

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO
CANINO: A INSERÇÃO DO TRANSPOSON LINE-1 NO
GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE**

LUCIANO SANTOS DA FONSECA

BOTUCATU – SP
Fevereiro – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO
CANINO: A INSERÇÃO DO TRANSPOSON LINE-1 NO
GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE**

LUCIANO SANTOS DA FONSECA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção
do título de mestre em Medicina Veterinária

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha
Co-orientadora: Profa. Dra Lúcia S. L. S. da Mota

BOTUCATU – SP
Fevereiro – 2009

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

Fonseca, Luciano Santos da.

Tumor venéreo transmissível espontâneo canino: a inserção do transposon LINE-1 no gene *c-MYC* e os critérios de malignidade.

/ Luciano Santos da Fonseca. – Botucatu : [s.n.], 2009

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientadora: Noeme Sousa Rocha

Co-orientadora: Lígia S L. S. da Mota

Assunto CAPES: 50502034

1. Cão - Doenças 2. Doenças sexualmente transmissíveis 3. Tumores em animais - Aspectos genéticos

CDD 636.70896992

Palavras-chave: Cão; LINE; MYC; TVT; Sequenciamento

Nome do Autor: Luciano Santos da Fonseca

**TÍTULO: TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A
INSERÇÃO DO TRANSPOSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS
DE MALIGNIDADE.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Livre-docente Noeme Sousa Rocha

Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Adjunta Maria Denise Lopes

Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Ass. Dra. Adriane Pinto Wasko

Membro
Departamento de Genética
IBB– UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 20 de fevereiro de 2009.

DEDICATÓRIA

Mesmo que tivesse em minhas mãos todo o perfume das rosas, toda a beleza do céu, toda a pureza dos anjos, toda a inocência das crianças, toda a grandeza do mar, toda a força das ondas, mesmo que eu tivesse todas as coisas belas da vida e todos os belos lugares do mundo nada teria sentido se eu não tivesse o presente mais valioso, mais nobre e mais sagrado que Deus pôde me dar:
MEUS PAIS.

Itaan Santos da Fonseca e Vilma Santos da Fonseca

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças nos momentos mais difíceis dessa jornada. Graças a Ele estou concluindo essa jornada e mais uma etapa da minha vida profissional.

À minha orientadora, Professora Noeme Sousa Rocha, por todo apoio e ensinamentos adquiridos nesta jornada. Que eu possa ser sempre merecedor do seu respeito e confiança.

À minha co-orientadora, Professora Lígia Souza Lima Silveira da Mota, que não mediu esforços para a realização deste projeto demonstrando sempre perseverança e entusiasmo mesmo nas horas difíceis.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo subsídio financeiro por meio da concessão de Bolsa de Mestrado para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo nº 05/53802-0) pelo auxílio financeiro cedido para compra de parte dos materiais desse projeto.

Ao meu irmão amado, Fabiano Santos da Fonseca, de quem tenho tanto orgulho. A minha vida não teria nenhum sentido se você não existisse.

À minha avó materna, Aldenora Ferreira Galvão dos Santos (*in memoriam*), por quem tenho muito amor. Sua ausência ainda me dói, mas a sua lembrança permanecerá VIVA e será sempre um alento para o meu coração. Sempre.

À Dra. Virgínia Elias Coscrato pela execução do sequenciamento genético das amostras de TVT, demonstrando sempre paciência e disponibilidade.

À Professora Renée Laufer Amorim e sua orientada Marcela Marcondes Pinto, pela disponibilização do analisador de imagens para contagem das células neoplásicas e pelo carinho e respeito com que sempre me trataram. Meu eterno agradecimento.

Ao Professor Júlio Lopes Sequeira e suas orientadas Ana Paula Batista Masseno e Camila Dias Porto pela disponibilização do analisador de imagens para fotografar e digitalizar as imagens da microscopia deste trabalho. Agradeço imensamente a vocês.

À Dra. Agnemi Koyahagawa pelos almoços em sua casa e fora dela, pelos presentes e pelos sábios conselhos que me deu durante essa jornada. Com certeza são ensinamentos que vou levar comigo para o resto da vida. Obrigado pela sua consideração e amizade.

À Sandra Bassani Silva, pela coleta das amostras, materiais e acima de tudo pelo companheirismo. Que eu seja sempre digno da sua amizade.

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

Aos funcionários da Pós-graduação, Denise, Maria e José Roberto pela ajuda, respeito, amizade e consideração com que sempre me trataram durante esses 2 anos de mestrado.

À Valquíria Santiloni, meu muito obrigado pelo seu carinho e paciência e pelo convívio sempre agradável no Departamento de Genética. Você estará sempre em meu coração.

À grande amiga, Lilian Mara de Carvalho Rodrigues, por toda amizade e dedicação à minha pessoa. Nossa amizade é uma prova verdadeira de que nem o tempo e nem a distância conseguem nos separar.

À Veridiana Fernandes da Silveira, pois dizer OBRIGADO às vezes não é suficiente para agradecer, mas agradeço a Deus por cada momento que passamos juntos. Nos momentos felizes e difíceis, por ter me aceitado com meus defeitos e por saber elogiar minhas virtudes. Nossa amizade é assim, como uma lembrança que não se apaga, como a distância que não separa e que a maldade jamais destruirá.

À Luciana Pereira Machado, pela amizade, cumplicidade e alegria. Houve tempos em que me senti sozinho, mas como um presente maravilhoso de Deus você apareceu em minha vida com seu jeito especial e sua amizade verdadeira. E hoje não mais estou só.

À Letícia Andreza Yonezawa, pela amizade, pelos momentos de descontração, pelos momentos difíceis, nossas “conversas descontraídas” e pela ajuda na formatação deste trabalho.

À José Biazon (*in memoriam*) e Nide Amaro Sena Montefusco, por terem me acolhido como um filho em seu lar. Vocês são um presente em minha vida.

À Ana Cristina Montefusco e Monica Aparecida Gallo pela amizade, companheirismo e momentos inesquecíveis durante minha estadia em Botucatu. Amo vocês!!!!

Aos Residentes da Patologia (Didier, Arita e Freddi), por chamarem nos casos de TVT e pelo convívio descontraído.

Aos residentes da Cirurgia de Pequenos Animais (Priscila, Milton e Vitor) por auxiliarem nas coletas dos TVT's.

A todos os professores, funcionários e colegas do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Zootecnia, UNESP, pelo carinho e convivência agradável, conseguindo transformar o local de trabalho em um ambiente prazeroso: Edna Tereza de Lima (grande amiga), Karina Rodrigues dos Santos, Sílvia (ornito), Ticiane (ornito), Anita (ornito), Adriano (ornito), Dona Lurdes, Carmen, Rafael Torres Neto, Leandro Cavalcanti, Celmira Calderón, Flávia Santini, Sr. Noel, Maury Raul, Marlene Dias, Cristininha, Maricília (Funvet), Ana (Funvet), , Daisy Fávero Salvadori, Professora Lúcia (parasito), aos que eu esqueci de citar aqui, e aos que fizeram e fazem parte da minha vida.

Aos amigos do Centro Veterinário de Bauru, Denise Moretti, Carlos Meirelles, Gisele Brandão, Denise Secretária, Amanda Keller, Wagner e Erika Visacre, pela amizade mesmo que distante. Nunca me esqueço de vocês.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I	1
1. Introdução Geral.....	1
2. Revisão de Literatura.....	3
2.1 Tumor Venéreo Transmissível	3
2.2 Diagnóstico Citopatológico	4
2.3 Gene c-MYC	6
2.4 Elemento de Transposição LINE-1.....	8
2.5 Especificidade do rearranjo LINE-1/c-MYC	10
2.6 Biologia Molecular e suas aplicações na clínica.....	11
2.7 Sequenciamento Nucleotídico.....	13
CAPÍTULO II	16
Resumo	18
Summary.....	19
Introdução.....	20
Material e métodos.....	21
Resultados.....	24
Discussão.....	25
Conclusão.....	29
Referências.....	30
CAPÍTULO III	40
Considerações Finais.....	40
Referências (Capítulo I)	41
ANEXOS	50
Anexo A – Tabela de Contagem de células tumorais.....	50
Anexo B – Ficha de observação de critérios de malignidade.....	53
Anexo C – Normas da revista Applied Cancer Research.....	54
Anexo D – Artigo científico.....	58

FONSECA, L.S. **Tumor Venéreo Transmissível Espontâneo Canino: A inserção do transposon LINE-1 no gene c-MYC e os critérios de malignidade.** Botucatu, 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) é uma das neoplasias mais antigas e em contínua propagação entre hospedeiros. É a segunda neoplasia mais diagnosticada em cães no Serviço de Patologia de Botucatu. Dentre as alterações moleculares mais encontradas no TVT está o rearranjo do proto-oncogene *c-MYC* resultante da inserção do segmento de DNA repetitivo conhecido como LINE (*Long Interspersed Element*). O objetivo deste trabalho foi a identificação dos critérios citopatológicos de malignidade nos grupos linfocitóide e plasmocitóide pela técnica de Papanicolaou, a detecção do rearranjo LINE-1/*c-MYC* nas células do TVT e a realização do sequenciamento genético. Com a coloração de Papanicolaou, os critérios de malignidade nucleares mais observados foram espessamento da membrana nuclear, ranhura nuclear, nucléolo angular e halo perinucleolar. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) amplificou um produto de 340pb em 100% das amostras analisadas e o sequenciamento genético confirmou a presença do rearranjo LINE-1/*c-MYC*. Concluiu-se que a especificidade desta alteração genética é indiscutível corroborando para mais estudos que permitirão o melhor entendimento quanto ao mecanismo de formação deste rearranjo. A coloração de Papanicolaou constituiu uma grande contribuição não apenas para o diagnóstico citológico do TVT, como também, ferramenta valiosa para evidênciação de critérios de malignidade que normalmente não são visualizados quando se utiliza corantes tipo Romanowsky. Para futuras investigações, este estudo poderá servir de esteio para correlacionar morfologia, critérios de malignidade e estudos moleculares ainda não realizados em conjunto para o TVT.

Palavras-chave: cão - TVT - citologia - *c-MYC* – LINE-1 – sequenciamento

FONSECA, L.S. **Tumor Transmissible Venereal Disease Spontaneous Canine: The insertion of transposon LINE-1 in the gene c-MYC and the malignancy criteria.** Botucatu, 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The Transmissible Venereal Tumor disease (TVT) is one of the neoplasias oldest and in continuous propagation between hosts and the second neoplasia more frequent diagnosed in dogs of in the Service of Pathology of Botucatu. Amongst the molecular alterations more frequently found in the TVT c-MYC resultant of the insertion of the repetitive segment of known DNA is the rearrangement of proto-oncogene as LINE (Long Interspersed Element). The objective of this work was the identification of the cytopathology criteria of malignancy in the groups linfocitóide and plasmocitóide for the technique of Papanicolaou, the detention of the LINE-1/c-MYC rearrangement in the cells of the TVT, and the accomplishment of the genetic sequencing. With the coloration of Papanicolaou, the observed nuclear criteria of malignancy more had been thickening of the nuclear membrane, nuclear groove, angular nucleolar and halo perinucleolar. The Reaction in Chain of Polimerase (PCR) amplified a product of 340pb in 100% of the analyzed samples and the genetic sequencing confirmed the presence of the LINE-1/c-MYC rearrangement and the degree of identity between the samples that 94% varied of 96%. Concluded that the especificidade of this genetic alteration is unquestionable corroborating for more studies that will allow optimum agreement how much to the mechanism of formation of this rearrangement. The Papanicolaou staining not only constituted a great contribution for the cytological diagnosis of the TVT, as well as, valuable tool for evidenciacion of malignancy criteria that normally they are not visualized when Romanowsky type is used. For future inquiries, this study it will be able to serve of esteio to correlate morphology, criteria of malignidade and molecular studies not yet carried through in set for the TVT.

Key words: dog – TVT - cytology – c-MYC – LINE-1 - sequencing

1. INTRODUÇÃO GERAL

As investigações sobre TVT canino já foram realizadas, para determinar os índices de proliferação celular pelas técnicas do CEC (concentração eletrolítica cíclica), PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e MIB-1 (anticorpo monoclonal). O critério citológico de malignidade, caracterização morfológica correlacionada a imunocitoquímica, lesões de DNA, investigações em relação ao efeito da própolis sobre a agressividade do TVT, estadiamento clínico desta neoplasia, padronização do uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção do TVT, avaliação da resposta clínica à quimioterapia através da expressão da glicoproteína-p no TVT e estudos epidemiológicos foram realizados pelo nosso grupo de pesquisa em cães no Hospital Veterinário de Botucatu.

A partir deste ponto, os notáveis avanços da Biologia Molecular resultaram em grande impacto na investigação de neoplasias. Buscam-se informações qualitativas e quantitativas, sobre proteínas e ácidos nucleicos, para a investigação de células neoplásicas, não detectadas pelos métodos convencionais de diagnóstico, que orientarão para o protocolo terapêutico mais adequado, estabelecendo assim seu prognóstico e monitoramento, prevenindo as recidivas.

A etiologia do TVT é desconhecida apesar dessa neoplasia ter sido identificado há décadas, sua origem exata ainda é incerta. Pesquisadores acreditam na origem histiocítica, porém se basearam em informações de Cohen (1985) e Das e Das (2000), que limitam-se a questionar a origem reticuloendotelial. As células neoplásicas diferem das células somáticas do cão normal em número de cromossomos, ou seja, o cão normal apresenta 78 cromossomos enquanto que o número de cromossomos do TVT varia entre 57 a 59 cromossomos.

Assim como no Brasil, outros países encontraram um rearranjo genético específico do tumor em questão, denominado LINE-1/c-MYC. Apesar dessa especificidade, não há consenso entre seu mecanismo de formação e sua

relação com a progressão tumoral e agressividade do tumor para o melhor entendimento desta neoplasia.

Foram realizadas pesquisas experimentais, tanto in vitro como in vivo em células tumorais, deixando claro que fatores como agentes físicos, químicos e biológicos, associados ou isolados, induzem a agressão do genoma levando ao crescimento neoplásico.

O sequenciamento genético do TVT já foi realizado em diversas pesquisas no intuito de se buscar mutações e ou outras alterações genéticas além do rearranjo LINE/MYC que pudessem contribuir para o melhor entendimento deste tumor. Foi realizado o sequenciamento do gene MYC no cão, do elemento LINE normalmente encontrado no genoma do cão clinicamente sadio e do elemento LINE-1 encontrado no TVT sem evidenciação de qualquer correlação entre eles ou outros genes.

As pesquisas abordam métodos moleculares de forma isolada, como o sequenciamento do gene MYC e do elemento de transposição LINE e de sua junção LINE/MYC. Por outro lado, ainda não houve a preocupação em correlacionar esses achados moleculares com o grau de agressividade do tumor levando-se em consideração sua morfologia e critérios de malignidades.

A detecção molecular do elemento LINE-1 inserido no gene c-MYC encontrada nas células neoplásicas supostamente associa-se a mau prognóstico. Porém, a relevância quanto à identificação desse rearranjo correlacionada com o prognóstico em TVT espontâneo no cão é desconhecida, visto que não se tem conhecimentos de que estudos foram realizados.

Dentre os métodos moleculares a PCR é útil e valiosa para detecção de mutações ou rearranjos em células neoplásicas. No caso do TVT, necessita-se de estudo mais aprofundado por não se conhecer a etiologia, a controvérsia existente sobre sua origem celular e pela sua alta incidência no Hospital Veterinário da Unesp de Botucatu.

Portanto, o objetivo do trabalho é fazer uma observação dos critérios de malignidade pela técnica de Papanicolaou nos dois grupos citomorfológicos linfocitóide e plasmocitóide, verificar se há diferença entre eles na detecção do

rearranjo LINE-1/c-MYC utilizando a PCR e o sequenciamento genético dos mesmos em busca de mutações ou outras alterações genéticas.

2. Revisão de literatura

2.1. Tumor Venéreo Transmissível

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) é uma neoplasia que em condições naturais se desenvolve no cão (NIELSEN e KENNEDY, 1990; HARMELIN et al., 2001; ALBANESE et al., 2002; MUKARATIRWA e GRUYS, 2003; LEFEBVRE et al., 2007) ou pode ser induzido experimentalmente em ratos (OTOMO et al., 1981; HARMELIN et al., 2001; HARMELIN et al., 2002).

A neoplasia é de fácil transplantação conforme o primeiro relato de Novinsky (1876) até 1898, quando Smith e Washbourn também comprovaram a capacidade de transmissão de um animal para outro, apresentando a lesão (apud ROGERS, 1997; DAS e DAS, 2000; PAPAZOGLU et al., 2001; HASLER e WEBER, 2000; HARMELIN et al., 2002).

O TVT se desenvolve na genitália como local primário de implantação (DAS e DAS, 2000; HASLER e WEBER, 2000) Além da localização genital, o TVT pode ter também localização extragenital, pelo hábito social de lamber ou de farejar a genitália externa permitindo a implantação de células neoplásicas e o seu crescimento em sítios extragenitais (DAS e DAS 2000; PEREIRA et al., 2000; RODRIGUES et al., 2001; ALBANESE et al., 2002).

No Brasil, a frequência do TVT é bastante elevada. No entanto, existem poucos trabalhos mostrando sua incidência. Nos países com grande população de cães errantes, o TVT de ocorrência espontânea geralmente se desenvolve no pênis, prepúcio em machos e na vagina nas fêmeas (OTOMO et al., 1981; ROGERS et al., 1998; DAS E DAS, 2000; BRANDÃO et al., 2002; HASLER E WEBER, 2000; PEREIRA et al., 2000; PAPAZOGLU et al., 2001; RODRIGUES et al., 2001; ALBANESE et al., 2002).

Quanto a dados epidemiológicos é difícil estabelecer estatística visto que há relatos na literatura de que cães só eram encaminhados para o veterinário

quando estes apresentavam sinais físicos da neoplasia ou até mesmo mudança de seu temperamento (SOUSA et al., 2000).

Apesar da origem do tumor ser incerta (MacEWEN, 2001; CATONE et al., 2003), atualmente estudos verificaram tendência histiocítica do tumor (RODRIGUES et al., 2001; CANGUL, 2001; MURGIA et al., 2006; DINGLI e NOWAK, 2006; VONHOLDT e OSTRANDER, 2006).

Esse tumor, quanto a morfologia é classificado como uma neoplasia de células redondas (DAS e DAS, 2000; FERREIRA et al., 2000; AMARAL et al., 2004) apresentando característica macroscópica distinta de outras neoplasias. Comumente, o tumor é friável a palpação se apresentando na forma de pequenos nódulos menores que 1 cm de diâmetro até grandes massas, de aspectos multilobuladas, em forma de couve-flor ou até mesmo pedunculada com 10 cm de diâmetro. (COHEN, 1985; DAS e DAS, 2000; GOLDSCHMIDT e HENDRIX, 2002; GROSS et al., 2005).

Em se tratando de diagnóstico, no Serviço de Patologia do Hospital Veterinário – Unesp, Campus de Botucatu – SP, é a segunda neoplasia de maior incidência em cães, perdendo apenas para o tumor de mama merecendo atenção especial por parte dos patologistas como também, dos oncologistas clínicos e cirurgiões (HATAKA, 2003; AMARAL et al., 2004; ANDRADE, 2008). Em estudo retrospectivo realizado entre os anos de 2002 a 2006 observou-se média de seis novos casos por mês (AMARAL et al., 2006).

2.2. Diagnóstico Citopatológico

O exame citológico é o método tradicional de coleta de amostras de células para investigação científica e para o diagnóstico, por ser técnica simples, menos invasiva e indolor, realizada com rapidez e baixo custo, produzindo menos distorção da morfologia celular (MILLER et al., 1990; KROGER et al., 1991; ERUNAL-MARAL et al., 2000; BATISTA et al., 2007; COWELL e TYLER, 2008). Sua eficácia para o diagnóstico de neoplasias ou lesões inflamatórias é de 90% entre elas, o TVT (ROCHA, 1998a; ROCHA, 1998b; GREATTI et al., 2004).

Dos 127 casos de TVT relatados por Brandão et al. (2002), 94,6% foram diagnosticados por exame citológico. Mais tarde, Amaral et al. (2004), no período de 1994 a 2003, de 3369 casos de neoplasias diagnosticados por citologia, 576 animais apresentaram tumor venéreo transmissível.

Diferenças podem existir quanto à expressão morfológica, influenciando o comportamento biológico (MOHANTY e RAJYA, 1997; ROGERS et al., 1998; VARASCHIN et al., 2001). Entre essas diferenças pode-se citar a ausência de vacúolos citoplasmáticos (ROGERS, 1997) e a presença de células maiores e ovóides em relação à morfologia típica das células de TVT que apresentam alta relação núcleo:citoplasma, núcleo com cromatina frouxa, um ou dois nucléolos evidentes e figuras de mitoses (BOSCOS et al., 1999). Varaschin et al. (2001) registraram que tumores malignos apresentaram citoplasma abundante.

Desde a implantação do exame citológico como método de diagnóstico de lesões inflamatórias e neoplásicas na rotina do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu (ROCHA, 2003), vêm-se observando que nas amostras de células do TVT há diferenças marcantes quanto à expressão morfológica dessas células pela aplicação de sinalizadores de proliferação celular que parecem ter relação com a agressividade do tumor (GREATTI et al., 2004; ROCHA et al., 2008).

Meinkoth e Cowell (2002) demonstraram a existência de dois tipos morfológicos distintos em amostras citológicas de TVT. Com base nesse estudo, foi verificada a existência de dois tipos citomorfológicos semelhantes que foram chamados de TVT de grupo plasmocitóide e linfocitóide, de acordo com a morfologia do tipo celular predominante e o grau de agressividade (AMARAL, 2005; BASSANI-SILVA, 2005; GASPAR, 2005). Para facilitar o diagnóstico e a classificação dos grupos citomorfológicos estabelecidos no Serviço de Patologia desta instituição proposta por AMARAL (2005).

