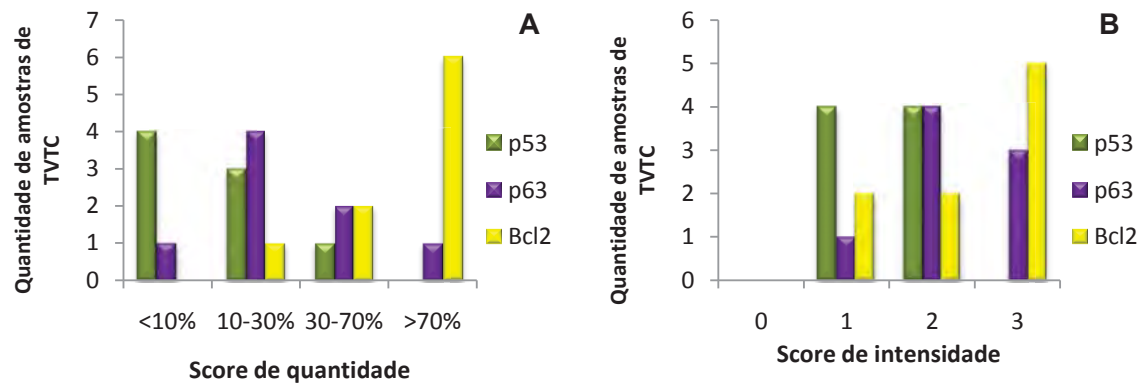
<b>Expressão das proteínas p53, p63 e Bcl-2 (IHQ)</b>							
<b>Scores</b>	<b>Quantidade</b>			<b>Scores</b>	<b>Intensidade</b>		
	<b>p53</b>	<b>p63</b>	<b>Bcl2</b>		<b>p53</b>	<b>p63</b>	<b>Bcl-2</b>
<b>&lt;10%</b>	4	1	0	<b>0</b>	0	0	0
<b>10-30%</b>	3	4	1	<b>1</b>	4	1	2
<b>30-70%</b>	1	2	2	<b>2</b>	4	4	2
<b>&gt;70%</b>	0	1	6	<b>3</b>	0	3	5



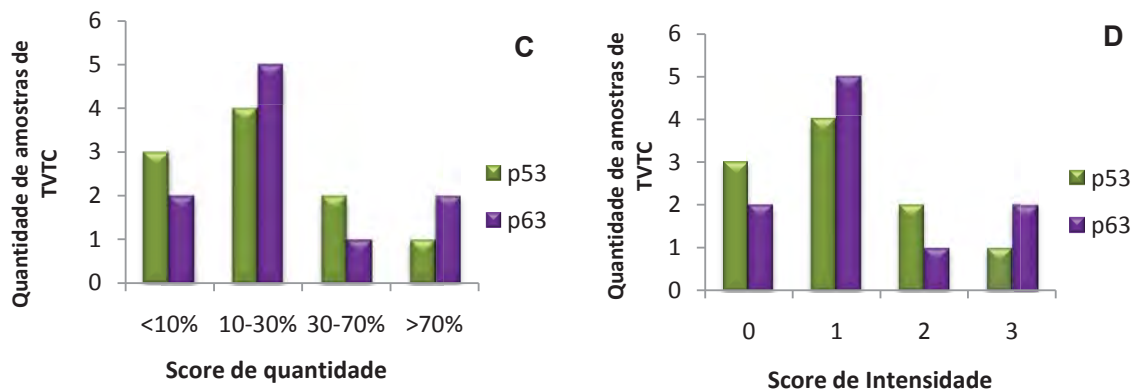
**Figura 4.** As fotomicrografias **A, B e C** exibem células positivas para p53, p63 e Bcl-2 respectivamente com pontilhados vermelhos no citoplasma (kit Permanent Red®, 20x e 100x).

O resumo dos resultados, obtidos na análise das amostras submetidas às técnicas de IHQ e a IF pode ser observado nos gráficos a seguir.

### Imunoistoquímica (p53, p63 e Bcl-2)



### Imunofluorescência (p53 e p63)



**Figura 5.** **A e B-** resumo dos dados obtidos na IHQ classificados de acordo com os scores de quantidade e qualidade das reações. **C e D-** resultados da IF classificados de acordo com os scores de quantidade e qualidade das reações

#### 4. DISCUSSÃO

As alterações histopatológicas indicativas dos estágios de progressão, regressão inicial e final do TVTC, tanto nos machos como nas fêmeas, foram condizentes com os critérios estabelecidos anteriormente. Visto que a fase progressiva ou proliferativa da neoplasia foi, caracterizada por hiper celularidade e mínimo tecido conectivo estromal, a fase inicial de regressão apresentou infiltração de TILs, e na fase final de regressão houve o predomínio de tecido conjuntivo denso permeando células neoplásicas com arquitetura morfológica de apoptose (MUKARATIRWA et al, 2004).

Nos cortes de tecido de TVTC, foi identificado o TP53, através do seu DNAC homólogo aplicando-se a técnica de ISH, do mesmo modo seu RNAm foi revelado pela RT-PCR *in situ*. Ambos os marcadores ocorreram em mais de 90% das amostras, independente da intensidade da reação, porém a identificação do RNAm não significa a transcrição da proteína p53, sugerindo uma possível anormalidade funcional no TP53 e seus produtos no TVTC (MORO et al., 2009 (CHOI & KIM, 2002).

A expressão da p53 foi observada na maioria das amostras, independente da fase evolutiva da neoplasia, sendo que na IHQ, 50% dos cortes de tecido neoplásico apresentaram menos de 10% de células marcadas e na IF uma amostra que estava em fase de regressão, não expressou a proteína. Porém era esperado que a atividade da p53 estivesse aumentada no TVTC em fase de regressão onde figuras de apoptose são mais frequentes. Essas observações também mostram uma menor reatividade da referida proteína no TVTC,

concordando com o estudo recente realizado por Moro, et al (2010), que também relaciona este fato com as características pouco agressivas que essa neoplasia comumente apresenta. No entanto, pode-se afirmar neste estudo que, provavelmente exista uma alteração na transcrição do gene, visto que o TP53 e o RNAm homólogo esteve presente em quase a totalidade das amostras. Segundo Collavin et al, (2010), a perda funcional ou expressão desregulada da p53 é frequente em tumores primários, essas alterações podem ter um grande impacto no efeito regulatório comum às proteínas da família p53.

Na análise estatística foi detectada correlação significativa ( $p < 0,05$ ) para a intensidade na expressão de p53 em comparação com a p63 no método de IF, embora esta observação não tenha sido detectada na IHQ. Apesar da ausência de dados relativos ao comportamento dessas proteínas no TVTC, a correlação positiva observada no presente trabalho pode sugerir que as referidas proteínas possuem funções dependentes durante a carcinogênese do TVTC, assim como a sensibilidade da IF na detecção dessas proteínas. Em contrapartida, em estudos com carcinoma de glândula mamária e carcinoma oral de células escamosas, essa correlação não foi significativa (BERTAGNOLLI et al., 2009, OLIVEIRA et al., 2007).

Com relação à expressão da p53 comparando com a p63, foi verificado que havia uma super expressão para a p63 em todas as amostras positivas para as duas proteínas. Tais achados estão de acordo com estudos realizados nos tumores de glândula mamária em humanos e em cadelas (ADOMO et al., 2009; BERTAGNOLLI et al., 2009). Para justificar esses achados, existe a possibilidade

de ocorrer nas células neoplásicas a perda de p53, que anula ligações importantes com outras proteínas, porém a p63 pode compensar essa ausência. No entanto, a p53 expressa nos cortes de TVTC, quando em mutação, apresenta maior estabilidade, podendo formar complexos com outras proteínas e adquirir novas interações. E quando em altos níveis pode ligar e inibir a p63, e tornar a ligação, com outras proteínas, extremamente fraca (COLLAVIN et al., 2010).