Foi padronizado que o TVT linfocitóide apresenta uma contagem de células acima de 60%, onde encontra-se morfologia arredondada, citoplasma escasso e finamente granular, com presença de vacúolos que acompanham a periferia da célula, núcleo central com cromatina grosseira e presença de um ou dois nucléolos evidentes. O grupo plasmocitóide apresenta contagem de

células acima de 60% como morfologia ovóide, citoplasma mais abundante (menor relação núcleo:citoplasma), com núcleo localizado excentricamente.

Para verificar se havia relação quanto ao aspecto morfológico e a agressividade do tumor, Amaral (2005) realizou o teste do cometa, que se presta para identificar o grau de lesão no DNA de células neoplásicas e que até o presente não foi aplicado ao TVT. O resultado desse trabalho demonstrou que o grupo plasmocitóide apresentou quantidade de danos no DNA significativamente maior que nas células do grupo linfocitóide.

Essa diferença parece ter relação direta com o grau de agressividade do tumor no que diz respeito ao tamanho, localização, bem como, capacidade de metastatizar do tumor (AMARAL, 2005; BASSANI-SILVA, 2005; GASPAR, 2005).

2.3. Gene c-MYC

Os genes que participam da formação de tumores são os mesmos que nas células normais estão envolvidos com o controle do ciclo celular, reparação do DNA e apoptose. O efeito cancerígeno somente se manifesta quando estes genes estão alterados. Dessa forma, codificam proteínas que promovem a perda do controle assumindo um caráter dominante (LOPES et al., 2002), desencadeando por meio de alterações genéticas como translocações e inversões, deleções, amplificações, mutações puntiformes e inserção de DNA viral (FERREIRA e ROCHA, 2004; MIR et al., 2004).

O proto-oncogene c-MYC está envolvido na regulação de outros genes para que estes desenvolvam e atuem em suas funções tais como, proliferação e apoptose. Porém, quando mutado, acredita-se que este possua papel distinto no processo da carcinogênese codificando proteínas que promovem a perda do controle sobre o ciclo mitótico onde células normais tornam-se cancerosas assumindo um caráter dominante resultado de mutações somáticas. (LITTLEWOOD e EVAN, 1990; DANG, 1999; ADACHI et al., 2001; GARTEL et al., 2003; MIR et al., 2004).

O gene *c-MYC* no câncer foi inicialmente descrito por Peyton Rous em 1911 quando evidenciou que um sarcoma típico de aves poderia ser transmitido através de extratos tumorais não celulares, sugerindo que vírus poderiam ser possíveis agentes etiológicos dessas neoplasias. Em seguida, Varmus e Bishop em 1989 e Sheiness e Bishop em 1991, estudando um subgrupo de retrovírus causador da mielocitomatose em aves, identificaram o oncogene *v-MYC* (de viral avian myelocytomatosis). Subsequentemente, o gene *c-MYC* (de cell) foi identificado como o homólogo celular desse oncogene retroviral, sendo sua superexpressão demonstrada em vários tumores humanos e animais (FARIA e RABENHORST, 2006).

Sabe-se que o gene *c-MYC* encontra-se localizado na região cromossômica 8q24.1, no homem compreendendo três éxons, cujo produto consiste em fosfoproteínas nucleares altamente conservadas. As descobertas acerca deste gene reforçam sua atuação como modulador da transcrição gênica e sua participação em outros mecanismos potencialmente relevantes no processo tumorigênico. A identificação dos numerosos alvos gênicos do *c-MYC*, assim como a compreensão de suas complexas vias regulatórias configuram o desafio final na busca de sua completa elucidação acarretando o importante avanço nos campos diagnóstico, prognóstico e terapêutico para a oncologia. (FARIA e RABENHORST, 2006).

Como oncogene, o *c-MYC* possui papel distinto no processo de carcinogênese. Ele parece manifestar função sutil como regulador do ciclo celular. (LITTLEWOOD e EVAN, 1990; DANG, 1999; ADACHI et al., 2001; GARTEL et al., 2003; MIR et al., 2004).

A atividade do *c-MYC* é regulada por sinais externos (fatores de crescimento) e internos (ativação do ciclo celular) dos quais células diferenciadas expressam baixos níveis de *c-MYC*, mas transcrevem potencialmente essa proteína quando estimuladas. A ativação inadequada desse gene acarreta o desenvolvimento de neoplasias por meio de translocação cromossômica (justaposição) ou amplificação gênica (aumento do número de cópias do *c-MYC*).

Esse gene é importante não somente na diferenciação celular, mas também na indução da apoptose e serve como prognóstico de neoplasias, bem como na expressão a padrões de resposta a drogas antineoplásicas específicas. Quando há sua desregulação, também promove a produção de radicais livres pelas mitocôndrias, acarretando danos ao DNA e instabilidade genômica (ADACHI et al., 2001; GOLIJOW et al., 2001; FARIA e RABENHORST, 2006; KUTLER, 2006).

2.4. Elemento de transposição LINE-1

Os elementos de transposição representam aproximadamente 40% do genoma do homem e são sequências de DNA que podem se mover no genoma sendo a principal fonte de mutações espontâneas. Também podem causar efeitos deletérios em organismos, como por exemplo, em várias doenças humanas (KASS, 1999; BOGERD et al., 2006; GARCIA-PEREZ et al., 2007).

O grande número desses elementos, no genoma, propicia ampla oportunidade para recombinação homóloga desigual, ocasionando deleções ou duplicações gênicas e mesmo alterações mais complexas do material genético. (CARARETO et al., 2001).

Os genomas dos mamíferos são caracterizados por grande número dessas sequências LINE repetitivas (Long Interspersed Elements) que são altamente variáveis de espécie para a outra. Sequências repetitivas de camundongos, por exemplo, são diferentes das sequências humanas (BENTOLILA et al., 1999).

Os LINE's são derivados pela RNA polimerase II, têm comprimento de 6,0kb até 9,0kb, e compreendem a região da extremidade 5' não traduzida e uma cauda poli(A) (CHEN et al., 2005).

O LINE-1 constitui a maior família de elementos de transposição independentes nos mamíferos (CHOI et al., 1999; BOISSINOT et al., 2001; THORNBURG et al., 2006) podendo adquirir funções específicas, como o controle da tradução de proteínas e transcrição de genes. Segundo CHOI et al.

(1999), o LINE-1 se insere no gene causando doenças malignas como é o caso do TVT nos cães (KATZIR et al., 1985; KATZIR et al., 1987; CHOI et al., 1999).

Um aspecto importante a ser considerado é o conceito de fase de leitura (reading frame). Esta fase de leitura corresponde a cada três maneiras de agrupar códons em sequências de DNA ou RNA. Sendo assim, fase aberta de leitura (open reading frame ou ORF) é sequência de códons que começa em códon de iniciação e tem número múltiplo de três de bases. Como consequência, uma ORF é completamente mapeada em códons sem que sobre nenhuma base ao final da sequência (SCHNEIDER e PEREIRA, 2006).

Esse elemento transponível codifica para duas proteínas, ORF1p e ORF2p, que são requeridas para o evento de transposição. Os eventos refletem 0,2% de todas as mutações humanas espontâneas (BOGERD et al., 2006). Enquanto, a ORF1 codifica uma proteína ligada ao RNA não específico, a ORF2 codifica uma proteína com atividades de endonuclease (L1 EN) e transcriptase reversa (L1 RT). Ambas são cruciais para a transposição ativa (CHEN et al., 2005; GARCIA-PEREZ et al., 2007).

A transposição ou retrotransposição pode, entretanto, alterar a estrutura primária do genoma em uma variedade de outros caminhos além da simples inserção. Os elementos LINE-1 podem se mobilizar para regiões flangeadoras por um processo denominado transdução mediada por L1. Podem até mesmo ser capazes de mover introns, sequências de DNA genômicos distantes através de RNA intermediários emendados, para novas localizações genômicas (CHEN et al., 2005).

Células de TVT têm a sequência do LINE-1 truncada para a região da 5' extremidade para o primeiro éxon do oncogene c-MYC. Porém, a estrutura genética do LINE-1 e a relação molecular entre o LINE-1 canino e o elemento LINE-1 inserido no rearranjo c-MYC do TVT é pouco conhecida (AMARIGLIO et al., 1991; LIAO et al., 2003).

2.5. Especificidade do rearranjo LINE-1/c-MYC no TVT

No TVT encontrou-se o oncogene c-MYC rearranjado pela inserção do elemento longo de transposição LINE-1 na região da extremidade 5' para o primeiro éxon. Por meio das técnicas de Biologia Molecular, essa junção foi verificada em todas as amostras testadas desse tumor, porém não verificado em amostras de DNA de cães normais (KATZIR et al., 1985; KATZIR et al., 1987; AMARIGLIO et al., 1991; CHOI et al., 1999; HASLER e WEBER, 2000; CANGUL, 2001; MUKARATIRWA e GRUYS, 2003; MURGIA et al., 2006; PARK et al., 2006; ROSS, 2006;). A especificidade desta alteração genética no TVT é demonstrada por Chu et al. (2001) que testaram por meio da PCR a amplificação deste segmento de DNA específico em outros tumores, epiteliais e mesenquimais, constatando a ausência deste rearranjo.

Murgia et al. (2006) verificaram o rearranjo LINE-1/c-MYC em amostras de TVT obtidas dos cinco continentes da seguinte forma: pela técnica da PCR em DNA genômico e mitocondrial, além de antígenos de histocompatibilidade. Os autores apontam a monoclonalidade para a célula do TVT visto que, todas expressaram o rearranjo LINE-1/c-MYC. De extrema importância citar que no referido trabalho, as células somáticas do cão apresentam o gene DLA classe II, o mesmo acontecendo com as células de TVT. Por outro lado, o referido rearranjo somente está presente na célula do TVT.

Esse rearranjo foi demonstrado em todos os tumores testados e a integração do mesmo LINE foi encontrada exatamente na mesma região do c-MYC indicando que os genes rearranjados não são apenas semelhantes, mas idênticos, sugerindo a origem de uma única célula tumoral. Em apenas alguns casos, a integração do LINE ocorreu em uma área limitada, mas não no mesmo nucleotídeo (AMARIGLIO et al., 1991).

Segundo Liao et al. (2003), o fragmento LINE-1/c-MYC amplifica um segmento de aproximadamente 550pb. No entanto, o tamanho da amplificação pode variar de acordo com Spin et al. (2008) que encontraram esse segmento de DNA amplificado em cerca de 340pb.

A sequência do LINE-1 possui 1,378pb flanqueado por 10pb em repetição direta *upstream* para o gene *c-MYC*, entretanto, os produtos da PCR utilizando oligonucleotídeos específicos variaram em comprimento neste estudo, talvez pelo fato da escolha da sequência iniciadora utilizada (LIAO et al., 2003). Já Choi et al. (1999), que analisaram a sequência homóloga com a proteína ORF2 canina responsável direta pelo evento de transposição, sugeriram que o TVT-LINE continha 461pb de comprimento homólogo a fita complementar do LINE-1 canino e é acompanhado por uma deleção de 5pb. A sequência do DNA do TVT-LINE mostrou neste estudo 98% de homologia para o LINE-1 canino quando comparado a sequências já depositadas em banco de dados (GenBank).

Em relação ao gene *c-MYC* rearranjado, a possibilidade de que ele seja previamente um alelo polimórfico nos animais examinados foi eliminada pela ausência deste rearranjo em células sanguíneas de animais afetados pelo tumor (AMARIGLIO et al., 1991). Segundo Choi et al. (1999) e Choi et al. (2002), a mutação do gene *p53* é um potente regulador da expressão endógena do *c-MYC* e por esta razão ele seja uma das possíveis causas de doenças em humanos. Entretanto, são necessários mais estudos a respeito, pois a especificidade dessa alteração genética é indiscutível para a tumorigênese da doença TVT, porém ainda não foi demonstrado que essa alteração seja a causa primária e única dessa neoplasia.

2.6. Biologia Molecular e suas aplicações na clínica

Os eventos básicos da carcinogênese são conhecidos em nível molecular. Estes resultam da agressão ao genoma da célula, com alterações do DNA, que são mutações ou expressão anômala de genes normais. Tais alterações levam à ativação ou inativação de genes que coordenam funções essenciais da célula, como marcadores de proliferação, diferenciação, morte por apoptose e estabilidade do genoma. O acúmulo de mutações nesses genes críticos leva à perda da homeostase e o aparecimento do fenótipo celular maligno (COSTA e MENCK, 2004; BASSANI-SILVA, 2008).

A Biologia Molecular oferece várias ferramentas para o diagnóstico e monitoramento do câncer. Existem claras evidências de que a ocorrência de alterações em determinados genes poderá modificar radicalmente o curso natural de uma neoplasia, levando a diferenças significativas no prognóstico do paciente e seus índices de resposta à terapêutica instituída. No momento atual, procura-se identificar genes individuais com importância específica para cada tumor e sua influência sobre o seu comportamento biológico (PINHO, 2001; MIR et al., 2004). Pinho (2006) acredita no grande potencial da Biologia Molecular para a realização de pesquisas na área médica tendo em vista a sua grande relevância clínica e epidemiológica para o diagnóstico e monitoramento é útil em número bastante amplo de doenças, entre elas, o TVT (CANGUL, 2001; PARK et al., 2006).

A existência de marcadores de alta especificidade deve-se, principalmente, ao fato de que foram encontradas, em diferentes tumores, alterações características como presença de mutações, presença aumentada de produtos transcritos e/ou proteínas decorrentes da atividade desregulada de genes (KATZIR et al., 1987; AMARIGLIO et al., 1991; LIAO et al., 2003; FERREIRA e ROCHA, 2004; MOLINA e TOBO, 2004).

Metodologias de genética molecular foram desenvolvidas possibilitando a difusão de métodos na maioria das vezes simples e rápidos para a detecção de mutações. O principal método desenvolvido foi a técnica da PCR criada em 1985 por Kary Mullis, tornando-se, em período curto de tempo a técnica mais utilizada em laboratórios de Genética e Biologia Molecular, podendo-se obter grande quantidade de DNA de gene específico, e utilizá-la na busca de mutações por sequenciamento de DNA (MESQUITA et al., 2001; NAOUM, 2001; CECCATO-ANTONINI et al., 2004; MOLINA e TOBO, 2004).

A técnica da PCR baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Ocorre a desnaturação, anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (*primers*) delimitando a sequência alvo da amplificação que, por vários ciclos, produzem milhões de vezes a quantidade

inicial da mesma. Essa produção de amplificação em escala permite iniciar com quantidades mínimas de DNA e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de sequência específica de interesse (SILVA e ANDRADE, 2001; CECCATO-ANTONINI et al., 2004; MOLINA e TOBO, 2004).

Ceccato-Antonini et al. (2004) acreditam que a facilidade, a rapidez e a sensibilidade da PCR a tornam particularmente a reação poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de cópias de um segmento de DNA em qualquer organismo vivo.

Quanto ao diagnóstico molecular do TVT, autores utilizaram várias técnicas como o *Western immunoblotting*, *Southern blotting* e a PCR padrão para detecção do rearranjo genético específico do tumor denominado LINE-1/c-MYC. Todos esses autores foram unânimes em reafirmar sua especificidade para o TVT (KATZIR et al., 1985; AMARIGLIO et al., 1991; CHU et al., 2001).

2.7. Sequenciamento Nucleotídico

Até meados da década de 70 não era nada simples obter uma sequência de DNA, fosse ele fita simples ou dupla. No início da década de 80 uma técnica relativamente rápida de sequenciamento de DNA foi desenvolvida, que empregava a quebra de uma cadeia de DNA com diferentes produtos químicos e a visualização dos fragmentos gerados por eletroforese desenvolvido por SANGER et al., (1979). Havia necessidade de se fazer a marcação radioativa das moléculas porque a quantidade de material produzida era muito pequena e não podia ser detectada de outra forma. Mesmo com todas essas dificuldades houve então um rápido progresso no conhecimento de sequências de DNA. Um novo avanço tecnológico foi alcançado pela introdução da técnica de interrupção da sequência pela incorporação aleatória de um nucleotídeo modificado, sem a hidroxila na posição 3', que ficou conhecida como técnica de didesoxi ou dideoxi. Eventualmente, o sequenciamento manual ainda é feito, mas é muito mais trabalhoso, caro e arriscado, pois emprega substâncias radioativas. (BAUER et al., 1994; SAMBROOK et al., 2001).

O sequenciamento é a identificação das bases que compõem uma molécula de DNA efetuada por meio de técnica denominada eletroforese em gel. Através da replicação controlada, são gerados separadamente para cada base todos os fragmentos possíveis que terminam com aquela base. No decurso de várias horas, os fragmentos de DNA ficam espalhados ao longo do bloco de gel fino de acordo com o tamanho formando uma escada de faixas discretas, cada uma composta por uma coleção de moléculas de DNA de comprimento idêntico (SAMBROOK et al., 2001; SCHNEIDER e PEREIRA, 2006).

O método pode ser automatizado através de equipamentos apropriados gerenciados por computadores com *softwares* que leem sequencialmente e identificam os produtos. Isto permite executar o processo em grande escala. Neste caso, utilizam-se simultaneamente os 4 didesoxinucleotídeos terminadores (ddNTPs) marcados por fluorescência. Como cada reação (A, T, G, C) utiliza um fluorocromo diferente, os produtos podem ser reunidos e a eletroforese desses realizada em um único canal do gel de sequenciamento (AKOPYANZ et al., 1992).

O sinal fluorescente diferencial emitido por cada fragmento, após iluminação com um feixe de laser, identificará os produtos baseado na diferença de comprimento de onda. A luz emitida é detectada por escaneamento do gel e a sequência deduzida por computador. Variáveis mais modernas, conseqüentemente mais rápidas e eficazes, incluem a robotização total do processo com a inclusão das etapas de purificação e da reação de síntese da cadeia do DNA (AKOPYANZ et al., 1992; SILVA e ANDRADE, 2001).

A técnica utilizada pelos sequenciadores modernos utiliza o mesmo princípio da eletroforese em gel, mas com algumas diferenças importantes. A primeira é que os fragmentos são depositados em um único bloco para cada base. A visualização dos resultados é feita por um eletroferograma gerado pelo sequenciador apresentando quatro gráficos coloridos, cada um correspondendo a uma das quatro bases. Quando uma base é identificada em dada posição do fragmento, o gráfico daquela base apresentará um pico na

posição correspondente. Assim a identificação no eletroferograma da sequência de picos e suas respectivas cores revelam a sequência de bases do fragmento sequenciado (SCHNEIDER e PEREIRA, 2006).

Esta revisão de literatura abordando os itens supracitados é de extrema importância para o melhor entendimento do Tumor Venéreo Transmissível Espontâneo Canino e as metodologias aplicadas neste trabalho.

**TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A INSERÇÃO DO
TRANSPONSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE.**

Trabalho submetido para a Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.

ISSN 0035-0389

Normas para a publicação disponíveis em anexo.

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO

ARTIGO CIENTÍFICO

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A INSERÇÃO DO TRANSPOSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE.

TUMOR TRANSMISSIBLE VENEREAL DISEASE SPONTANEOUS CANINE: THE INSERTION OF TRANSPOSON LINE-1 IN GENE C-MYC AND THE CRITERIA OF MALIGNANCY.

Luciano Santos da Fonseca^{1*}; Lígia Souza Lima Silveira da Mota²; Sandra Bassani Silva³; Cláudia Valéria Seullner Brandão⁴ Noeme Sousa Rocha⁵

1. Mestrando na área de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Campus de Botucatu, Brasil
2. Professora Assistente Doutora do Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Unesp, Campus de Botucatu, Brasil
3. Doutora na área de Clínica Veterinária pela Unesp, veterinária autônoma, Campus de Botucatu, Brasil
4. Professora Assistente Doutora do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Campus de Botucatu, Brasil
5. Professora Livre-docente do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Campus de Botucatu, Brasil

Este trabalho foi realizado nas dependências do Ambulatório de Cirurgia de Pequenos Animais, Laboratório de Patologia, Laboratório de Biologia Molecular Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e Instituto de Biociências, Campus de Botucatu – SP - Brasil.

Apoio: CNPq

Correspondência
Luciano Santos da Fonseca
Telefone/fax: (14) 3811 6293
Lucianofonseca76@gmail.com

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A INSERÇÃO DO TRANSPOSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE.

RESUMO

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) é a segunda neoplasia mais frequentemente diagnosticada em cães no Serviço de Patologia de Botucatu. Este trabalho teve por objetivo identificar os critérios citopatológicos de malignidade pela técnica de Papanicolaou e detectar nas células do TVT espontâneo canino o elemento de transposição LINE-1 inserido no gene *c-MYC* como alteração genética específica por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e do sequenciamento genético nos grupos linfocitóide e plasmocitóide verificando se há diferença entre os achados morfológicos e moleculares. Para tal, foram utilizados 35 animais sendo 77% sem raça definida (SRD) que apresentavam TVT localizado, na maioria dos casos, nos órgãos genitais. Com a coloração de Papanicolaou, os critérios de malignidade nucleares comuns para ambos os grupos observados foram, espessamento da membrana nuclear, ranhura nuclear, nucléolo angular e halo perinucleolar. A região amplificada correspondente ao rearranjo apresentou um produto de 340pb em 100% das amostras analisadas. O sequenciamento genético confirmou a presença do rearranjo LINE-1/*c-MYC* e o grau de identidade entre as sequências obtidas e as já depositadas em banco de dados (GenBank) variou de 94 a 96%. Concluiu-se que o emprego da coloração com Papanicolaou constituiu grande contribuição não apenas para o diagnóstico citológico do TVT, como também, uma ferramenta valiosa para evidênciação de critérios de malignidade que normalmente não são visualizados quando se utiliza corantes tipo Romanowsky e que a especificidade da alteração genética LINE-1/*c-MYC* em relação ao TVT é indiscutível quanto a sua monoclonalidade. Em futuras investigações, este estudo poderá servir de esteio para correlacionar morfologia, critérios de malignidade e estudos moleculares ainda não realizados em conjunto para o TVT.

Palavras-Chave: cão – TVT - citologia – *c-MYC* – LINE-1

TUMOR TRANSMISSIBLE VENEREAL DISEASE SPONTANEOUS CANINE: THE INSERTION OF TRANSPOSON LINE-1 IN GENE C-MYC AND THE CRITERIA OF MALIGNANCY.

SUMMARY

The Tumor Transmissible Venereal disease (TVT) is the second neoplasia more frequent diagnosed in dogs in the Service of Pathology of Botucatu. This work had for objective to identify the cytopathologic criteria of malignance for the technique of Papanicolaou and to detect in the cells of the canine spontaneous TVT the element of inserted transposition LINE-1 in the gene c-MYC as specific genetic alteration by means of the Reaction in Chain of Polymerase (PCR) and the genetic sequencing in the groups linfocitoide and plasmocitoide verifying if it has difference between the morphologic and molecular findings. For such, 35 animals being 77% without definite race had been used (SRD) that they presented located TVT, in the majority of the cases, in the agency genital. With the Papanicolaou stain, the common nuclear criteria of malignance for both the observed groups had been, thickening of the nuclear membrane, angular nuclear groove, nucleoli and haloperinucleoli. The region amplified corresponding to the rearrangement presented a product of 340pb in 100% of the analyzed samples. The genetic sequencing confirmed the presence of the LINE-1/c-MYC rearrangement and the degree of identity between the gotten sequences and already deposited in data base (GenBank) varied of 94 96%. It was concluded that the job of the Papanicolaou staining not only constituted great contribution for the cytological diagnosis of the TVT, as well as, a valuable tool for evidencing of malignance criteria that are normally not visualized when Romanowsky type is used stains and that the specific of the genetic alteration LINE-1/c-MYC in relation to the TVT is unquestionable how much its monoclonal. In future inquiries, this study it will be able to serve to correlate morphology, criteria of malignance and molecular studies not yet carried through in set for the TVT.

Keywords: dog – TVT - cytology – c-MYC – LINE-1

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A INSERÇÃO DO TRANSPOSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE.

INTRODUÇÃO

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) é a segunda neoplasia mais frequentemente diagnosticada em cães no Hospital Veterinário de Botucatu, São Paulo, perdendo apenas para os tumores de mama em cadelas (Hataka, 2003; Amaral, 2004).

As células do TVT canino espontâneo se implantam e se desenvolvem na mucosa da genitália e em outras mucosas, pela quebra de suas integridades (Nielsen e Kennedy, 1990; Harmelin et al., 2001; Papazoglou et al., 2001; Rivera et al., 2005).

A avaliação citológica tornou-se uma técnica diagnóstica extremamente útil para a confirmação das suspeitas de TVT, não só pela sua eficácia que varia de 90 a 96%, mas também por ser simples, barata, de fácil aplicação na rotina, causando menos distorção da morfologia celular (Miller et al., 1990; Kroger et al., 1991; Rocha, 1998; Erünl-Maral et al., 2000; Cowell e Tyler, 2008).

Encontram-se na literatura trabalhos que mostram diferentes formas quanto a expressão morfológica influenciando o comportamento biológico do tumor (Mohanty e Rajya, 1977; Rogers et al., 1998; Varaschin et al., 2001) e para isto são preconizados critérios de malignidade comuns e menos frequentes em neoplasias. Os critérios de malignidade gerais incluem hiper celularidade, anisocitose e pleomorfismo. Quanto aos critérios nucleares cita-se macrocariose, aumento da relação núcleo:citoplasma, anisocariose, multinucleação, mitoses anormais, padrão de cromatina, amoldamento nuclear, dentre outros. Para os critérios citoplasmáticos, vacuolização citoplasmática, espessamento da membrana e basofilia (Raskin e Meyer, 2003; Cowell e Tyler, 2008). Hoje se tem conhecimento da existência de dois grupos morfológicos denominados plasmocitóide e linfocitóide (Amaral, 2005).

Para o diagnóstico e evidênciação de critérios de malignidade trabalhos indicam que corantes do tipo Romanowsky (Giemsa) são mais adequados pelas reações químicas que produzem nas células quando dissolvidos em álcool metílico (Cowell e Tyler, 2008; Magalhães et al., 2001; Meuten, 2008).

Em contrapartida, a coloração de Papanicolaou é extremamente valiosa porque acentua grandes variações quanto à morfologia celular, os vários graus de maturidade celular e a atividade metabólica das células. As principais vantagens desta coloração são a definição detalhada dos critérios nucleares, transparência citoplasmática e diferenciação celular eficaz para evidenciar tais alterações nas células neoplásicas (Papanicolaou, 1932; Jörundsson et al., 1999; Magalhães et al., 2001; Cowell e Tyler, 2008; Meuten, 2008).

O TVT difere de células somáticas do cão e se caracteriza por ser uma das neoplasias mais antigas e em contínua propagação entre hospedeiros. Acredita-se que tenha surgido entre 200 e 2.500 anos atrás. Apesar disso, sua origem permanece incerta (Macewen, 2001; Catone et al., 2003; Dingli e Nowak, 2006; Murgia et al., 2006; Vonholdt e Ostrander, 2006).

O número somático normal do cão é de 78 cromossomos, sendo todos os autossomos de morfologia acrocêntrica. Nos estudos de citogenética clássica, observa-se que as células do TVT exibem entre 57 a 59 cromossomos, sendo vários deles de morfologia submetacêntrica ou metacêntrica (Cohen, 1978; Cohen, 1985; Vermooten, 1987; Rogers, 1997; Hasler e Weber, 2000; Macewen, 2001). Esses rearranjos podem ser decorrentes de fusões, sem que haja perda ou ganho de material genético (Hahn, 1998). Esta é uma explicação para a diferença no número de cromossomos da célula somática normal do cão e a célula do TVT.

Dentre as alterações moleculares mais frequentes encontradas no TVT destaca-se o rearranjo do proto-oncogene *c-MYC*, resultante da inserção do segmento de DNA repetitivo de 1,5 Kb pertencente à família dos elementos genéticos de transposição, conhecidos como LINE (*Long Interspersed Element*) (Katzir et al., 1987; Amariglio et al., 1991; Chu et al., 2001; Choi et al., 2002).

Análises moleculares de TVT revelaram a inserção destes segmentos nas mediações do proto-oncogene *c-MYC*, não ocorrendo em células normais de cães (Katzir et al., 1985; Amariglio et al., 1991; Choi et al., 1999; Chu et al., 2002). As aberrações cromossômicas constantes e específicas do TVT, como o rearranjo da sequência LINE-1/*c-MYC*, é idêntica a esse tumor confirmando a sua monoclonalidade (Amariglio et al., 1991; Mukaratirwa et al., 2003; Murgia et al., 2006; Vonholdt et al., 2006).

Este trabalho teve por objetivo identificar os critérios citopatológicos de malignidade pela técnica de Papanicolaou e detectar nas células do TVT espontâneo canino o elemento de transposição LINE-1 inserido no gene *c-MYC* como alteração genética específica por meio da PCR e do sequenciamento genético nos grupos classificados como linfocitóide e plasmocitóide verificando se há diferença entre os achados morfológicos e moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal e com o consentimento livre e esclarecido dos proprietários, foram utilizados 35 cães sem restrição de

sexo, raça ou idade, provenientes do Hospital Veterinário, FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu, Brasil entre o período de agosto de 2006 a outubro de 2008.

Estes animais tiveram o diagnóstico citopatológico para TVT e as amostras foram então coletadas no ambulatório do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais por meio de esfoliação com escova cervical de Ayra utilizando a coloração de Giemsa e processadas no Serviço de Patologia Veterinária da referida instituição. Desse material escovado, foram utilizadas 6 lâminas histológicas de cada grupo citomorfológico fixadas imediatamente em álcool etílico a 95% de cada amostra para serem coradas com Papanicolaou e montadas em resina Permount para evidênciação dos critérios de malignidade nucleares.

A observação das lâminas histológicas para verificação da celularidade da amostra, padrão de coloração e distribuição das células foi feita microscópio de luz polarizada modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha).

Vale ressaltar que as amostras de TVT apresentam ambos os componentes linfocitóides e plasmocitóides. Desta forma, padronizou-se que o TVT linfocitóide apresenta uma contagem de células acima de 60% com morfologia arredondada, citoplasma escasso e finamente granular, com presença de vacúolos que acompanham a periferia da célula, núcleo central com cromatina grosseira e presença de um ou dois nucléolos evidentes. Para o grupo plasmocitóide, o mesmo deve apresentar contagem de células acima de 60% com morfologia ovóide, citoplasma mais abundante (menor relação núcleo:citoplasma), com núcleo localizado excentricamente.

Foram realizadas as contagens das amostras, sendo duas lâminas para cada amostra por meio do analisador de imagens com auxílio de microscópio de luz polarizada modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), onde eram contados 10 campos aleatórios sempre procurando escolher áreas onde as células se encontravam mais esparsas. Essas células eram marcadas, processadas e digitalizadas pelo programa computacional *Axionvision Software Rel. versão 4.3* (Zeiss Vision, Alemanha) instalado na aparelhagem perfazendo um total de 1.000 células contadas para classificação nos grupos plasmocitóide ou linfocitóide. Após o término da contagem e confirmação da classificação, essas lâminas eram novamente levadas ao microscópio óptico de luz polarizada modelo Axio Imager A1 para observação dos critérios de malignidade mais significantes. Levou-se em consideração tanto critérios gerais como aqueles menos comuns.

A análise molecular procedeu-se no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biociências, Unesp, Campus de Botucatu.

As 35 amostras obtidas pela técnica citológica de esfoliação, foram colocadas em solução tampão fosfato salina (PBS) em criotubo e armazenadas a -20 °C por 9 meses (Hirata et al., 2006). Posteriormente, procedeu-se a extração do DNA genômico por meio do *Kit* Comercial Illustra™ Tissue & Cells GenomicPrep Mini Spin Kit de acordo com as normas do fabricante.

Amostras de 3 mL de sangue total foram colhidas utilizando-se tubo vacutainer (BD, EUA) contendo 7,5 mg de EDTA de 3 cães clinicamente sadios como controle negativo e 4 cães com TVT para os controles positivos. Para a extração do DNA genômico, foi empregado o *Kit* Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit, segundo normas do fabricante.

Para a avaliação da integridade do DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, coradas com brometo de etídeo, visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta no aparelho de fotodocumentação Eagle Eye II Stratagene. A quantificação das amostras foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop® ND -1000 *Spectrophotometer* e a qualidade determinada pela razão das absorbâncias de 260/280nm. Todas as amostras de DNA foram diluídas para uma concentração de 10 ng/μL.

Para detectar a presença do marcador molecular LINE-1/c-MYC utilizou-se os oligonucleotídeos MYC.S 5'ATGCACCAAGATTTTCTTCACTGC 3' (Chu et al., 2001), específico para o éxon 1 do gene MYC e LINE.A 5'ATCCTAGAGAAGAACACAGGCAACAC 3' (Amariglio et al., 1991), específico para o segmento LINE-1. Como controle da reação de amplificação foram utilizados os oligonucleotídeos HBGA.S 5'CGGTATTTGGAGGTCAGCAC 3' e HBGA.A 5'CCCACCACCAAGACCTACTT 3' responsáveis pela amplificação de um segmento de 480pb do gene da hemoglobina humana (Venta et al., 1996).

Cada reação de PCR consistiu de um volume final de 25 μL contendo 10 μM de cada oligonucleotídeo, 4 μL de PCR Master Mix (Promega) e 6 μL de água mili-Q autoclavada e 10ng/μL de DNA. As reações foram realizadas em termociclador PTC-100™ (MJ Research), apresentando desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 minuto, hibridação a 64°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

A análise dos produtos de amplificação foi realizada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo por um período de 1h50m a 100volts. A visualização dos produtos foi feita no Sistema de fotodocumentação Eagle Eye II Stratagene.

Para purificação do produto de PCR, empregou-se o *Kit comercial GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (Amershan Biosciences) segundo normas do fabricante.

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop® ND - 1000 Spectrophotometer*. Do total de amplificações, 3 , sendo 2 amostras do grupo plasmocitóide e 1 do grupo linfocitóide foram seqüenciadas no aparelho de sequenciamento *ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Perking-Elmer)*. As sequencias geradas foram alinhadas e analisadas utilizando os programas *BioEditW versão 7.0.4.1* e *Clustal W Multiple Sequence Alignment Program, v1.7*.

RESULTADOS

A coloração com Giemsa otimizou o diagnóstico citológico tanto para os grupos plasmocitóide (Figura 1) como linfocitóide (Figura 2). Os critérios mais comuns foram observados e pode-se também observar alguns critérios de malignidade nucleares que dificilmente seriam visualizados com essa coloração (Figura 3).

A coloração com Papanicolaou, no entanto, evidenciou os critérios de malignidade nucleares com grande riqueza de detalhes e observados em ambos os grupos citomorfológicos como o espessamento da membrana nuclear, ranhura nuclear, nucléolo angular e halo perinucleolar (Figura 4).

Neste estudo, procurou-se também observar a respeito de dados dos animais quanto a incidência de raça, sexo, idade, localização e tempo de evolução independente dos grupos citomorfológicos quando estas informações estavam disponíveis pelas fichas do prontuário ou por meio de informações obtidas do próprio proprietário. Pode-se constatar que em relação a raça, dos 35 animais estudados, 27 animais eram SRD perfazendo um total de 77%. O restante (23%) eram das mais variadas raças como Cocker (01), Poodle (01), Border Collie (01), Fox Paulistinha (01), Fila Brasileiro (01) e Pastor Belga (01). Quanto ao sexo, 21 animais eram machos e 14 eram fêmeas. A idade dos animais variou entre 2 a 14 anos.

A localização do tumor predominante em machos foi encontrada na base do pênis, bulbo peniano, prepúcio e glândula. Nas fêmeas, o assoalho vaginal foi a área mais freqüente, embora houvessem quatro casos onde o TVT foi diagnosticado em sua forma extragenital (Figuras 5 e 6).

Quanto ao tempo de evolução, a dificuldade em se obter informações dos proprietários dificultou uma análise mais precisa na intenção de aliar tempo de evolução com outros aspectos clínico-epidemiológicos. Mesmo assim, conseguiu-se constatar que dos 35 animais estudados, vinte animais (57%) tinham livre acesso a rua, um animal adquiriu a doença após o cruzamento e um animal vivia em área rural (sítio) com uma grande quantidade de cães.

Pode-se obter algumas informações quanto ao tempo de evolução de alguns animais onde sete animais apresentaram evolução de três meses, um animal apresentou evolução de 6 meses e dos outros vinte e dois animais não foi possível obter tal informação visto que alguns proprietários recolheram tais animais na rua.

Quanto à reação da PCR, não houve amplificação do fragmento de 340 pb em nenhuma amostra de sangue de animais clinicamente sadios (controle negativo) mas houve a amplificação nos controles positivos (Figura 7). Os fragmentos amplificados das amostras de TVT apresentaram aproximadamente 480pb e 340pb referentes ao gene de hemoglobina humana e a região alvo LINE-1/c-MYC, respectivamente (Figura 8). O sequenciamento genético das amostras confirmou a presença do rearranjo LINE-1/c-MYC nos animais com TVT (Figura 9) fato comprovado pelo alinhamento das sequências obtidas com as já depositadas em banco de dados mostrando um grau de identidade de 94 a 96% (Figura 10). Não foi detectada nenhuma outra alteração genética entre os grupos citomorfológicos.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que as células de TVT exibem critérios citológicos indicativos de malignidades. Isto sugere que as células do TVT, assim como as de outras neoplasias exibem variações importantes na forma e volume devido aos seus constituintes, principalmente cromatina nuclear. É importante verificar que por convenção se diz que as células neoplásicas que demonstram esses critérios estão na fase progressiva, isto é, expressa fenotipicamente, característica de instabilidade do genoma. Tais características são conseqüências de uma infinidade de alterações que ocorrem nos genes responsáveis principalmente por fatores de crescimento. Que parece ser fundamental para expansão clonal de células neoplásicas (Lopes et al., 2002; Ruggiero e Bustudabad, 2006; Ojopi e Neto, 2004; Meuten, 2008).

Neste estudo, os critérios de malignidade gerais não fugiram do que é preconizado pela literatura (Mitre et al., 1997; Meinkoth e Cowell, 2002). A anisocariose e anisocitose marcante no TVT plasmocitóide e discreta a moderada no TVT linfocitóide (Albanese et al., 2002; Amaral, 2005). A hiper celularidade, a variação dos padrões de cromatina, nucléolos únicos e múltiplos, ranhura nuclear também foram descritos pela literatura (Raskin e Rebar, 2006). A macrocariose também muito encontrada nessas amostras denota um grau significativo de malignidade principalmente em núcleos maiores que 10µm (Meinkoth e Cowell, 2002).

Algumas características muito frequentemente encontradas como, brotamentos nucleares responsáveis pela formação de micronúcleos (Bindu et al., 2003), espessamento da membrana nuclear e frequentes em tumores da tireóide em humanos (Mckinley, 2004) e a irregularidade da vacuolização citoplasmática, às vezes até ausente (Rogers, 1997) chamam atenção, pois entram em acordo com o que já havia sido proposto por literatura recente (Amaral, 2005).

A utilização da coloração com Papanicolaou foi de fundamental importância para evidenciação dos critérios nucleares que nem sempre são visualizados pelos corantes de Romanowsky (Giemsa), embora se constataste alguns critérios nucleares com essa coloração como, brotamentos nucleares, espessamento da membrana e a ranhura nuclear muito encontrada em tumores de mama (Ozkara et al., 2002). Pode-se constatar variação na quantidade de nucléolos evidentes de um grupo citomorfológico onde segundo pesquisadores, o maior número de nucléolos indica a tendência a tumores mais antigos (Rogers, 1997; Erüna-Maral et al., 2002; Meinkoth e Cowell, 2002, Amaral, 2005).

É importante frisar que sem o emprego associado das duas colorações, Giemsa e Papanicolaou, não seriam possíveis tais evidenciações dos critérios de malignidade citoplasmáticos e nucleares discordando de alguns pesquisadores que relatam que o Papanicolaou não se constitui um método prático para tal, pois, em alguns casos há o inconveniente de se encontrar áreas onde células já se encontravam dessecadas (Magalhães et al., 2001). Fato este não constatado nesse estudo. Outros pesquisadores recomendam a modificação do protocolo desta coloração designada para a citologia exfoliativa (Jörundsson et al., 1999).

Segundo pesquisas realizadas comparando as colorações do tipo Romanowsky e Papanicolaou, à segunda foi considerada a coloração de escolha para a citopatologia veterinária embora a mesma prejudique a avaliação de critérios de malignidade citoplasmáticos ainda que o recomendado fosse a associação de ambas as colorações (Jörundsson et al., 1999).

Para a classificação dos grupos citomorfológicos foram utilizadas não só as particularidades comuns a ambos os grupos como também a padronização da contagem de células em 10 campos aleatórios para verificação do tipo celular predominante (Amaral, 2005). A possibilidade da utilização da técnica de microdissecção a laser para separação de células e seu emprego na análise molecular não pôde ser empregada neste estudo visto que é uma técnica recente, minuciosa e ainda não utilizada para amostras citológicas, pois seu emprego é mais frequentemente utilizado para amostras histológicas como tecidos incluídos

em parafina inviabilizando o seu uso. Além disso, no Brasil há raros microscópios para tal técnica que possui grande potencial para diagnóstico e investigação científica (Ihlaseh et al., 2007).

Foram avaliados 35 animais onde 21 animais eram machos e 14 eram fêmeas. Apesar do maior número de machos, a diferença entre macho e fêmeas foi muito pequena corroborando com achados da literatura que não assumem uma clara predisposição sexual visto que alguns autores encontraram uma maioria absoluta em fêmeas (Sobral et al., 1998) e outros em machos (Varaschin et al., 2001). Neste estudo, optou-se por concordar com os demais pesquisadores que negam qualquer preferência quanto ao sexo dos animais (Cohen, 1985; Das e Das, 2000). As idades variam entre 2 a 14 anos com uma frequência maior de cães acometidos com 4 anos de idade. Esses dados estão de acordo com o descrito na literatura onde animais que apresentam intensa atividade sexual se encontram na faixa etária de três a cinco anos (Sobral et al., 1998; Das e Das, 2000; Amaral et al., 2004). Notou-se realmente a queda na casuística de animais atingidos a partir dos 5 anos de idade.

Quanto à raça, podemos notar que dos 35 animais estudados, 27 animais (77%) eram SRD concordando com os achados da literatura que agrupam esses animais em uma população típica de cães de rua ou por puro descaso do proprietário do animal (Brandão et al., 2002; Amaral, 2005; Lefebvre et al., 2007).

Quanto à localização, o tumor foi detectado, na maioria dos casos, nos órgãos genitais, correspondendo praticamente à maioria absoluta. Apenas quatro casos foram reportados em sítios extragenitais (um na região anal, dois na região cutânea e um caso na córnea). De fato, a localização genital foi mais frequente do que o acometimento cutâneo e nasal (Das e Das, 2000; Martins et al., 2005; Duarte et al., 2006). Com relação aos machos, os locais de maior predileção foram os mesmos citados por outros autores (Nak et al., 2005) como a base do pênis, bulbo peniano e glânde assim como nas fêmeas o assoalho vaginal.