A p63 pode ser comumente observada em neoplasias humanas, como carcinoma de células escamosas e de glândula mamária, devido a sua localização em núcleos de células da camada basal da epiderme do tecido glandular, agindo como uma importante reguladora do desenvolvimento desses tecidos (FUKUSHIMA et al, 2006). Até o presente momento não existem relatos sobre a presença da p63 em TVTC e sua função relacionada à supressão de tumores ainda não está muito bem esclarecida, pois essa proteína, raramente apresenta mutações ou deleções. Porém, a riqueza de informações relacionadas à presença de homólogos a p53 em neoplasias humanas, indica que essas proteínas possuem funções importantes na supressão de tumores (COLLAVIN et al., 2010). As amostras de TVTC, utilizadas no presente estudo mostraram maior escore na expressão para p63, durante a fase de regressão do tumor, sugerindo que a sua presença pode estar relacionada com prognóstico da neoplasia estudada, uma vez que a perda da sua expressão estaria associada com a progressão de tumores invasivos e metastáticos (OLIVEIRA et al., 2007; BERTAGNOLLI et al., 2009).

Embora não existam relatos anteriores, foi identificada nas amostras de TVTC, marcante expressão da proteína Bcl-2, independente da fase de desenvolvimento da neoplasia. A expressão da Bcl-2, e de membros da sua família desempenham funções na carcinogênese que permanecem desconhecidas, pois, ao mesmo tempo em que, estão relacionadas com resistência a drogas e a radioterapia, também podem estar associadas ao menor fenótipo de malignidade e prognóstico favorável. Estas observações, relacionadas com a sobrevivência de células tumorais que expressam Bcl-2, ocasionariam a seleção celular para adquirir funções associadas à progressão como à instabilidade genética (FRENZEL et al., 2009). Podem ocorrer interações entre as proteínas da família Bcl-2 com a proteína p53; tais proteínas utilizam regiões do DNA no TP53 de maior similaridade entre os membros da família Bcl-2 (COLLAVIN et al., 2010). Segundo Kumaraguruparan et al.,(2006), a super expressão da Bcl-2 geralmente está associada também com a super expressão de p53 mutante, porém no presente estudo embora exista a presença marcante da Bcl-2 , o mesmo não foi observado com a p53 nas amostras de TVTC.

Os resultados no presente estudo fornecem evidências adicionais sobre a relação dessas proteínas (p53, p63, Bcl-2) que, até o momento não haviam sido pesquisadas no TVTC e como podem influenciar no desenvolvimento desse tumor.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que:

- A p63 apresentou maior expressão nas amostras em regressão, sugerindo seu envolvimento com o prognóstico favorável da neoplasia;
- Provavelmente existem anormalidades no gene TP53 e em sua proteína transcrita;
- IF demonstrou maior sensibilidade para detecção de p53 e p63;
- A expressão das proteínas p53 e Bcl-2 e a detecção do TP53, não demonstraram relação com o prognóstico do TVTC;
- As proteínas estudadas no presente trabalho desempenham funções interligadas que provavelmente coordenam o desenvolvimento do TVTC.



## REFERÊNCIAS

2. ADORNO M, CORDENONSI M, MONTAGNER M, DUPONT S, WONG C, HANN B, SOLARI A, BOBISSE S, RONDINA M, GUZZARDO V. (2009). A mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGF $\beta$ -Induced metastasis, **Cell**, 137:87-98.
3. BERTAGNOLLI AC, CASSALI GD, GENELHU MCLS, COSTA FA, OLIVEIRA J.F.C., GONCALVES P.B.D.(2009). Immunohistochemical expression of p63 and  $\delta$ Np63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. **Veterinary Pathology**, 46 (3), pp. 407-415.
4. CHOI KI, KIM CJ. (2002). Sequence Analysis of Canine LINE-1 Elements and P53 Gene in Canine Transmissible Venereal Tumor. **Journal of Veterinary Science** 3(4), 285-292.
5. CHU RM, LIN JY, LIU CG, YANG SY, HSEUH WC, HSIAO YW, HUNG SW, PAO HN, LIAO KW. (2001). Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. **Anticancer Research**. 21, 4017–4024.
6. CLOHESSY J, PANDOLFI P. (2009).  $\beta$ -tting on p63 as a Metastatic Suppressor. **Cell**, 137, 28-30.
7. COLLAVIN L, LUNARDI A, DEL SAL G. (2010). p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. **Cell Death and Differentiation**, 17: 901-911
8. CORY S, ADAMS JM. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **National Review Cancer**, 2:647–656.
9. DEYOUNG MP, ELLISEN LW. (2007).p63 and p73 in human cancer: defining the network. **Oncogene**, 26:5169–83.
10. DI COMO CJ, URIST M, BABAYAN I, et al. (2002) P63 expression profiles in human normal and tumor tissues. **Clinical Cancer Research**, 8:494-501.
11. DOHN M, ZHANG S, & CHEN X. (2001). P63 $\alpha$  and  $\delta$ Np63 $\alpha$  can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. **Oncogene**, 20: 3193-205.