Quanto ao tempo de evolução, não foi possível uma coleta de dados devido à própria desinformação do proprietário que recolheu tais animais na rua. Apenas sete animais apresentaram evolução de três meses (90 dias), cinco animais apresentaram evolução de quatro a sete dias e um animal apresentou evolução de 6 meses. Segundo a literatura, o crescimento tumoral aparece de 15 a 60 dias após a implantação (Duarte et al., 2006). Ainda existe uma grande dificuldade em inferir dados quanto ao tempo de evolução dos casos de TVT devido à falta de informação por parte dos proprietários.

As concentrações de DNA obtidas variaram de 3,9 a 131,8 ng/μL apresentando reações de absorvância de 260/280 nm entre 1,8 a 2,0 indicando assim a pureza das amostras. Os

valores obtidos estão de acordo com os encontrados por autores que trabalharam com TVT. Estes achados não comprometeram as aplicações para a PCR, pois, esta técnica pode ser realizada com ínfimas quantidades de DNA (Pereira et al. 2001) obtendo-se a amplificação do rearranjo LINE-1/c-MYC (Chu et al., 2001; Choi et al., 2002).

A reação de PCR constituiu um método de fácil execução, simples e rápido e de extrema sensibilidade para a detecção do rearranjo (Ceccato-Antonini et al., 2004; Silva e Andrade, 2001; Molina e Tobo, 2004).

A detecção do rearranjo LINE-1/c-MYC amplificou um fragmento de 340pb, diferente de outros trabalhos (Choi et al., 1999; Chu et al., 2001) que obtiveram um fragmento de 550pb. Esse fato pode ser explicado devido à amplificação de diferentes segmentos do gene *c-MYC* contendo a inserção LINE.

Estudos com células de TVT, inclusive o nosso detectaram o rearranjo LINE-1/c-MYC nas células, sem distinção, o que não foi observado nas células sanguíneas de cães sem o tumor. Autores defendem a teoria que a especificidade do rearranjo LINE-1/c-MYC encontradas apenas nas células do TVT explica o aparecimento e a manutenção desta neoplasia nos diferentes continentes do mundo por todo este tempo (Murgia et al., 2006; Vonholdt et al., 2006).

Após o sequenciamento do produto da PCR, constatou-se ser a região amplificada realmente, parte do rearranjo LINE-1/c-MYC, por meio de buscas em banco de dados (GenBank) (Katzir et al., 1985; Amariglio et al., 1991; Choi et al., 1999; Choi et al., 2002; Liao et al., 2003; Murgia et al., 2006).

Os resultados apresentados nesse trabalho estão de acordo com dados da literatura que utilizaram não só a PCR como teste padrão, mas também outros métodos moleculares constando a ausência do rearranjo LINE-1/c-MYC em outros tumores (Chu et al., 2001) e sua especificidade para o TVT. Estudos com células de TVT, inclusive o nosso detectaram o rearranjo LINE-1/c-MYC nas células, sem distinção, o que não foi observado nas células sanguíneas de cães sem o tumor. Autores defendem a teoria que a especificidade do rearranjo LINE-1/c-MYC encontradas apenas nas células do TVT explica o aparecimento e a manutenção desta neoplasia nos diferentes continentes do mundo por todo este tempo (Katzir et al., 1985; Amariglio et al., 1991; Choi et al., 1999; Choi et al., 2002; Liao et al., 2003).

No entanto, estes mesmos autores relatam a necessidade de mais estudos para saber qual o verdadeiro papel dessa alteração genética no TVT, o mecanismo de transposição envolvido e a sua participação nesta neoplasia.

É importante ressaltar que somente este rearranjo seja responsável por todas essas alterações fenotípicas encontradas nos resultados de nosso trabalho, como as atipias citológicas do tipo aumento no volume dos núcleos, hipercromasias, halo perinuclear, ranhura, alterações da relação núcleo/citoplasma e o grau de atividade mitótica. Esses critérios foram adaptados dos já estabelecidos para lesões, isto é, marcadores preditivos do comportamento biológico de neoplasias (Liao et al., 2003; Meuten, 2008).

CONCLUSÃO

Concluiu-se que o emprego associado das colorações de Giemsa e Papanicolaou constituiu uma grande contribuição não apenas para o diagnóstico citológico do TVT, como também, uma técnica valiosa para evidênciação de critérios de malignidade que normalmente não são visualizados quando se utiliza apenas os corantes de rotina tipo Romanowsky.

Quanto à predisposição racial a maioria dos cães são sem raça definida devido à grande quantidade de cães de rua; no entanto, não foi constatada predileção quanto a sexo e idade e a localização genital continua sendo a mais comum, embora chame a atenção para aqueles casos extragenitais encontrados nesse trabalho. Quanto ao tempo de evolução, ainda é muito difícil se inferir quaisquer dados estatísticos devido à própria falta de informação por parte dos proprietários.

A especificidade da alteração genética LINE-1/c-MYC é indiscutível como preconizado pela literatura especializada e reafirmada ainda pelo sequenciamento genético quanto a sua monoclonalidade.

Para futuras investigações, este estudo poderá servir de esteio para correlacionar morfologia, critérios de malignidade, grau de agressividade e estudos moleculares ainda não realizados em conjunto para o TVT, bem como, outras metodologias para o melhor entendimento de sua carcinogênese.

Portanto, julgamos relevante prosseguir nas investigações para melhor definir a natureza biológica dessa neoplasia, compreender o porquê determinados cães quando desenvolve o TVT espontâneo e quando submetidos à quimioterapia, cujo objetivo é eliminar o tumor e possíveis focos de metástases, por vezes, não é alcançado.

E já de antemão recomendar que se o profissional especialista no assunto for empregar o exame citológico para o diagnóstico de TVT que seja aplicado à coloração de Papanicolaou para facilitar a identificar expressão dos critérios de malignidade, para que possa auxiliar na sessão de quimioterapia.

REFERÊNCIAS

1. 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): 243-6.
2. Amaral AS, Gaspar LFJ, Silva SB, Rocha NS. Exame citológico como método diagnóstico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (Estudo Retrospectivo: 1994-2002). Rev Port Cienc Vet. 2004; 99: 167-71.
3. Amaral AS. Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA [thesis]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2005.
4. Amariglio EN, Hakim I, Brok-Simoni F, Grossman Z, Katzir N, Harmelin A, et al. Identity of rearranged LINE/*c*-MYC junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88(18): 8136-9.
5. Bindu L, Balaram P, Mathew A, Remani P, Bhattathiri VN, Nair MK. Radiation-induced changes in oral carcinoma cells - a multiparametric evaluation. Cytopathology. 2003; 14(5): 287-93.
6. Brandão CV, Borges AG, Ranzani JJT, Rahal SC, Teixeira CR, ROCHA NS. Tumor Venéreo Transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). Rev Educ Contin CRMV-SP. 2002; 5(1): 25-31.
7. Catone G, Marino G, Poglayen G, Gramiccia M, Ludovisi A, Zanghi A. Canine venereal tumour parasited by *Leishmania infantum*. Vet Res Commun. 2003; 27(7): 549-53.
8. Ceccato-Antonini SR, Meneghin SP, Urashima AS. Técnicas básicas de biologia molecular. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos (apostila); 2004.
9. Choi Y, Ishiguro N, Shinagawa M, Kim CJ, Okamoto Y, Minami S, et al. Molecular structure of canine LINE-1 elements in canine transmissible venereal tumor. Anim Genet. 1999; 30(1): 51-3.
10. Choi Y, Kim CJ. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 gene in canine transmissible venereal tumor. J Vet Sci. 2002; 3(4): 285-92.
11. 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(6A): 4917-24.

12. Chu RM, Sun TJ, Yang HY, Wang DG, Liao KW, Chuang TF, et al. Heat shock proteins in canine transmissible venereal tumor. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002; 82(1-2): 9-21.
13. Cohen D. The transmissible venereal tumor of the dog – a naturally occurring allograft? A review. *Isr J Med Sci*. 1978; 14: 14-9.
14. Cohen D. The Canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. *Adv Cancer Res*. 1985; 43: 75-112.
15. Cowell RL, Tyler RD. Cytology of cutaneous lesions. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2008; 19(4): 769-94.
16. Das U, Das AK. Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Vet Res Commun*. 2000; 24(8): 545-56.
17. Dingli D, Nowak MA. Cancer biology: infectious tumour cells. *Nature*. 2006; 443(7107): 35-6.
18. 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): 1018-23.
19. Erünal-Maral N, Findik M, Aslan S. Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr*. 2000; 107(5): 175-80.
20. Han JS, Boeke JD. LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? *Bio Essays*. 2005; 27: 775-84.
21. Harmelin A, Pinthus JH, Katzir N, Kapon A, Volcani Y, Amariglio EN, et al. Use of a murine xenograft model for canine transmissible venereal tumor. *Am J Vet Res*. 2001; 62(6): 907-11.
22. Hasler AH, Weber WT. Theriogenology question of the month. Transmissible venereal tumor (TVT). *J Am Vet Med Assoc*. 2000; 216(10): 1557-59. Errata em: Theriogenology question of the month. *J Am Vet Med Assoc*. 2000; 217(1): 42.
23. Hataka A. Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. [Thesis]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2003.
24. Ihrlaseh SM, Oliveira, MLCS, Silva GN, Franchi CAS, Camargo JLV. Microdissecção e captura a laser na investigação do gene TP53 em tecidos incluídos em parafina. *J Bras Patol Med Lab*. 2007; 43(1): 61-67.

25. Jörundsson E, Lumsden JH, Jacobs RM. Rapid staining techniques in cytopathology: a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, Papanicolaou and Romanouwsky stains. *Vet Clin Pathol*. 1999; 28(3): 100-8.
26. Katzir N, Rechavi G, Cohen JB, Unger T, Simoni F, Segal S, et al. "Retroposon" insertion into the celular oncogen c-Myc in canine transmissible venereal tumor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82(4): 1054-8.
27. Katzir N, Arman E, Cohen D, Givol D, Rechavi G. Common origin of transmissible venereal tumors (TVT) in dogs. *Oncogene*. 1987; 1(4): 445-8.
28. Kroger D, Grey RM, Boyd JW. An unusual presentation of canine transmissible venereal tumor. *Canine Pract*. 1991; 16(6): 17-21.
29. Lefebvre GNF, Bonamin LV, Oliviera CM. Tratamento de tumor venéreo transmissível (tvt) canino utilizando *Viscum álbum* em associação à quimioterapia. *Clinica Veterinária*. 2007; 70: 78-86.
30. Liao KW, Lin ZY, Pao HN, Kam SY, Wang FI, Chu RM. 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*. 2003; 15(5): 399-406.
31. Lopes AA, Oliveira, AM, Prado, CBC. Principais genes que participam na formação dos tumores. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 2002; 2(2): 1-7.
32. MacEwen EG. Transmissible venereal tumor. In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors. *Small animal clinical oncology*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001. p.651-6.
33. Magalhães AM, Ramadinha RR, Barros CSL, Peixoto PV. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. *Pesq Vet Bras*. 2001; 1(21): 23-32.
34. MacKinley ET. General cytologic prionciples. In: Actkinson BF, editor. *Atlas of diagnostic cytopathology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2004. p.1-30.
35. Martins MIM, Souza FF, Gobello C. Canine transmissible venereal tumor: etiology, pathology, diagnosis and treatment. In: Concannon PW, England GCW, Verstegen J, Linde-Forsberg C, editors. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. 2005. New York: International Veterinary Information Service. Available from: <http://www.ivis.org/advances/Concannon/gobello2/chapter.asp?LA=1>
36. Meinkoth JH, Cowell RL. Recognition of basic cell types and criteria of malignancy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2002; 32(6): 1209-35.

37. Meuten DJ. Diagnostic cytology for clinicians. [cited 2008 Mar 26]. Available from: www.cldavis.org/cgi-bin/download.cgi?pid=404.
38. Miller DM, Blume S, Borst M, Gee J, Polansky D, Ray R et al. Oncogenes, malignant transformation, and modern medicine. *Am J Med Sci*. 1990; 300(1): 59-69.
39. Mitre BK, Kanbour AI, Mauser N. Fine needle aspiration biopsy of breast carcinoma in pregnancy and lactation. *Acta Cytol*. 1997; 41: 1121-30.
40. Mohanty GC, Rajya BS. Growth and morphological characteristics of canine venereal tumor cells in vitro. *Vet Pathol*. 1977; 14(4): 420-5.
41. Molina AL, Tobo PR. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. *Einstein*. 2004; 2(2): 139-42.
42. Mukaratirwa S, Gruys E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *Vet Q*. 2003; 25(3): 101-11.
43. Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss RA. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*. 2006; 126(3): 477-87.
44. Nak D, Nak Y, Cangul IT, Tuna B. A clinico-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. *J Vet Med*. 2005; 52: 366-70.
45. Nielsen SW, Kennedy PC. Tumors of the genital systems. In: Moulton JE, editor. *Tumor in domestic animals*. 3rd ed. Berkeley: University of California Press; 1990. p.479-517.
46. Ojopi EP, Dias Neto E. Genômica e Oncologia. In: Mir, L. *Genômica*. 1ed. São Paulo: Atheneu, 2004.p.363-387.
47. Ozkara SK, Ustun MO, Paksoy N. The gray zone in breast fine needle aspiration cytology: how to report on it? *Acta Cytol*. 2002; 46: 513-8.
48. Papanicolaou, G.N. Papanicolaou staining method. *Science*. 1932; 95: 438-9.
49. Papazoglou LG, Koutinas AF, Plevraki AG, Tontis D. Primary intranasal transmissible venereal tumour in the dog: a retrospective study of six spontaneous cases. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2001; 48(7): 391-400.
50. Pereira JS, Silva AB, Martins AL, Ferreira AM, Brooks DE. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumor. *Vet Ophthalmol*. 2000; 3(1): 43-7.
51. Raskin ER, Meyer DJ. Atlas de citologia de cães e gatos. 1st ed. São Paulo: Editora Roca; 2003. p.3- 10.
52. Raskin RE, Rebar AH. Cytology of Internal Organs. In: 31st World Small Animal Veterinary Association Congress; 2006; Prague: Proceedings of World Small Animal Veterinary Association Congress; 2006. Available from:

<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture23/Raskin3.pdf?LA=1>

53. Rivera B, Ahrar K, Kangasniemi MM, Hazle JD, Price RE. Canine Transmissible Venereal Tumor: A Large Animal Transplantable Tumor Model. *Comp Med*. 2005; 55(4): 335-43.
54. Rocha NS. Citologia aspirativa por agulha fina em medicina veterinária (I). *Cães e gatos*. 1998; 75: 15-6.
55. Rocha NS. Citologia aspirativa por agulha fina em medicina veterinária (II). *Cães e gatos*. 1998; 75: 15-6.
56. Rogers KS. Transmissible venereal tumour. *Compend Contin Educ*. 1997; 19(9): 1036-45.
57. Ruggiero, RA; Bustuoabad, OD The biological sense of cancer: a hypothesis. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 3:43, p.1-14, 2006.
58. Silva NP, Andrade LEC. Noções básicas de biologia molecular. *Rev Bras Reumatol*. 2001; 41: 83-94.
59. Sobral RA, Tinucci-Costa M, Camacho A. Ocorrência do tumor venéreo transmissível em cães na região de Jaboticabal. *Ars Vet*. 1998; 14(1): 1-10.
60. Varaschin MS, Wouters F, Bernins VMO, Soares TMP, Tokura VN, Dias MPLL. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais; formas de apresentação, clínico-patológicas. *Clinica Veterinária*. 2001; 6(32): 332-8.
61. Vermooten MI. Canine transmissible venereal tumour (TVT): A review. *J S Afr Vet Assoc*. 1987; 58(3): 147-50.
62. Vonholdt BM, Ostrander EA. The singular history of a Canine Transmissible Tumor, *Cell*. 2006; 126(3): 445-7.

**TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A INSERÇÃO DO
TRANSPONSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE.**

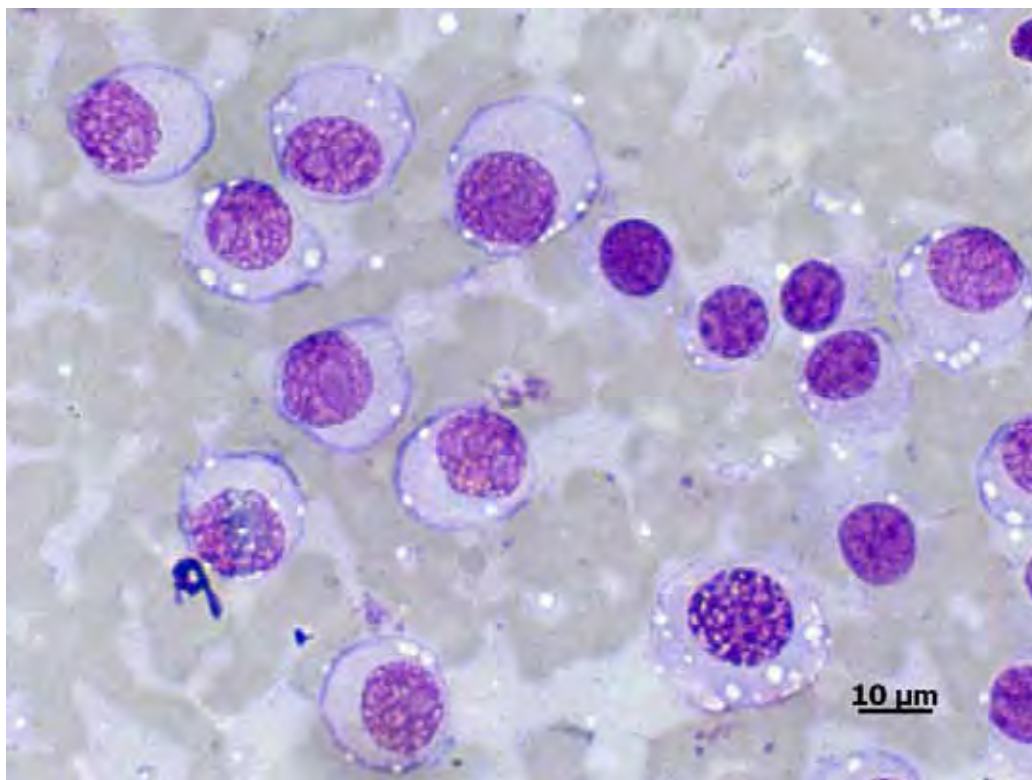


Figura 1. Tumor venéreo transmissível espontâneo canino. Observa-se morfologia ovóide, citoplasma abundante e núcleo localizado excentricamente característico do grupo plasmocitóide - Giemsa.

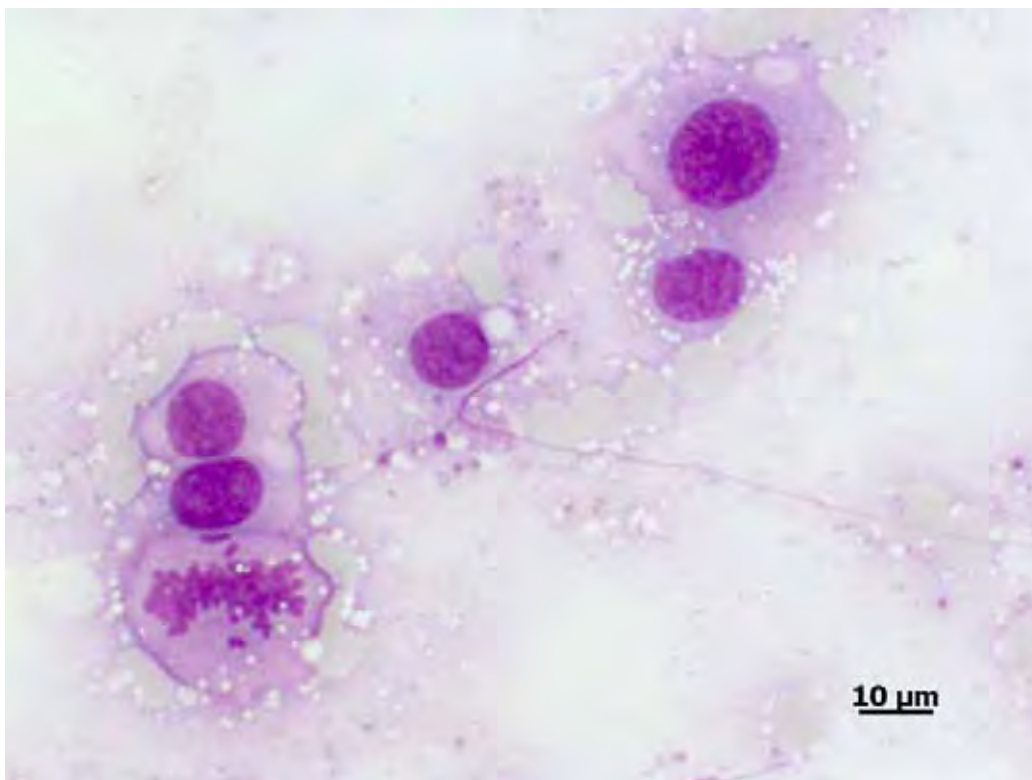


Figura 2. Tumor venéreo transmissível espontâneo canino. Observa-se morfologia arredondada, vacúolos que acompanham a periferia da célula e núcleo central característico do grupo linfocitóide - Giemsa.

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A INSERÇÃO DO TRANSPOSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE.

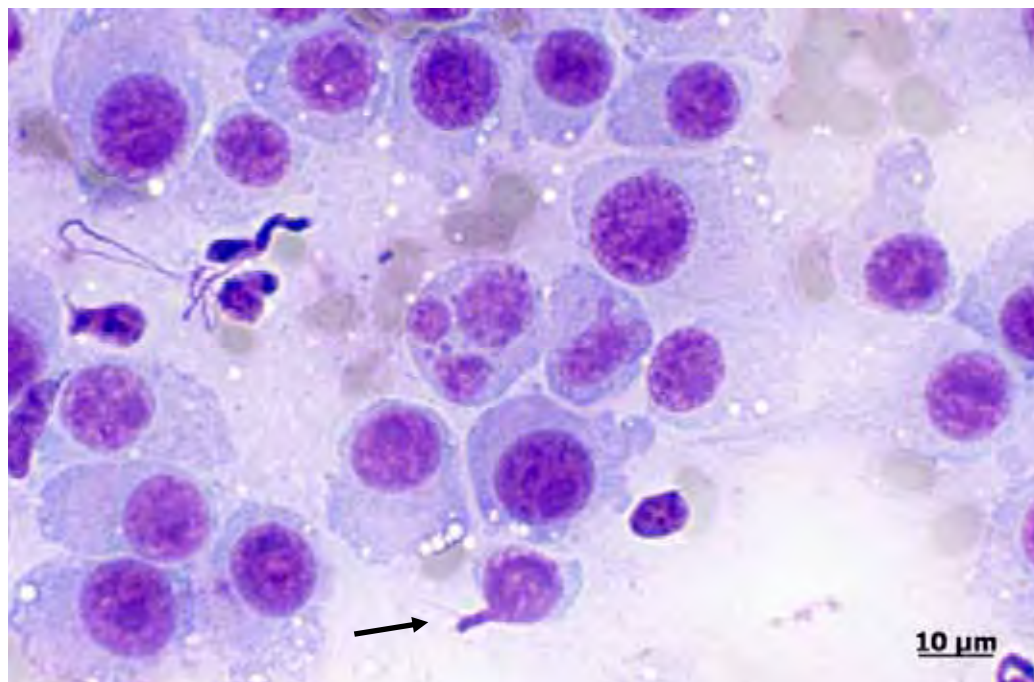


Figura 3. Expressão dos critérios de malignidade nas células do TVT. Cão. Esfoliação. Ranhura nuclear e espessamento da membrana nuclear; brotamento nuclear (seta); nucléolo angular; padrão grosseiro da cromatina nuclear com grau moderado de anisocitose e anisocariose – (Objetiva 40x 2,5 - barra: 10µm).

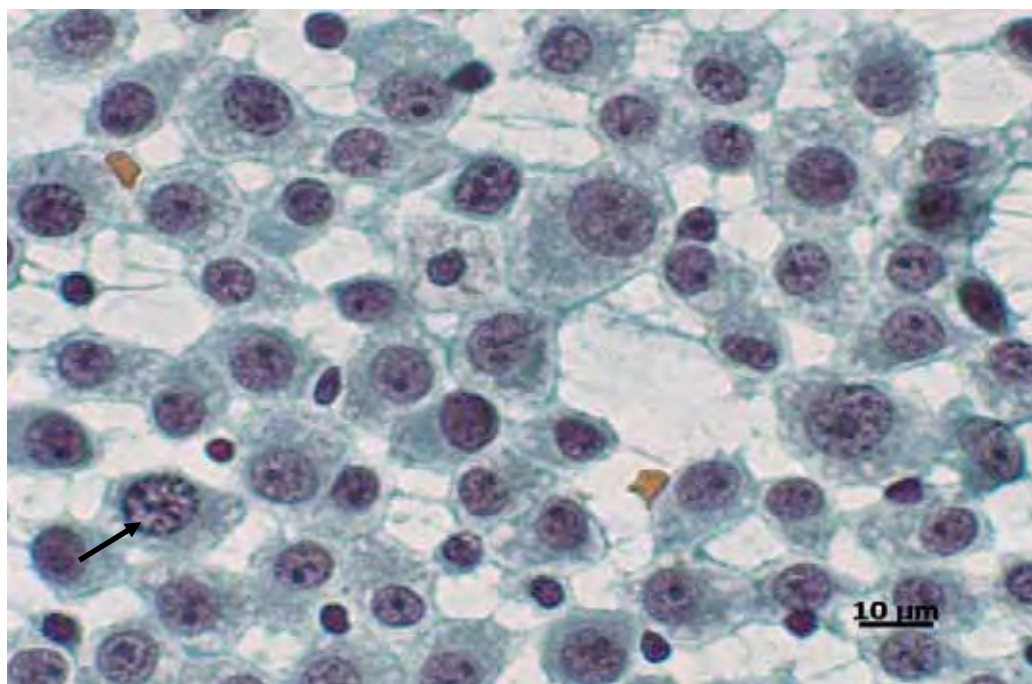


Figura 4. Expressão dos critérios de malignidade nas células do TVT. Cão. Esfoliação. Ranhura nuclear (seta) e espessamento da membrana nuclear; nucléolo angular; padrão grosseiro da cromatina nuclear com grau moderado de anisocitose e anisocariose – (Objetiva 40x 2,5 - barra: 10µm). Papanicolaou.

**TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A INSERÇÃO DO
TRANSPONSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE.**

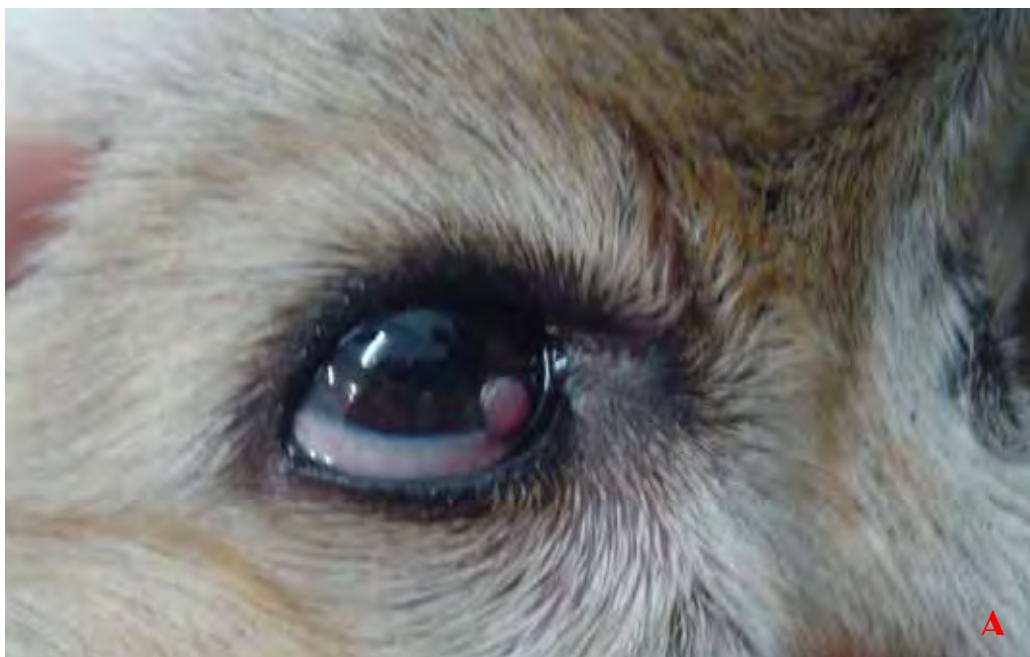


Figura 5. TVT espontâneo canino na córnea. Cão, SRD, fêmea, 5 anos. Localização apenas extragenital. Lesão de aspecto nodular, liso e esbranquiçado. O diagnóstico citológico foi classificado como morfologia plasmocitóide. (A).



Figura 6. TVT espontâneo canino cutâneo no mesmo animal da figura 5. Massas lobuladas róseas de tamanhos diferentes. O diagnóstico citológico foi classificado como morfologia plasmocitóide. (B).

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A INSERÇÃO DO TRANSPOSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE.

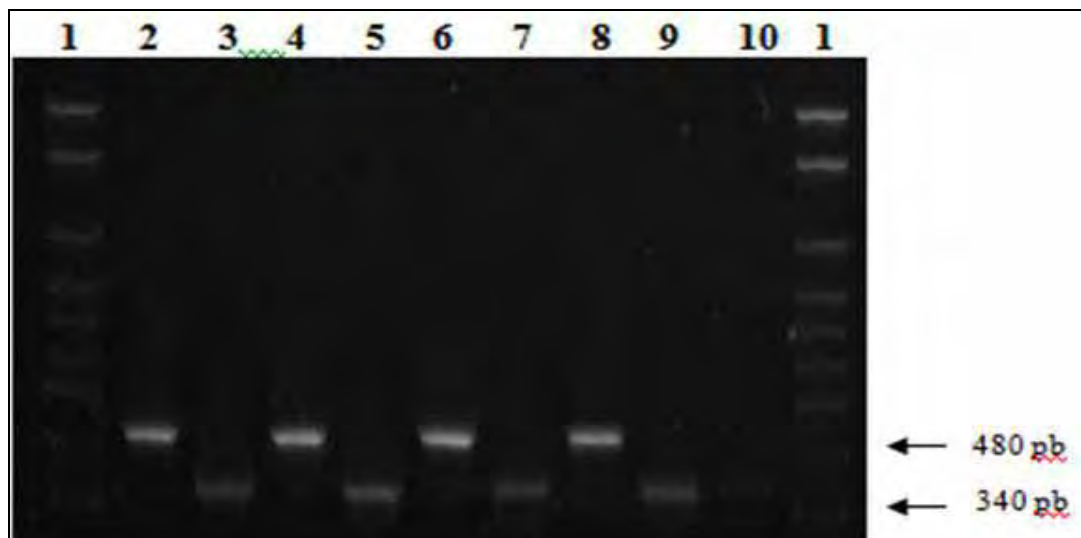


Figura 7. Reação da cadeia da polimerase. Sangue de cães acometidos com TVT (Controle Positivo), amplificando o rearranjo Line/MYC em 340 pb (3,5,7,9); controle interno da reação utilizando primers HGBA (2,4,6,8); marcador de peso molecular (1)

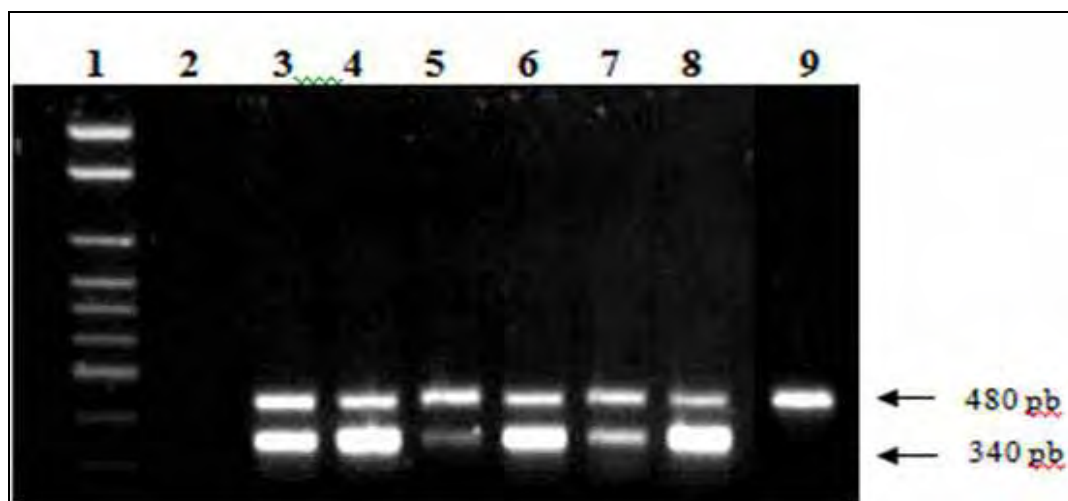


Figura 8. Especificidade do rearranjo LINE/MYC nas células de TVT detectada pela Reação em Cadeia da Polimerase. Eletroforese em gel de agarose a 1%: Coluna 1- marcador de peso molecular 100pb; Coluna 2: controle negativo (sem DNA); Colunas 3 a 8: amostras de TVT amplificadas; Coluna 9: amostra de cão

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A INSERÇÃO DO TRANSPOSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE.

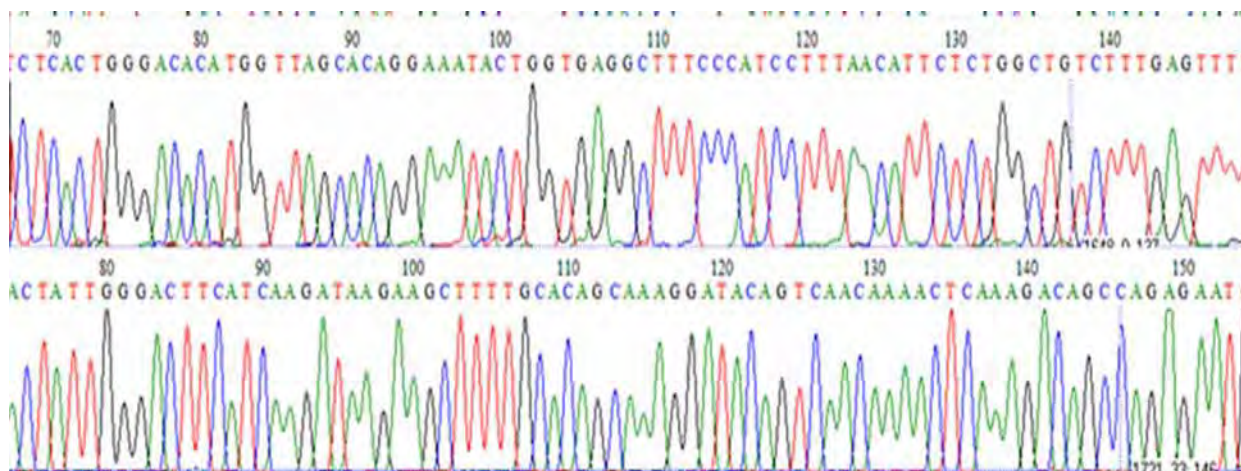


Figura 9. A relação entre as células do TVT de aspecto plasmocitóide e linfocitóide. Resultado do sequenciamento genético de amostras de TVT em aparelho ABI Prism™ 377 DNA sequencer (Perking-Elmer) para posterior alinhamento das sequências observado na figura 10.

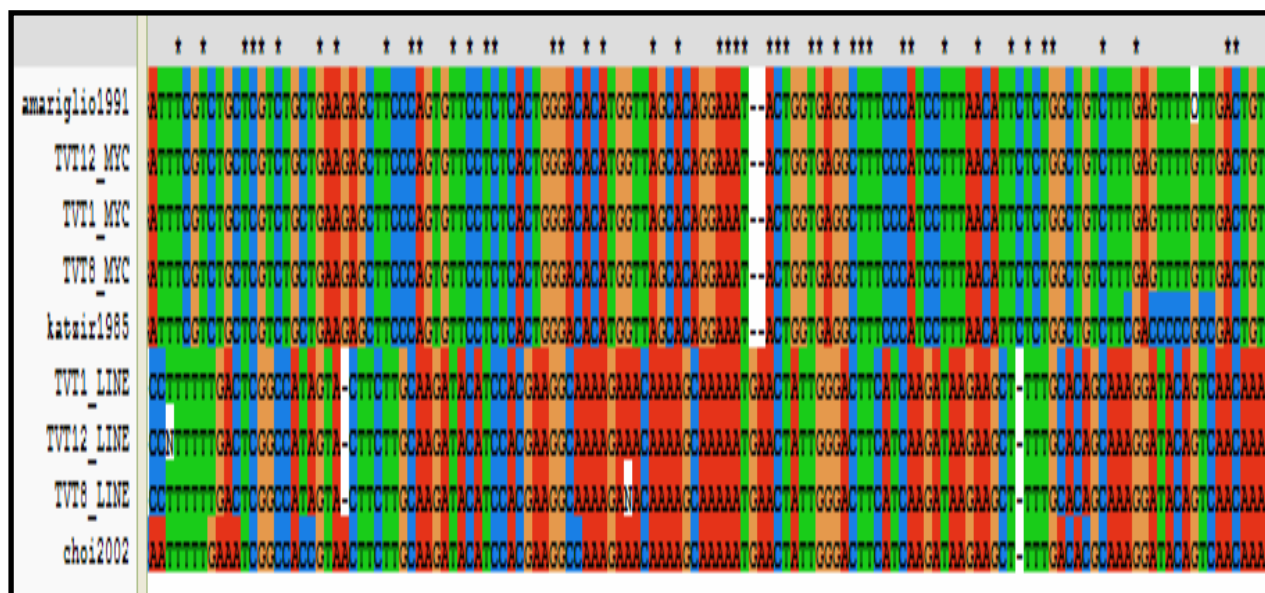


Figura 10. A relação entre as células do TVT de aspecto plasmocitóide e linfocitóide. A partir da figura 9, as sequências geradas foram alinhadas e analisadas utilizando os programas BioEditW versão 7.0.4.1 e Clustal W Multiple Sequence Alignment Program, v1.7 e confrontadas com as sequências depositadas em bancos de dados mostrando identidade de 94 a 96% com o

Considerações Finais

O presente estudo demonstra que as células de TVT exibem critérios citológicos indicativos de malignidades. Isto sugere que as células do TVT, assim como as de outras neoplasias exibem variações importantes na forma e volume devido aos seus constituintes, principalmente cromatina nuclear. É importante verificar que por convenção se diz que as células neoplásicas que demonstram esses critérios estão na fase progressiva, isto é, expressa fenotipicamente, característica de instabilidade do genoma. Tais características são conseqüências de uma infinidade de alterações que ocorrem nos genes responsáveis principalmente por fatores de crescimento. Que parece ser fundamental para expansão clonal de células neoplásicas.

Estudos com células de TVT, inclusive o nosso detectaram o rearranjo LINE-1/c-MYC nas células, sem distinção, o que não foi observado nas células sanguíneas de cães sem o tumor. Autores defendem a teoria que a especificidade do rearranjo LINE-1/c-MYC encontradas apenas nas células do TVT explica o aparecimento e a manutenção desta neoplasia nos diferentes continentes do mundo por todo este tempo.

É importante ressaltar que somente este rearranjo seja responsável por todas essas alterações fenotípicas encontradas nos resultados de nosso trabalho, como as atipias citológicas do tipo aumento no volume dos núcleos, hipercromasias, halo perinuclear, ranhura, alterações da relação núcleo/citoplasma e o grau de atividade mitótica. Esses critérios foram adaptados dos já estabelecidos para lesões, isto é, marcadores preditivos do comportamento biológico de neoplasias.

Portanto, julgamos relevante prosseguir nas investigações para melhor definir a natureza biológica dessa neoplasia, compreender o porquê determinados cães quando desenvolve o TVT espontâneo e quando submetidos à quimioterapia, cujo objetivo é eliminar o tumor e possíveis focos de metástases, por vezes, não é alcançado. E já de antemão recomendar que se o profissional especialista no assunto for empregar o exame citológico para o diagnóstico de TVT que seja aplicado à coloração de Papanicolaou para facilitar a identificar expressão dos critérios de malignidade, para que possa auxiliar na sessão de quimioterapia.

REFERÊNCIAS (CAPÍTULO I)

ADACHI, S. et al. C-Myc is necessary for DNA damage-induced apoptosis in the G₂ phase of the cell cycle. **Mol. Cell. Biol.**, v.21, n.15, p.4929-4937, 2001.

AKOPYANZ, N. et al. PCR based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nucleic Acids Res.**, v.20, p.6221-6225, 1992.

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

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

AMARAL, A. S.; BASSANI-SILVA, S.; FONSECA, L.S.; ANDRADE, F.H.E.; GASPAR, L.F.J.; ROCHA, N.S. Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino. In: 10^a Mostra Científica da FMVZ-Unesp, 2006, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Unesp, 2006.

AMARAL, A.S.; GASPAR, L.F.J.; SILVA, S.B.; et al. Exame citológico como método diagnóstico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (Estudo Retrospectivo: 1994-2002). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, p.167-171, 2004.

AMARIGLIO, E.N. et al. Identity of rearranged LINE/c-MYC junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.88, n.18, p.8136-8139, 1991.

ANDRADE, F. E. A. 2008. 45f. Detecção de Inseticidas Piretróides no Tecido adiposo de Tumores Mamários malignos em cadelas. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BASSANI-SILVA, S. **Efeito da própolis sobre a agressividade do tumor venéreo transmissível canino: ensaios *in vitro***. 2005. 104f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BATISTA, J.S. et al. Tumor Venéreo Transmissível Canino com localização intra-ocular e metástase no baço. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.1, n.1, p.45-48, 2007.

BAUER, D. et al. **PCR Methods and Applications**. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, Supplement, 1994, p. S97–S108.

BENTOLILA, S. et al. Analysis of major repetitive DNA sequences in the dog (*Canis familiaris*) genome. **Mamm. Genome**, v.10, n.7, p.699-705, 1999.

BOGERD, H.P. et al. Cellular inhibitors of long interspersed element 1 and Alu retrotransposition. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.103, n.23, p.8780-8785, jun. 2006.

BOISSINOT, S., FURANO, A.V. Adaptive evolution in LINE-1 retroposons. **Mol. Biol. Evol**, v.18, n.12, p.2186-2194, 2001.

BOSCOS, C.M., TONTIS, D.K., SAMARTZI, F.C. Cutaneous involvement of TVT in dogs – a report of two cases. **Canine Pract.**, v.24, n.4, p.6-11, 1999.

BRANDÃO, C.V. et al. Tumor Venéreo Transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, v.5, n.1, p.25-31, 2002.

CANGUL, I.T. Improved classification, diagnosis and prognosis of canine round cell tumours. **Veterinary Sciences Tomorrow**, v.4, p.1-19, 2001.

CARARETO, C.M.A.; ESTÉCIO, M.R.H.; TAJARA, E.H. Elementos transponíveis e doenças humanas: da instabilidade genômica à carcinogênese. **HB. Cient.**, v.8, n.2, p.113-125, 2001.