12. FRENZEL A, GRESPI F, CHMELEWSKI W, VILLUNGER A. (2009) Bcl-2 family in carcinogenesis and treatment of cancer. **Apoptosis**, 14: 584-596.
13. FUKUSHIMA N, SATOH T, SUEOKA N, SATO A, IDE M, HISATOMI T, KUWAHARA N, TOMIMASU R, TSUNEYOSHI N, FUNAI N, SANO M, TOKUNAGA O, SUEOKA E. (2006) Clinico-pathological characteristics of p63 expression in B-cell lymphoma. **Cancer Science**, 97: 1050-1055.
14. KANAYA N, OKUDA M, TOYAMA N, OIKAWA T, INOKUMA H, MORIMOTO M, HAYASHI T, UNE S, NAKAICHI M, TAURA Y, TSUJIMOTO H, AND ONISHI T. (2002). Detection of the anti-P53 antibodies in dogs with tumors. **Journal Veterinary Medicine Science**, 64, 973–979.
15. KUMARAGURUPARAN R, PRATHIBA D, NAGINI S. (2006). Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. **Research in Veterinary Science**, 81: 218–224.
16. LEE CH, KIM W, LIM J, KANG M., KIM D, AND KWEON, O. (2004). Mutation and over expression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**, 5, 63–69.
17. LOPES RA; CARDOSO TC; LUVIZOTTO MCR; ANDRADE AL. (2010) Occurrence and expression of p53 suppressor gene and c-Myc oncogene in dog eyelid tumors. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, p. 69-75.
18. MIHARA M, ERSTER S, ZAIKA A, PETRENKO O, CHITTENDEN T, PANCOSKA P, MOLL UM. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. **Molecular Cell**. 11:577–590.
19. MORO JV, TINUCCI-COSTA M, SILVEIRA ACT, GERARDI DG, ALESSI AC. (2010). Reactivity of p53 protein in canine transmissible venereal tumor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. 62, 2, 318-323.
20. MUKARATIRWA S, GRUYS E. (2004). Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. **Veterinary Quarterly**, 25: 101–111.
21. MURGIA C, PRITCHARD KJ, KIM S, FASSATI A, WEISS AR. (2006). Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. **Cell** 126, 447-487.

22. NUOVO GJ. (2001). Co-labeling using *in situ* PCR: a review. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 49: 1329-1339.
23. NUOVO GJ. (2007). The utility of in-situ-based methodologies including *in situ* polymerase chain reaction for the diagnosis and study of viral infections. **Human Pathology**, 38: 1123-1136.
24. OLIVEIRA LR, RIBEIRO-SILVA A, ZUCOLOTO S. (2007). Prognostic impact of p53 and p63 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 36:191-197.
25. PIETSCH EC, SYKES SM, MCMAHON SB, AND MURPHY ME. (2008). The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 27(50): 6507–6521.
26. SÁNCHEZ-SERVÍN A, MARTÍNEZ S, CÓRDOVA-ALARCON E, FAJARDO R. (2009). TP53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor. **Journal Veterinary Science**, 10, 353-355.
27. TOLEDO F, WAHL GM. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas **Nature Reviews Cancer**. 6:909–923
28. TOMITA Y, MARCHENKO N, ERSTER S, NEMAJEROVA A, DEHNER A, KLEIN C, et al. (2006). WT p53, but not tumor derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. **Journal of Biollgical Chemistry**; 281:8600–8606.
29. VAZQUEZ-MOTA N, SIMÓM-MARTINEZ J, CÓRDOVA-ALARCON E, LAGUNES L, FARJADO R. (2008). The T963C mutation of TP53 gene does not participate in the clonal origin of canine TVT. **Veterinary Research Communication**, 32:187-191.