CATONE, G. et al. Canine venereal tumour parasited by *Leishmania infantum*. **Vet. Res. Commun.**, v.27, n.7, p.549-553, 2003.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; MENECHIN, S. P.; URASHIMA, A.S. **Técnicas básicas de biologia molecular**. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo (apostila). p.2-57, 2004.

CHEN, J. et al. A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. **Hum. Genet.**, v.117, n.5, p.411-427, 2005.

CHOI, Y. et al. Molecular structure of canine LINE-1 elements in canine transmissible venereal tumor. **Anim Genet**, v.30, n.1, p.51-3, 1999.

CHOI, Y.; KIM, C.J. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 gene in canine transmissible venereal tumor. **J. Vet. Sci.**, v.3, n.4, p.285-292, 2002.

CHU, R.M. et al. Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. **Anticancer Res.**, v.21, n.6A, p.4917-4924, 2001.

COHEN, D. The Canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression, **Adv. Cancer Res.**, v.43, p.75-112, 1985.

COSTA, R.M.A.; MENCK, C.F.M. Genes de Reparo de DNA. In: FERREIRA CG; ROCHA JC. (Eds.). **Oncologia Molecular**. Rio de Janeiro: Ateneu, 2004, p. 43-55.

COWELL, R.L.; TYLER, R.D. Cytology of cutaneous lesions. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.19, n.4, p.769-794, 1989.

DANG, C.V. C-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. **Mol. Cell. Biol.**, v.19, n.1, p.1-8, 1999.

DAS, U; DAS, A.K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Vet. Res. Commun.**, v.24, n.8, p.545-556, 2000.

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

ERÜNAL-MARAL, N.; FINDIK, M.; ASLAN, S. Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, v.107, n.5, p.175-180, 2000.

FARIA, M.H.G.; RABENHORST, S.H.B. Impacto do oncogene c-myc no câncer. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.52, n.2, p.165-171, 2006.

FERREIRA, A.J.A. et al. Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. **J. Small Anim. Pract.**, v.41, n.4, p.165-168, 2000.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. Oncogenes e Genes supressores de Tumor. In: SILVA, R.L.A. (Eds). **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.29-42.

GARCIA-PEREZ, J.L. et al. LINE-1 retrotransposition in human embryonic stem cells. **Hum. Mol. Genet.**, v.16, n.13, p. 1569-1577, 2007.

GARTEL, A.L., SHCHORS, K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. **Exp. Cell Res.**, v.283, n.1, p.17-21, 2003.

GASPAR, L.F.J. **Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com danos citogenéticos, taxa de proliferação e resposta clínica à quimioterapia.** 2005. 143f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D.J. (Ed). **Tumors in domestic animals.** Ames. Iowa: Iowa State, 2002. p.45-117.

GOLIJOW, C.D. et al. C-myc gene amplification detected in preinvasive intraepithelial cervical lesions. **Int. J. Gynecol. Cancer**, n.11, p.462-465, 2001.

GREATTI, W.F.P. et al. Índices proliferativos do tumor venéreo transmissível pelas técnicas do CEC e Ki-67 na citologia aspirativa com agulha fina. **Arch. Vet. Sci.**, v.9, n.1, p.53-59, 2004.

GROSS, T.L. et al. Transmissible venereal tumor. In: GROSS, T.L. et al. (Eds.) **Skin diseases of the dog and cat – clinical and histopathologic diagnosis.** 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 2005. p.800-803.

HARMELIN, A. et al. Lack of MHC expression and retention of ultrastructural characteristics by xenograft transmissible venereal tumor cells in SCID mice. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.86, n.3-4, p.245-249, 2002.

HARMELIN, A. et al. Use of a murine xenograft model for canine transmissible venereal tumor. **Am. J. Vet. Res.**, v.62, n.6, p.907-911, 2001.

HASLER, A.H.; WEBER, W.T. Theriogenology question of the month. Transmissible venereal tumor (TVT). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.216, n.10, p.1557-1559, 2000. Errata em: Theriogenology question of the month. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.217, n.1, p.42, 2000.

HATAKA, A. **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas.** 2003. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

KASS, D.H. Impact of SINEs and LINEs on the mammalian genome. **Current Genomics**, v.2, n.2, p.199-219, 1999.

KATZIR N. et al. Common origin of transmissible venereal tumors (TVT) in dogs. **Oncogene**, v.1, n.4, p.445-448, 1987.

KATZIR N., et al. "Retroposon" insertion into the cellular oncogen c-Myc in canine transmissible venereal tumor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.82, n.4, p.1054-1058, 1985.

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

KUTTLER, F., MAI, S. C-myc, Genomic Instability and Disease. In: VOLFF, J-N. (Ed). **Genome Dyn.** Basel: Karger, 2006. p.171-190.

LEFEBVRE, G.N.F.; BONAMIN, L.V.; OLIVIERA, C.M. Tratamento de tumor venéreo transmissível (tvv) canino utilizando *Viscum álbum* em associação à quimioterapia. **Clinica Veterinária**, v.70, p.78-86, 2007.

LIAO, K-W. et al. 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**, v.15, n.5, p.399-406, 2003.

LITTLEWOOD, T.D.; EVAN, G.I. The role of *myc* oncogenes in cell growth and differentiation. **Adv. Dent. Res.**, v.4, p.69-79, 1990.

LOPES, A.A.; OLIVEIRA, A. M.; PRADO, C.B.C. Principais genes que participam na formação de tumores. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.2, n.2, p.1-7, 2002.

MacEWEN, E.G. Transmissible venereal tumor. In: WITHROW, S.J., MacEWEN, E.G. (Eds). **Small animal clinical oncology**. 3ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p.651-656.

MEINKOTH, J.H.; COWELL, R.L. Recognition of basic cell types and criteria of malignancy. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.32, n.6, p.1209-1235, 2002.

MESQUITA, R.A. et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesq. Ondontol. Bras.**, v.15, n.4, p.314-319, 2001.

MILLER, D.M. et al. Oncogenes, malignant transformation, and modern medicine. **Am. J. Med. Sci.**, v.300, n.1, p. 59-69, 1990.

MOHANTY, G.C.; RAJYA, B.S. Growth and morphological characteristics of canine venereal tumor cells in vitro. **Vet. Pathol.**, v.14, n.4, p.420-425, 1977.

MOLINA, A.L.; TOBO, P. R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**, v.2, n.2, p.139-142, 2004.

MUKARATIRWA, S.; GRUYS, E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. **Vet. Q.**, v.25, n.3, p.101-111, 2003.

MURGIA, C. et al. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. **Cell**, v.126, n.3, p.477-487, 2006.

NAOUM, P.C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v.23, n.2, p.111-119, 2001.

NIELSEN, S.W.; KENNEDY, P.C. Tumors of the genital systems. In: MOULTON, J.E. (Ed). **Tumor in domestic animals**. 3.ed. Berkeley: University of California Press, 1990. p.479-517.

OJOPI, E.P.; DIAS NETO, E. Genômica e Oncologia. In: MIR, L. (Ed). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.363-387.

OTOMO, K. et al. Histological and ultrastructural findings of regressing canine transmissible venereal tumor after repeated transplantation. **Nippon Juigaku Zasshi**, v.43, n.6, p.823-832, 1981.

PAPAZOGLU, L.G. et al. Primary intranasal transmissible venereal tumour in the dog: a retrospective study of six spontaneous cases. **J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med**, v.48, n.7, p.391-400, 2001.

PARK, M. et al. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.18, n.1, p.130-133, 2006.

PEREIRA, J.S. et al. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumor. **Vet. Ophthalmol.**, v.3, n.1, p.43-47, 2000.

PINHO, M.S.L. Perfil genômico tumoral: explicando o acaso. Genética e biologia molecular. **Rev. Bras. Coloproct.**, v.3, n.21, p.202-205, 2001.

PINHO, M.S.L. Pesquisa em Biologia Molecular: como fazer? **Rev. Bras. Coloproct.**, v.26, n.3, p.331-336, 2006.

ROCHA, N.S. Citologia aspirativa por agulha fina em medicina veterinária (I). **Cães e gatos**, n.75, p.15-16, 1998.

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

ROGERS, K.S. Transmissible venereal tumour. **Compend. Contin. Educ.** v.19, n.9, p.1036-1045, 1997.

ROGERS K.S.; WALKER M.A.; DILLON H.B. Transmissible venereal tumor – a retrospective study of 29 cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.34, n.6, p.463-470, 1998.

ROSS, J.A. Transmittable Tumors: not the Devil's (nor the dog's) Advocate. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.15, n.11, p. 2047-2048, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002.

SCHNEIDER, H.W.; PEREIRA, A.G.F. **Implementação de Protótipo de um SMA para Anotação Manual em Projetos de Sequenciamento de Genomas.** 2006. 97f. Monografia – Instituto de Ciências Exatas, Universidade de Brasília, Brasília.

SILVA, N.P., ANDRADE, L.E.C. Noções básicas de biologia molecular. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.41, p. 83-94, 2001.

THORNBURG, B.G., GOTEA, V., MAKALOWSKI, W. Transposable elements as a significant source of transcription regulating signals. **Gene**, v.365, p.104-110, 2006.

VARASCHIN M.S. et al. Tumor venéreo transmissível canino na região de alfenas, Minas Gerais; formas de apresentação, clínico-patológicas. **Clinica Veterinária**, v.6, n.32, p.332-338, 2001.

VONHOLDT, B.M., OSTRANDER, E.A. The singular history of a Canine Transmissible Tumor, **Cell**, v.126, n.3, p. 445-447, 2006.

ANEXO A
TABELA DE CONTAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS

Caso1	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso9	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	705	543	1248	Plasmo	412	508	920
Linfo	210	64	274	Linfo	36	45	81
Caso2	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso10	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	452	689	1141	Plasmo	678	702	1380
Linfo	52	79	131	Linfo	3	11	14
Caso3	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso11	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	502	289	791	Plasmo	31	11	42
Linfo	56	101	157	Linfo	101	89	190
Caso4	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso12	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	626	345	971	Plasmo	10	13	23
Linfo	0	26	26	Linfo	79	102	181
Caso5	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso13	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	718	709	1427	Plasmo	234	307	541
Linfo	254	89	343	Linfo	27	12	39
Caso6	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso14	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	435	254	689	Plasmo	541	308	849
Linfo	382	531	913	Linfo	5	11	16
Caso7	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso15	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	68	88	156	Plasmo	33	12	45
Linfo	245	279	524	Linfo	123	232	355
Caso8	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso16	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	491	554	1045	Plasmo	641	x	641
Linfo	162	61	223	Linfo	92	x	92

ANEXO A (CONT.)
TABELA DE CONTAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS

Caso17	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso25	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	589	755	1344	Plasmo	497	503	1000
Linfo	98	83	181	Linfo	121	79	200
Caso18	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso26	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	574	378	952	Plasmo	152	x	152
Linfo	25	18	43	Linfo	7	x	7
Caso19	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso27	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	669	563	1232	Plasmo	421	557	978
Linfo	47	38	85	Linfo	12	7	19
Caso20	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso28	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	887	446	1333	Plasmo	815	765	1580
Linfo	66	53	119	Linfo	36	27	63
Caso21	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso29	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	734	602	1336	Plasmo	755	578	1333
Linfo	34	40	74	Linfo	9	3	12
Caso22	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso30	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	533	664	1197	Plasmo	404	620	1024
Linfo	22	7	29	Linfo	17	46	63
Caso23	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso31	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	269	251	520	Plasmo	277	244	521
Linfo	3	28	31	Linfo	16	31	47
Caso24	1ª lâmina	2ª lâmina	Total	Caso32	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	388	414	802	Plasmo	536	331	867
Linfo	310	274	584	Linfo	34	14	48

ANEXO A (CONT.)
TABELA DE CONTAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS

Caso33	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	187	117	304
Linfo	3	11	14
Caso34	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	198	99	297
Linfo	27	19	46
Caso35	1ª lâmina	2ª lâmina	Total
Plasmo	0	3	3
Linfo	297	365	662

ANEXO B

FICHA DE OBSERVAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE

CASO			Grupo Citomorfológico		
Critérios de Malignidade			Critérios de Malignidade		
Comuns	Presentes	Ausentes	Raros	Presentes	Ausentes
Anisocitose			Canibalismo		
Anisocariose			Brotamentos		
Cromatina			Fissura Nuclear		
Células Nuas			Mastócitos		
Binucleação			Núcl Riniformes		
Multinucleação			Cels. Girino		
Mitoses Típicas			Espes.mem.citop.		
Mitoses anormais			Espes.mem.nuclear		
Outros critérios observados:					

ANEXO C

NORMAS DA REVISTA PORTUGUESA DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Informações aos autores

A Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias (RPCV) publica memórias científicas originais, artigos de revisão, casos clínicos e notas técnicas, considerados relevantes para as ciências veterinárias. Os artigos devem ser escritos em português ou inglês e enviados à Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, acompanhados de uma carta/mensagem a solicitar que o artigo seja considerado para publicação nesta revista, indicando o tipo de trabalho.

A submissão pressupõe que são cumpridas as condições de publicação exigidas pela RPCV, nomeadamente o trabalho não ter sido publicado nem estar submetido a outra revista, a sua submissão ter a concordância de todos os autores assim como a aceitação de que a Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias passará a deter direitos de autor sobre os trabalhos publicados.

De cada artigo devem ser enviados um original impresso em papel branco de formato A4, só uma das faces e um ficheiro informático em Word em suporte físico ou por correio electrónico até um máximo de 2 Mb.

Formatação do artigo

- . margens: 2,5 cm (todas)
- . espaços: 1,5
- . tipo de letra Times New Roman 12
- . tabulação no início de parágrafos: 0,5 cm
- . a formatação do texto deve ser reduzida ao mínimo indispensável. Deve evitar-se o uso de marcas e números (“bullets and numbering”). Deve evitar-se também o uso de fontes em itálico (reservada para os nomes em latim) ou a cheio (“bold”) (reservada para os títulos e subtítulos)
- . as páginas devem ser numeradas no canto inferior direito
- . as linhas não devem ser numeradas.

Conteúdo do artigo

A primeira página deve conter:

- . o título do artigo em português e inglês (o primeiro na língua de apresentação do artigo),

. o nome dos autores [primeiro nome por extenso, seguido de iniciais caso se aplique (separadas por pontos e sem espaços) e apelido(s)]; os nomes dos autores devem ser separados por vírgulas,

. afiliação dos autores. Quando se refira mais do que uma instituição devem ser utilizados os numerais em 1, 2, 3, 4, etc., a seguir ao nome de cada autor para o fazer corresponder a cada uma das instituições listadas. Quaisquer outros símbolos poderão ser utilizados para informação adicional, como por exemplo a morada institucional à data da publicação de um autor que já não desenvolva a sua actividade na instituição onde o trabalho foi realizado.

. sempre que haja mais do que um autor, deve ser identificado o autor para quem a correspondência referente ao artigo deve ser endereçada com * a seguir ao nome, do qual se deve indicar o endereço de correio electrónico e os números de telefone e fax.

Seguem-se os resumos em português (“Resumo:”) e inglês (“Summary:”) que não devem exceder 250 palavras cada. Tendo os resumos uma vida independente do artigo, normalmente com uma difusão mais alargada, devem por si elucidar o leitor sobre enquadramento do estudo, metodologia utilizada, principais resultados e conclusões.

As memórias científicas originais podem ser apresentadas como artigos em format convencional, estruturados em “Introdução”, “Material e métodos”, “Resultados”, “Discussão” e, opcionalmente, “Agradecimentos”. Alternativamente, as memórias científicas originais podem ser apresentadas sob a forma de comunicações breves e, neste caso, a divisão em secções é dispensável. Os outros tipos de artigo devem ser estruturados de acordo com a conveniência da exposição.

As referências bibliográficas no texto devem ser citadas indicando o nome do autor, sem iniciais, seguido do ano de publicação. Por exemplo: (Taylor, 1980) ou Taylor (1980). Se a publicação tiver dois autores devem indicar-se o nome dos dois autores. Por exemplo: (Taylor e Burns, 1974) ou Taylor e Burns (1974). Se tiver mais de dois autores deve indicar-se o nome do primeiro autor seguido de et al. antes da indicação do ano de publicação. Por exemplo: (Taylor et al., 1981) ou Taylor et al. (1981). A citação de vários artigos a propósito de uma afirmação, deve ser feita por ordem cronológica, por exemplo (Taylor e Burns, 1974; Taylor et al., 1981) e dentro desta por ordem alfabética.

Na secção “Bibliografia” deve constar todos e apenas os trabalhos citados, listados por ordem alfabética onomástica. No caso de publicações periódicas devem indicar-se nome dos autores, ano de publicação, título completo do

trabalho, nome da publicação, volume, primeira e última páginas. Siga os pontos, vírgulas e formatação dos exemplos que se seguem:

Barata GN e Calheiros FC (1981). Eficiência na produção de carne ovina - estudo dos seus parâmetros genéticos. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 79: 91-108.

Burkgren T, Vogel L (2006). Stakeholder position paper: Food animal veterinarian. Prev Vet Med, 73(2-3): 177-179.

No caso de se tratar de livros ou secções de livros, devem indicar-se nome dos autores, ano de publicação, título do capítulo ou secção do livro se se aplicar, título do livro em itálico, nome dos editores, nº da edição se não for a primeira, editora, primeira e última páginas. Por exemplo:

Armitage P e Berry G (1987). Statistical methods in medical research. Blackwell Scientific Publications (Oxford).

O'Brien M e Gottlieb LS (1979). The liver and biliary tract. In: Pathologic basis of disease, 2ª edição. Editores: SL Robbins e RS Cotran. W.B. Saunders Company (Filadélfia, Londres, Toronto), 1009-1091.

Quando forem citados diversos trabalhos de um mesmo autor devem aparecer primeiro os trabalhos em que ele é o único autor, depois os trabalhos em que haja um segundo autor, listados por ordem alfabética deste segundo autor, e por fim os trabalhos em que haja mais co-autores. Dentro de cada um destes grupos os trabalhos devem ser ordenados cronologicamente e quando haja necessidade, a seguir ao ano de publicação, indicar-se-á a, b, etc. (por exemplo: 1981a, 1981b, etc.)

Em todos os trabalhos, independentemente da matéria versada e da forma de apresentação, devem usar-se as grandezas e unidades do Sistema Internacional de Unidades (SI) e os prefixos SI para indicar os seus múltiplos e submúltiplos decimais. O sinal decimal deve ser a vírgula e apenas nos textos em inglês, o ponto. Deve deixar-se um espaço entre o número e a unidade (por exemplo: 2,3 g e não 2,3g; 37 °C e não 37oC).

As abreviaturas devem ser apresentadas por extenso da primeira vez que aparecem no texto salvo se se tratar de abreviaturas que sejam partilhadas pela generalidade da comunidade científica veterinária.

Não há limites rigorosos de tamanho para os artigos a publicar mas os textos devem ser concisos e como indicador estabelece-se como limite máximo 7000 palavras para os artigos de revisão, 5000 palavras para memórias científicas

originais em formato convencional, 3000 palavras para as comunicações breves e 1500 palavras para as notas técnicas.

As figuras, gráficos e tabelas devem ser integradas no texto e não devem exceder 8 nas memórias científicas originais em formato convencional, 4 nas comunicações breves e 2 nas notas técnicas. Só quando o teor do artigo e a clareza da exposição manifestamente o exigirem se aceitarão manuscritos que excedam estes limites. As fotografias devem ser enviada não só no texto como também em ficheiro separado de formato apropriado (.tif, .jpeg).

Publicação dos artigos

Os artigos submetidos são apenas considerados como submetidos após verificação do cumprimento das regras acima descritas. Uma vez submetidos, são confidenciais até à sua publicação. Todos os trabalhos são apreciados por dois revisores a quem a comissão editorial reconheça mérito na matéria versada. O conteúdo das revisões será transmitido aos autores. Em caso de aceitação, o autor deverá incorporar no artigo as sugestões dos revisores ou manifestar a sua posição, ponto por ponto.

Qualquer esclarecimento pode ser solicitado à Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, Edifício Escola Superior de Medicina Veterinária, Rua Gomes Freire 1169-014 LISBOA, Tel. 21 358 02 22, Fax 21 358 02 21, E-mail: spcvet@spcvet.pt.

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A INSERÇÃO DO TRANSPOSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE.

TUMOR TRANSMISSIBLE VENEREAL DISEASE SPONTANEOUS CANINE: THE INSERTION OF TRANSPOSON LINE-1 IN GENE C-MYC AND THE CRITERIA OF MALIGNANCY.

Trabalho submetido para a Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.

ISSN 0035-0389

Normas para a publicação disponíveis em anexo.

MEMÓRIA CIENTÍFICA ORIGINAL

Luciano Santos da Fonseca^{1*}; Lígia Souza Lima Silveira da Mota²; Sandra Bassani Silva³; Cláudia Valéria Seullner Brandão⁴ Noeme Sousa Rocha⁵

6. Mestrando na área de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Campus de Botucatu, Brasil
7. Professora Assistente Doutora do Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Unesp, Campus de Botucatu, Brasil
8. Doutora na área de Clínica Veterinária pela Unesp, veterinária autônoma, Campus de Botucatu, Brasil
9. Professora Assistente Doutora do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Campus de Botucatu, Brasil
10. Professora Livre-docente do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Campus de Botucatu, Brasil

Apoio: CNPq

Correspondência
Luciano Santos da Fonseca
Telefone/fax: (14) 3811 6293
Lucianofonseca76@gmail.com

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A INSERÇÃO DO TRANSPOSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE.

RESUMO

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) é a segunda neoplasia mais frequentemente diagnosticada em cães no Serviço de Patologia de Botucatu. Este trabalho teve por objetivo identificar os critérios citopatológicos de malignidade pela técnica de Papanicolaou e detectar nas células do TVT espontâneo canino o elemento de transposição LINE-1 inserido no gene *c-MYC* como alteração genética específica por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e do sequenciamento genético nos grupos linfocitóide e plasmocitóide verificando se há diferença entre os achados morfológicos e moleculares. Para tal, foram utilizados 35 animais sendo 77% sem raça definida (SRD) que apresentavam TVT localizado, na maioria dos casos, nos órgãos genitais. Com a coloração de Papanicolaou, os critérios de malignidade nucleares comuns para ambos os grupos observados foram, espessamento da membrana nuclear, ranhura nuclear, nucléolo angular e halo perinucleolar. A região amplificada correspondente ao rearranjo apresentou um produto de 340pb em 100% das amostras analisadas. O sequenciamento genético confirmou a presença do rearranjo LINE-1/*c-MYC* e o grau de identidade entre as sequências obtidas e as já depositadas em banco de dados (GenBank) variou de 94 a 96%. Concluiu-se que o emprego da coloração com Papanicolaou constituiu grande contribuição não apenas para o diagnóstico citológico do TVT, como também, uma ferramenta valiosa para evidênciação de critérios de malignidade que normalmente não são visualizados

quando se utiliza corantes tipo Romanowsky e que a especificidade da alteração genética LINE-1/c-MYC em relação ao TVT é indiscutível quanto a sua monoclonalidade. Em futuras investigações, este estudo poderá servir de esteio para correlacionar morfologia, critérios de malignidade e estudos moleculares ainda não realizados em conjunto para o TVT.

Palavras-Chave: cão – TVT - citologia – c-MYC – LINE-1

TUMOR TRANSMISSIBLE VENEREAL DISEASE SPONTANEOUS CANINE: THE INSERTION OF TRANSPOSON LINE-1 IN GENE C-MYC AND THE CRITERIA OF MALIGNANCY.

SUMMARY

The Tumor Transmissible Venereal disease (TVT) is the second neoplasia more frequent diagnosed in dogs in the Service of Pathology of Botucatu. This work had for objective to identify the cytopathologies criteria of malignance for the technique of Papanicolaou and to detect in the cells of the canine spontaneous TVT the element of inserted transposition LINE-1 in the gene c-MYC as specific genetic alteration by means of the Reaction in Chain of Polimerase (PCR) and the genetic sequencing in the groups linfocitóide and plasmocitóide verifying if it has difference between the morphologic and molecular findings. For such, 35 animals being 77% without definite race had been used (SRD) that they presented located TVT, in the majority of the cases, in the agency genital. With the Papanicolaou stain, the common nuclear criteria of malignance for both the observed groups had been, thickening of the nuclear membrane, angular nuclear groove, nucleoli and haloperinucleoli. The region amplified corresponding to the rearrangement presented a product of 340pb in 100% of the analyzed samples. The genetic sequencing confirmed the presence of the LINE-1/c-MYC rearrangement and the degree of identity between the gotten sequences and already deposited

in data base (GenBank) varied of 94 96%. It was concluded that the job of the Papanicolaou staining not only constituted great contribution for the cytological diagnosis of the TVT, as well as, a valuable tool for evidencion of malignance criteria that are normally not visualized when Romanowsky type is used stains and that the specific of the genetic alteration LINE-1/c-MYC in relation to the TVT is unquestionable how much its monoclonal. In future inquiries, this study it will be able to serve to correlate morphology, criteria of malignance and molecular studies not yet carried through in set for the TVT.

Keywords: dog – TVT - cytology – c-MYC – LINE-1

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL ESPONTÂNEO CANINO: A INSERÇÃO DO TRANSPOSON LINE-1 NO GENE C-MYC E OS CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE.

INTRODUÇÃO

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) é a segunda neoplasia mais frequentemente diagnosticada em cães no Hospital Veterinário de Botucatu, São Paulo, perdendo apenas para os tumores de mama em cadelas (Hataka, 2003; Amaral, 2004).

As células do TVT canino espontâneo se implantam e se desenvolvem na mucosa da genitália e em outras mucosas, pela quebra de suas integridades (Nielsen e Kennedy, 1990; Harmelin et al., 2001; Papazoglou et al., 2001; Rivera et al., 2005).

A avaliação citológica tornou-se uma técnica diagnóstica extremamente útil para a confirmação das suspeitas de TVT, não só pela sua eficácia que varia de 90 a 96%, mas também por ser simples, barata, de fácil aplicação na rotina, causando menos distorção da morfologia celular (Miller et al., 1990; Kroger et al., 1991; Rocha, 1998; Erünal-Maral et al., 2000; Cowell e Tyler, 2008).

Encontram-se na literatura trabalhos que mostram diferentes formas quanto a expressão morfológica influenciando o comportamento

biológico do tumor (Mohanty e Rajya, 1977; Rogers et al., 1998; Varaschin et al., 2001) e para isto são preconizados critérios de malignidade comuns e menos frequentes em neoplasias. Os critérios de malignidade gerais incluem hipercelularidade, anisocitose e pleomorfismo. Quanto aos critérios nucleares cita-se macrocariose, aumento da relação núcleo:citoplasma, anisocariose, multinucleação, mitoses anormais, padrão de cromatina, amoldamento nuclear, dentre outros. Para os critérios citoplasmáticos, vacuolização citoplasmática, espessamento da membrana e basofilia (Raskin e Meyer, 2003; Cowell e Tyler, 2008). Hoje se tem conhecimento da existência de dois grupos morfológicos denominados plasmocitóide e linfocitóide (Amaral, 2005).

Para o diagnóstico e evidenciação de critérios de malignidade trabalhos indicam que corantes do tipo Romanowsky (Giemsa) são mais adequados pelas reações químicas que produzem nas células quando dissolvidos em álcool metílico (Cowell e Tyler, 2008; Magalhães et al., 2001; Meuten, 2008).

Em contrapartida, a coloração de Papanicolaou é extremamente valiosa porque acentua grandes variações quanto à morfologia celular, os vários graus de maturidade celular e a atividade metabólica das células. As principais vantagens desta coloração são a definição detalhada dos critérios nucleares, transparência citoplasmática e diferenciação celular eficaz para evidenciar tais alterações nas células neoplásicas (Papanicolaou, 1932; Jörundsson et al., 1999; Magalhães et al., 2001; Cowell e Tyler, 2008; Meuten, 2008).

O TVT difere de células somáticas do cão e se caracteriza por ser uma das neoplasias mais antigas e em contínua propagação entre hospedeiros. Acredita-se que tenha surgido entre 200 e 2.500 anos atrás. Apesar disso, sua origem permanece incerta (Macewen, 2001; Catone et al., 2003; Dingli e Nowak, 2006; Murgia et al., 2006; Vonholdt e Ostrander, 2006).

O número somático normal do cão é de 78 cromossomos, sendo todos os autossomos de morfologia acrocêntrica. Nos estudos de citogenética

clássica, observa-se que as células do TVT exibem entre 57 a 59 cromossomos, sendo vários deles de morfologia submetacêntrica ou metacêntrica (Cohen, 1978; Cohen, 1985; Vermooten, 1987; Rogers, 1997; Hasler e Weber, 2000; Macewen, 2001). Esses rearranjos podem ser decorrentes de fusões, sem que haja perda ou ganho de material genético (Hahn, 1998). Esta é uma explicação para a diferença no número de cromossomos da célula somática normal do cão e a célula do TVT.

Dentre as alterações moleculares mais frequentes encontradas no TVT destaca-se o rearranjo do proto-oncogene *c-MYC*, resultante da inserção do segmento de DNA repetitivo de 1,5 Kb pertencente à família dos elementos genéticos de transposição, conhecidos como LINE (*Long Interspersed Element*) (Katzir et al., 1987; Amariglio et al., 1991; Chu et al., 2001; Choi et al., 2002).

Análises moleculares de TVT revelaram a inserção destes segmentos nas mediações do proto-oncogene *c-MYC*, não ocorrendo em células normais de cães (Katzir et al., 1985; Amariglio et al., 1991; Choi et al., 1999; Chu et al., 2002). As aberrações cromossômicas constantes e específicas do TVT, como o rearranjo da sequência LINE-1/*c-MYC*, é idêntica a esse tumor confirmando a sua monoclonalidade (Amariglio et al., 1991; Mukaratirwa et al., 2003; Murgia et al., 2006; Vonholdt et al., 2006).

Este trabalho teve por objetivo identificar os critérios citopatológicos de malignidade pela técnica de Papanicolaou e detectar nas células do TVT espontâneo canino o elemento de transposição LINE-1 inserido no gene *c-MYC* como alteração genética específica por meio da PCR e do sequenciamento genético nos grupos classificados como linfocitóide e plasmocitóide verificando se há diferença entre os achados morfológicos e moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal e com o consentimento livre e esclarecido dos proprietários,

foram utilizados 35 cães sem restrição de sexo, raça ou idade, provenientes do Hospital Veterinário, FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu, Brasil entre o período de agosto de 2006 a outubro de 2008.

Estes animais tiveram o diagnóstico citopatológico para TVT e as amostras foram então coletadas no ambulatório do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais por meio de esfoliação com escova cervical de Ayra utilizando a coloração de Giemsa e processadas no Serviço de Patologia Veterinária da referida instituição. Desse material escovado, foram utilizadas 6 lâminas histológicas de cada grupo citomorfológico fixadas imediatamente em álcool etílico a 95% de cada amostra para serem coradas com Papanicolaou e montadas em resina Permunt para evidência dos critérios de malignidade nucleares.

A observação das lâminas histológicas para verificação da celularidade da amostra, padrão de coloração e distribuição das células foi feita microscópio de luz polarizada modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha).

Vale ressaltar que as amostras de TVT apresentam ambos os componentes linfocitóides e plasmocitóides. Desta forma, padronizou-se que o TVT linfocitóide apresenta uma contagem de células acima de 60% com morfologia arredondada, citoplasma escasso e finamente granular, com presença de vacúolos que acompanham a periferia da célula, núcleo central com cromatina grosseira e presença de um ou dois nucléolos evidentes. Para o grupo plasmocitóide, o mesmo deve apresentar contagem de células acima de 60% com morfologia ovóide, citoplasma mais abundante (menor relação núcleo:citoplasma), com núcleo localizado excentricamente.

Foram realizadas as contagens das amostras, sendo duas lâminas para cada amostra por meio do analisador de imagens com auxílio de microscópio de luz polarizada modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), onde eram contados 10 campos aleatórios sempre procurando escolher áreas onde as células se encontravam mais esparsas. Essas células eram marcadas, processadas e digitalizadas pelo programa computacional *Axionvision Software*

Rel. versão 4.3 (Zeiss Vision, Alemanha) instalado na aparelhagem perfazendo um total de 1.000 células contadas para classificação nos grupos plasmocitóide ou linfocitóide. Após o término da contagem e confirmação da classificação, essas lâminas eram novamente levadas ao microscópio óptico de luz polarizada modelo Axio Imager A1 para observação dos critérios de malignidade mais significantes. Levou-se em consideração tanto critérios gerais como aqueles menos comuns.

A análise molecular procedeu-se no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biociências, Unesp, Campus de Botucatu.

As 35 amostras obtidas pela técnica citológica de esfoliação, foram colocadas em solução tampão fosfato salina (PBS) em criotubo e armazenadas a -20 °C por 9 meses (Hirata et al., 2006). Posteriormente, procedeu-se a extração do DNA genômico por meio do *Kit* Comercial Illustra™ Tissue & Cells GenomicPrep Mini Spin Kit de acordo com as normas do fabricante.

Amostras de 3 mL de sangue total foram colhidas utilizando-se tubo vacutainer (BD, EUA) contendo 7,5 mg de EDTA de 3 cães clinicamente sadios como controle negativo e 4 cães com TVT para os controles positivos. Para a extração do DNA genômico, foi empregado o *Kit* Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit, segundo normas do fabricante.

Para a avaliação da integridade do DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, coradas com brometo de etídeo, visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta no aparelho de fotodocumentação Eagle Eye II Stratagene. A quantificação das amostras foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop® ND - 1000 *Spectrophotometer* e a qualidade determinada pela razão das absorbâncias de 260/280nm. Todas as amostras de DNA foram diluídas para uma concentração de 10 ng/μL.

Para detectar a presença do marcador molecular LINE-1/c-MYC utilizou-se os oligonucleotídeos MYC.S 5'ATGCACCAAGATTTTCTTCACTGC 3' (Chu et al., 2001), específico para o éxon 1 do gene MYC e

LINE.A

5'ATCCTAGAGAAGAACACAGGCAACAC 3'
(Amariglio et al., 1991), específico para o segmento LINE-1. Como controle da reação de amplificação foram utilizados os oligonucleotídeos HBGA.S 5'CGGTATTTGGAGGTCAGCAC 3' e HBGA.A 5'CCCACCACCAAGACCTACTT 3' responsáveis pela amplificação de um segmento de 480pb do gene da hemoglobina humana (Venta et al., 1996).

Cada reação de PCR consistiu de um volume final de 25 µL contendo 10 µM de cada oligonucleotídeo, 4 µL de PCR Master Mix (Promega) e 6 µL de água mili-Q autoclavada e 10ng/µL de DNA. As reações foram realizadas em termociclador PTC-100™ (MJ Research), apresentando desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 minuto, hibridação a 64°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

A análise dos produtos de amplificação foi realizada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo por um período de 1h50m a 100volts. A visualização dos produtos foi feita no Sistema de fotodocumentação Eagle Eye II Stratagene.

Para purificação do produto de PCR, empregou-se o *Kit comercial GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (Amershan Biosciences)* segundo normas do fabricante.

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop® ND -1000 Spectrophotometer*. Do total de amplificações, 3 , sendo 2 amostras do grupo plasmocitóide e 1 do grupo linfocitóide foram seqüenciadas no aparelho de sequenciamento *ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Perking-Elmer)*. As sequencias geradas foram alinhadas e analisadas utilizando os programas *BioEditW versão 7.0.4.1* e *Clustal W Multiple Sequence Alignment Program, v1.7*.

RESULTADOS

A coloração com Giemsa otimizou o diagnóstico citológico tanto para os grupos

plasmocitóide (Figura 1) como linfocitóide (Figura 2). Os critérios mais comuns foram observados e pode-se também observar alguns critérios de malignidade nucleares que dificilmente seriam visualizados com essa coloração (Figura 3).

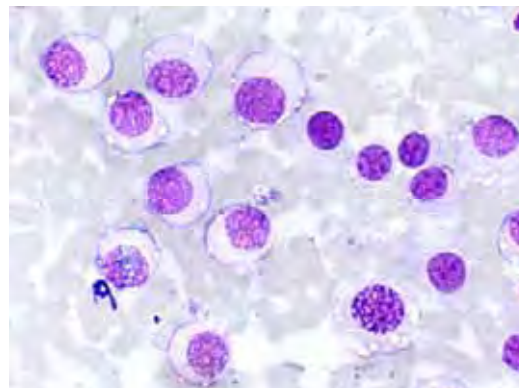


Figura 1. Tumor Venéreo Transmissível: morfologia plasmocitóide - Giemsa.

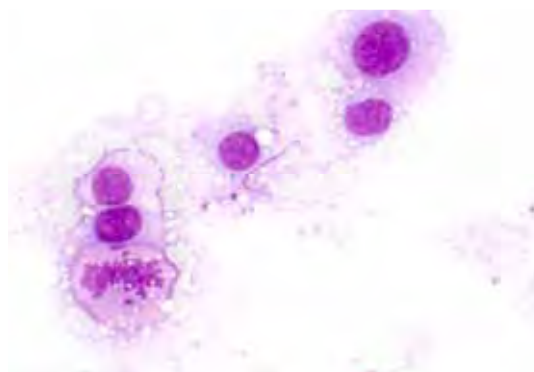


Figura 2. Tumor Venéreo Transmissível: morfologia linfocitóide - Giemsa.

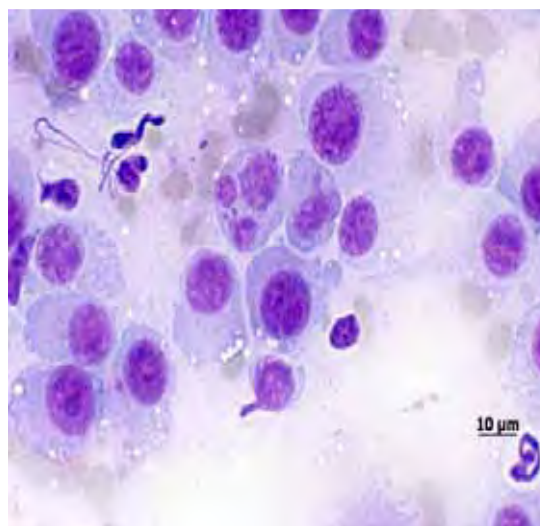


Figura 3. Critérios de Malignidade Cão. Esfoliação. Ranhura nuclear e espessamento da membrana nuclear; nucléolo angular; padrão grosseiro da cromatina nuclear com grau moderado de anisocitose e anisocariose – (Objetiva 40x 2,5 - barra: 10µm). Giemsa

A coloração com Papanicolaou, no entanto, evidenciou os critérios de malignidade nucleares com grande riqueza de detalhes e observados em ambos os grupos citomorfológicos como o espessamento da membrana nuclear, ranhura nuclear, nucléolo angular e halo perinucleolar (Figura 4).

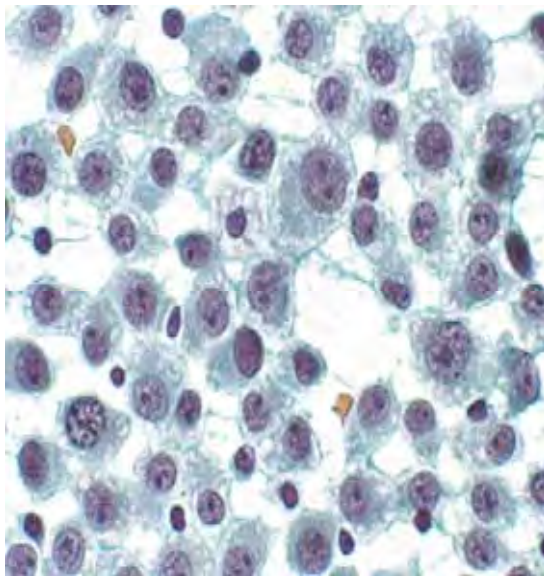


Figura 4. Critérios de Malignidade Cão. Esfoliação. Ranhura nuclear e espessamento da membrana nuclear; nucléolo angular; padrão grosseiro da cromatina nuclear com grau moderado de anisocitose e anisocariose – (Objetiva 40x 2,5 - barra: 10µm). Papanicolaou.

Neste estudo, procurou-se também observar a respeito de dados dos animais quanto a incidência de raça, sexo, idade, localização e tempo de evolução independente dos grupos citomorfológicos quando estas informações estavam disponíveis pelas fichas do prontuário ou por meio de informações obtidas do próprio proprietário. Pode-se constatar que em relação a raça, dos 35 animais estudados, 27 animais eram SRD perfazendo um total de 77%. O restante (23%) eram das mais variadas raças como Cocker (01), Poodle (01), Border Collie (01), Fox Paulistinha (01), Fila Brasileiro (01) e Pastor Belga (01). Quanto ao sexo, 21 animais eram machos e 14 eram fêmeas. A idade dos animais variou entre 2 a 14 anos.

A localização do tumor predominante em machos foi encontrada na base do pênis, bulbo peniano, prepúcio e glândula. Nas fêmeas, o assoalho vaginal foi a área mais freqüente, embora houvessem

quatro casos onde o TVT foi diagnosticado em sua forma extragenital (Figuras 5 e 6).



Figura 5. Localizações extragenitais do TVT. Nódulo liso esbranquiçado na córnea (A).



Figura 6. Localizações extragenitais do TVT. Massas lobuladas róseas de tamanhos diferentes em região inguinal (B).

Quanto ao tempo de evolução, a dificuldade em se obter informações dos proprietários dificultou uma análise mais precisa na intenção de aliar tempo de evolução com outros aspectos clínico-epidemiológicos. Mesmo assim, conseguiu-se constatar que dos 35 animais estudados, vinte animais (57%) tinham livre acesso a rua, um animal adquiriu a doença após o cruzamento e um animal vivia em área rural (sítio) com uma grande quantidade de cães. Pode-se obter algumas informações quanto ao tempo de evolução de alguns animais onde sete animais apresentaram evolução de três meses, um animal apresentou evolução de 6 meses e dos outros vinte e dois animais não foi possível obter tal informação visto que alguns proprietários recolheram tais animais na rua.

Quanto à reação da PCR, não houve amplificação do fragmento de 340 pb em nenhuma amostra de sangue de animais clinicamente saudáveis (controle negativo) mas houve a amplificação nos controles positivos (Figura 7). Os fragmentos

amplificados das amostras de TVT apresentaram aproximadamente 480pb e 340pb referentes ao gene de hemoglobina humana e a região alvo LINE-1/*c*-MYC, respectivamente (Figura 8). O sequenciamento genético das amostras confirmou a presença do rearranjo LINE-1/*c*-MYC nos animais com TVT fato comprovado pelo alinhamento das sequencias obtidas com as já depositadas em banco de dados mostrando um grau de identidade de 94 a 96%. Não foi detectada nenhuma outra alteração genética entre os grupos citomorfológicos.



Figura 7. Sangue de cães acometidos com TVT (Controle Positivo), amplificando o rearranjo Line/MYC em 340 pb (3,5,7,9); controle interno da reação utilizando primers HGBA (2,4,6,8); marcador de peso molecular (1).

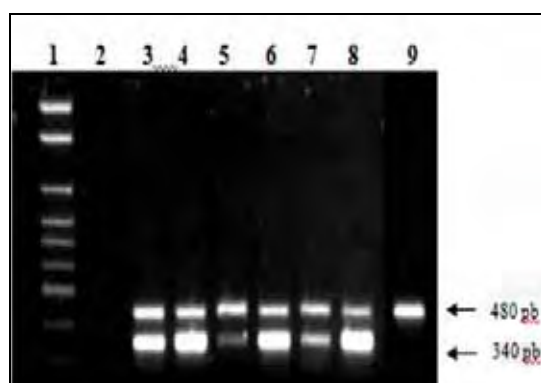


Figura 8. Resultado da eletroforese em gel de agarose a 1%: Coluna 1- marcador de peso molecular 100pb; Coluna 2: controle negativo (sem DNA); Colunas 3 a 8: amostras de TVT amplificadas; Coluna 9: amostra de cão sadio.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que as células de TVT exibem critérios citológicos indicativos de malignidades. Isto sugere que as células do TVT, assim como as de outras neoplasias exibem variações

importantes na forma e volume devido aos seus constituintes, principalmente cromatina nuclear. É importante verificar que por convenção se diz que as células neoplásicas que demonstram esses critérios estão na fase progressiva, isto é, expressa fenotipicamente, característica de instabilidade do genoma. Tais características são conseqüências de uma infinidade de alterações que ocorrem nos genes responsáveis principalmente por fatores de crescimento. Que parece ser fundamental para expansão clonal de células neoplásicas (Lopes et al., 2002; Ruggiero e Bustudabad, 2006; Ojopi e Neto, 2004; Meuten, 2008).

Neste estudo, os critérios de malignidade gerais não fugiram do que é preconizado pela literatura (Mitre et al., 1997; Meinkoth e Cowell, 2002). A anisocariose e anisocitose marcante no TVT plasmocitóide e discreta a moderada no TVT linfocitóide (Albanese et al., 2002; Amaral, 2005). A hipercelularidade, a variação dos padrões de cromatina, nucléolos únicos e múltiplos, ranhura nuclear também foram descritos pela literatura (Raskin e Rebar, 2006). A macrocariose também muito encontrada nessas amostras denota um grau significativo de malignidade principalmente em núcleos maiores que 10µm (Meinkoth e Cowell, 2002).

Algumas características muito frequentemente encontradas como, brotamentos nucleares responsáveis pela formação de micronúcleos (Bindu et al., 2003), espessamento da membrana nuclear e frequentes em tumores da tireóide em humanos (Mckinley, 2004) e a irregularidade da vacuolização citoplasmática, às vezes até ausente (Rogers, 1997) chamam atenção, pois entram em acordo com o que já havia sido proposto por literatura recente (Amaral, 2005).

A utilização da coloração com Papanicolaou foi de fundamental importância para evidenciação dos critérios nucleares que nem sempre são visualizados pelos corantes de Romanowsky (Giemsa), embora se constatasse alguns critérios nucleares com essa coloração como, brotamentos nucleares, espessamento da membrana e a ranhura nuclear muito encontrada em tumores de mama

(Ozkara et al., 2002). Pode-se constatar variação na quantidade de nucléolos evidentes de um grupo citomorfológico onde segundo pesquisadores, o maior número de nucléolos indica a tendência a tumores mais antigos (Rogers, 1997; Erüinal-Maral et al., 2002; Meinkoth e Cowell, 2002; Amaral, 2005).

É importante frisar que sem o emprego associado das duas colorações, Giemsa e Papanicolaou, não seriam possíveis tais evidências dos critérios de malignidade citoplasmáticos e nucleares discordando de alguns pesquisadores que relatam que o Papanicolaou não se constitui um método prático para tal, pois, em alguns casos há o inconveniente de se encontrar áreas onde células já se encontravam dessecadas (Magalhães et al., 2001). Fato este não constatado nesse estudo. Outros pesquisadores recomendam a modificação do protocolo desta coloração designada para a citologia exfoliativa (Jörundsson et al., 1999).

Segundo pesquisas realizadas comparando as colorações do tipo Romanowsky e Papanicolaou, a segunda foi considerada a coloração de escolha para a citopatologia veterinária embora a mesma prejudique a avaliação de critérios de malignidade citoplasmáticos ainda que o recomendado fosse a associação de ambas as colorações (Jörundsson et al., 1999).

Para a classificação dos grupos citomorfológicos foram utilizadas não só as particularidades comuns a ambos os grupos como também a padronização da contagem de células em 10 campos aleatórios para verificação do tipo celular predominante (Amaral, 2005). A possibilidade da utilização da técnica de microdissecção a laser para separação de células e seu emprego na análise molecular não pôde ser empregada neste estudo visto que é uma técnica recente, minuciosa e ainda não utilizada para amostras citológicas, pois seu emprego é mais frequentemente utilizado para amostras histológicas como tecidos incluídos em parafina inviabilizando o seu uso. Além disso, no Brasil há raros microscópios para tal técnica que possui grande potencial para diagnóstico e investigação científica (Ihlaseh et al., 2007).

Foram avaliados 35 animais onde 21 animais eram machos e 14 eram fêmeas. Apesar do maior número de machos, a diferença entre macho e fêmeas foi muito pequena corroborando com achados da literatura que não assumem uma clara predisposição sexual visto que alguns autores encontraram uma maioria absoluta em fêmeas (Sobral et al., 1998) e outros em machos (Varaschin et al., 2001). Neste estudo, optou-se por concordar com os demais pesquisadores que negam qualquer preferência quanto ao sexo dos animais (Cohen, 1985; Das e Das, 2000). As idades variam entre 2 a 14 anos com uma frequência maior de cães acometidos com 4 anos de idade. Esses dados estão de acordo com o descrito na literatura onde animais que apresentam intensa atividade sexual se encontram na faixa etária de três a cinco anos (Sobral et al., 1998; Das e Das, 2000; Amaral et al., 2004). Notou-se realmente a queda na casuística de animais atingidos a partir dos 5 anos de idade.

Quanto à raça, podemos notar que dos 35 animais estudados, 27 animais (77%) eram SRD concordando com os achados da literatura que agrupam esses animais em uma população típica de cães de rua ou por puro descaso do proprietário do animal (Brandão et al., 2002; Amaral, 2005; Lefebvre et al., 2007).

Quanto à localização, o tumor foi detectado, na maioria dos casos, nos órgãos genitais, correspondendo praticamente à maioria absoluta. Apenas quatro casos foram reportados em sítios extragenitais (um na região anal, dois na região cutânea e um caso na córnea). De fato, a localização genital foi mais frequente do que o acometimento cutâneo e nasal (Das e Das, 2000; Martins et al., 2005; Duarte et al., 2006). Com relação aos machos, os locais de maior predileção foram os mesmos citados por outros autores (Nak et al., 2005) como a base do pênis, bulbo peniano e glândula assim como nas fêmeas o assoalho vaginal.

Quanto ao tempo de evolução, não foi possível uma coleta de dados devido à própria desinformação do proprietário que recolheu tais animais na rua. Apenas sete animais apresentaram evolução de três meses (90 dias), cinco animais

apresentaram evolução de quatro a sete dias e um animal apresentou evolução de 6 meses. Segundo a literatura, o crescimento tumoral aparece de 15 a 60 dias após a implantação (Duarte et al., 2006). Ainda existe uma grande dificuldade em inferir dados quanto ao tempo de evolução dos casos de TVT devido à falta de informação por parte dos proprietários.

As concentrações de DNA obtidas variaram de 3,9 a 131,8ng/μL apresentando reações de absorvância de 260/280nm entre 1,8 a 2,0 indicando assim a pureza das amostras. Os valores obtidos estão de acordo com os encontrados por autores que trabalharam com TVT. Estes achados não comprometeram as aplicações para a PCR, pois, esta técnica pode ser realizada com ínfimas quantidades de DNA (Pereira et al. 2001) obtendo-se a amplificação do rearranjo LINE-1/c-MYC (Chu et al., 2001; Choi et al., 2002).

A reação de PCR constituiu um método de fácil execução, simples e rápido e de extrema sensibilidade para a detecção do rearranjo (Ceccato-Antonini et al., 2004; Silva e Andrade, 2001; Molina e Tobo, 2004).

A detecção do rearranjo LINE-1/c-MYC amplificou um fragmento de 340pb, diferente de outros trabalhos (Choi et al., 1999; Chu et al., 2001) que obtiveram um fragmento de 550pb. Esse fato pode ser explicado devido à amplificação de diferentes segmentos do gene *c-MYC* contendo a inserção LINE.

Estudos com células de TVT, inclusive o nosso detectaram o rearranjo LINE-1/c-MYC nas células, sem distinção, o que não foi observado nas células sanguíneas de cães sem o tumor. Autores defendem a teoria que a especificidade do rearranjo LINE-1/c-MYC encontradas apenas nas células do TVT explica o aparecimento e a manutenção desta neoplasia nos diferentes continentes do mundo por todo este tempo (Murgia et al., 2006; Vonholdt et al., 2006).

Após o sequenciamento do produto da PCR, constatou-se ser a região amplificada realmente, parte do rearranjo LINE-1/c-MYC, por meio de buscas em banco de dados (GenBank)

(Katzir et al., 1985; Amariglio et al., 1991; Choi et al., 1999; Choi et al., 2002; Liao et al., 2003; Murgia et al., 2006).

Os resultados apresentados nesse trabalho estão de acordo com dados da literatura que utilizaram não só a PCR como teste padrão, mas também outros métodos moleculares constando a ausência do rearranjo LINE-1/c-MYC em outros tumores (Chu et al., 2001) e sua especificidade para o TVT. Estudos com células de TVT, inclusive o nosso detectaram o rearranjo LINE-1/c-MYC nas células, sem distinção, o que não foi observado nas células sanguíneas de cães sem o tumor. Autores defendem a teoria que a especificidade do rearranjo LINE-1/c-MYC encontradas apenas nas células do TVT explica o aparecimento e a manutenção desta neoplasia nos diferentes continentes do mundo por todo este tempo (Katzir et al., 1985; Amariglio et al., 1991; Choi et al., 1999; Choi et al., 2002; Liao et al., 2003).

No entanto, estes mesmos autores relatam a necessidade de mais estudos para saber qual o verdadeiro papel dessa alteração genética no TVT, o mecanismo de transposição envolvido e a sua participação nesta neoplasia.

É importante ressaltar que somente este rearranjo seja responsável por todas essas alterações fenotípicas encontradas nos resultados de nosso trabalho, como as atipias citológicas do tipo aumento no volume dos núcleos, hiper cromasias, halo perinuclear, ranhura, alterações da relação núcleo/citoplasma e o grau de atividade mitótica. Esses critérios foram adaptados dos já estabelecidos para lesões, isto é, marcadores preditivos do comportamento biológico de neoplasias (Liao et al., 2003; Meuten, 2008).

CONCLUSÃO

Concluiu-se que o emprego associado das colorações de Giemsa e Papanicolaou constituiu uma grande contribuição não apenas para o diagnóstico citológico do TVT, como também, uma técnica valiosa para evidênciação de critérios de malignidade que normalmente não são visualizados quando se

utiliza apenas os corantes de rotina tipo Romanowsky.

Quanto à predisposição racial a maioria dos cães são sem raça definida devido à grande quantidade de cães de rua; no entanto, não foi constatada predileção quanto a sexo e idade e a localização genital continua sendo a mais comum, embora chame a atenção para aqueles casos extragenitais encontrados nesse trabalho. Quanto ao tempo de evolução, ainda é muito difícil se inferir quaisquer dados estatísticos devido à própria falta de informação por parte dos proprietários.

A especificidade da alteração genética LINE-1/c-MYC é indiscutível como preconizado pela literatura especializada e reafirmada ainda pelo sequenciamento genético quanto a sua monoclonalidade.

Para futuras investigações, este estudo poderá servir de esteio para correlacionar morfologia, critérios de malignidade, grau de agressividade e estudos moleculares ainda não realizados em conjunto para o TVT, bem como, outras metodologias para o melhor entendimento de sua carcinogênese.

Portanto, julgamos relevante prosseguir nas investigações para melhor definir a natureza biológica dessa neoplasia, compreender o porquê determinados cães quando desenvolve o TVT espontâneo e quando submetidos à quimioterapia, cujo objetivo é eliminar o tumor e possíveis focos de metástases, por vezes, não é alcançado.

E já de antemão recomendar que se o profissional especialista no assunto for empregar o exame citológico para o diagnóstico de TVT que seja aplicado à coloração de Papanicolaou para facilitar a identificar expressão dos critérios de malignidade, para que possa auxiliar na sessão de quimioterapia.

REFERÊNCIAS

63. 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):243-6.

64. Amaral AS, Gaspar LFJ, Silva SB, Rocha NS. Exame citológico como método diagnóstico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (Estudo Retrospectivo: 1994-2002). Rev Port Cienc Vet. 2004; 99:167-71.
65. Amaral AS. Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA [thesis]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2005.
66. Amariglio EN, Hakim I, Brok-Simoni F, Grossman Z, Katzir N, Harmelin A, et al. Identity of rearranged LINE/c-MYC junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88(18):8136-9.
67. Brandão CV, Borges AG, Ranzani JJT, Rahal SC, Teixeira CR, ROCHA NS. Tumor Venéreo Transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). Rev Educ Contin CRMV-SP. 2002; 5(1):25-31.
68. Bindu L, Balaram P, Mathew A, Remani P, Bhattathiri VN, Nair MK. Radiation-induced changes in oral carcinoma cells - a multiparametric evaluation. Cytopathology. 2003; 14(5):287-93.
69. Catone G, Marino G, Poglayen G, Gramiccia M, Ludovisi A, Zanghi A. Canine venereal tumour parasited by *Leishmania infantum*. Vet Res Commun. 2003; 27(7):549-53.
70. Ceccato-Antonini SR, Meneghin SP, Urashima AS. Técnicas básicas de biologia molecular. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos (apostila); 2004.
71. Choi Y, Ishiguro N, Shinagawa M, Kim CJ, Okamoto Y, Minami S, et al. Molecular structure of canine LINE-1 elements in canine transmissible venereal tumor. Anim Genet. 1999; 30(1):51-3.
72. Choi Y, Kim CJ. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 gene in canine

- transmissible venereal tumor. J Vet Sci. 2002; 3(4):285-92.
73. 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(6A):4917-24.
 74. Chu RM, Sun TJ, Yang HY, Wang DG, Liao KW, Chuang TF, et al. Heat shock proteins in canine transmissible venereal tumor. Vet Immunol Immunopathol. 2002; 82(1-2):9-21.
 75. Cohen D. The transmissible venereal tumor of the dog – a naturally occurring allograft? A review. Isr J Med Sci. 1978; 14:14-9.
 76. Cohen D. The Canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. Adv Cancer Res. 1985; 43:75-112.
 77. Cowell RL, Tyler RD. Cytology of cutaneous lesions. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2008; 19(4):769-94.
 78. Das U, Das AK. Review of canine transmissible venereal sarcoma. Vet Res Commun. 2000; 24(8):545-56.
 79. Dingli D, Nowak MA. Cancer biology: infectious tumour cells. Nature. 2006; 443(7107):35-6.
 80. 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):1018-23.
 81. Erüinal-Maral N, Findik M, Aslan S. Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 2000; 107(5):175-80.
 82. Han JS, Boeke JD. LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? Bio Essays. 2005; 27:775-84.
 83. Harmelin A, Pinthus JH, Katzir N, Kapon A, Volcani Y, Amariglio EN, et al. Use of a murine xenograft model for canine transmissible venereal tumor. Am J Vet Res. 2001; 62(6):907-11.
 84. Hasler AH, Weber WT. Theriogenology question of the month. Transmissible venereal tumor (TVT). J Am Vet Med Assoc. 2000; 216(10):1557-59. Errata em: Theriogenology question of the month. J Am Vet Med Assoc. 2000; 217(1):42.
 85. Hataka A. Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. [Thesis]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2003.
 86. Ihlasch SM, Oliveira, MLCS, Silva GN, Franchi CAS, Camargo JLV. Microdissecção e captura a laser na investigação do gene TP53 em tecidos incluídos em parafina. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2007; 43(1):61-67.
 87. Jörundsson E, Lumsden JH, Jacobs RM. Rapid staining techniques in cytopathology: a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, Papanicolaou and Romanowsky stains. Vet Clin Pathol. 1999; 28(3):100-8.
 88. Katzir N, Rechavi G, Cohen JB, Unger T, Simoni F, Segal S, et al. “Retroposon” insertion into the celular oncogen c-Myc in canine transmissible venereal tumor. Proc Natl Acad Sci USA. 1985; 82(4):1054-8.
 89. Katzir N, Arman E, Cohen D, Givol D, Rechavi G. Common origin of transmissible venereal tumors (TVT) in dogs. Oncogene. 1987; 1(4):445-8.
 90. Kroger D, Grey RM, Boyd JW. An unusual presentation of canine transmissible venereal tumor. Canine Pract. 1991; 16(6):17-21.
 91. Lefebvre GNF, Bonamin LV, Oliviera CM. Tratamento de tumor venéreo transmissível (tvv) canino utilizando *Viscum album* em associação à quimioterapia. Clinica Veterinária. 2007; 70:78-86.
 92. Liao KW, Lin ZY, Pao HN, Kam SY, Wang FI, Chu RM. 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.* 2003; 15(5):399-406.
93. Lopes AA, Oliveira AM, Prado, CBC. Principais genes que participam na formação dos tumores. *Revista de Biologia e Ciências da Terra.* 2002; 2(2):1-7.
 94. MacEwen EG. Transmissible venereal tumor. In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors. *Small animal clinical oncology.* 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001. p.651-6.
 95. Magalhães AM, Ramadinho RR, Barros CSL, Peixoto PV. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. *Pesq Vet Bras.* 2001; 1(21):23-32.
 96. MacKinley ET. General cytologic principles. In: Actkinson BF, editor. *Atlas of diagnostic cytopathology.* 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2004. p.1-30.
 97. Martins MIM, Souza FF, Gobello C. Canine transmissible venereal tumor: etiology, pathology, diagnosis and treatment. In: Concannon PW, England GCW, Verstegen J, Linde-Forsberg C, editors. *Recent Advances in Small Animal Reproduction.* 2005. New York: International Veterinary Information Service. Available from: <http://www.ivis.org/advances/Concannon/gobello2/chapter.asp?LA=1>
 98. Meinkoth JH, Cowell RL. Recognition of basic cell types and criteria of malignancy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2002; 32(6):1209-35.
 99. Meuten DJ. Diagnostic cytology for clinicians. [cited 2008 Mar 26]. Available from: www.cldavis.org/cgi-bin/download.cgi?pid=404.
 100. Miller DM, Blume S, Borst M, Gee J, Polansky D, Ray R et al. Oncogenes, malignant transformation, and modern medicine. *Am J Med Sci.* 1990; 300(1):59-69.
 101. Mitre BK, Kanbour AI, Mauser N. Fine needle aspiration biopsy of breast carcinoma in pregnancy and lactation. *Acta Cytol.* 1997; 41:1121-30.
 102. Mohanty GC, Rajya BS. Growth and morphological characteristics of canine venereal tumor cells in vitro. *Vet Pathol.* 1977; 14(4):420-5.
 103. Molina AL, Tobo PR. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. *Einstein.* 2004; 2(2):139-42.
 104. Mukaratirwa S, Gruys E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *Vet. Q.* 2003; 25(3):101-11.
 105. Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss RA. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell.* 2006; 126(3):477-87.
 106. Nak D, Nak Y, Cangul IT, Tuna B. A clinico-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. *J. Vet. Med.* 2005; 52:366-70.
 107. Nielsen SW, Kennedy PC. Tumors of the genital systems. In: Moulton JE, editor. *Tumor in domestic animals.* 3rd ed. Berkeley: University of California Press; 1990. p.479-517.
 108. Ojopi EP, Dias Neto E. Genômica e Oncologia. In: Mir, L. *Genômica.* 1ed. São Paulo: Atheneu, 2004.p.363-387.
 109. Ozkara SK, Ustun MO, Paksoy N. The gray zone in breast fine needle aspiration cytology: how to report on it? *Acta Cytol.* 2002; 46:513-8.
 110. Papanicolaou, G.N. Papanicolaou staining method. *Science.* 1932; 95:438-9.
 111. Papazoglou LG, Koutinas AF, Plevraki AG, Tontis D. Primary intranasal transmissible venereal tumour in the dog: a retrospective study of six spontaneous cases. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2001; 48(7):391-400.
 112. Pereira JS, Silva AB, Martins AL, Ferreira AM, Brooks DE. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumor. *Vet Ophthalmol.* 2000; 3(1):43-7.
 113. Raskin ER, Meyer DJ. Atlas de citologia de cães e gatos. 1st ed. São Paulo: Editora Roca; 2003. p.3- 10.
 114. Raskin RE, Rebar AH. Cytology of Internal Organs. In: 31st World Small Animal Veterinary

- Association Congress; 2006; Prague: Proceedings of World Small Animal Veterinary Association Congress; 2006. Available from: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture23/Raskin3.pdf?LA=1>
115. Rivera B, Ahrar K, Kangasniemi MM, Hazle JD, Price RE. Canine Transmissible Venereal Tumor: A Large Animal Transplantable Tumor Model. *Comp Med*. 2005; 55(4):335-43.
 116. Rocha NS. Citologia aspirativa por agulha fina em medicina veterinária (I). *Cães e gatos*. 1998; 75:15-6.
 117. Rocha NS. Citologia aspirativa por agulha fina em medicina veterinária (II). *Cães e gatos*. 1998; 75:15-6.
 118. Rogers KS. Transmissible venereal tumour. *Compend Contin Educ*. 1997; 19(9):1036-45.
 119. Ruggiero, RA; Bustuoabad, OD The biological sense of cancer: a hypothesis. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 3:43, p.1-14, 2006.
 120. Silva NP, Andrade LEC. Noções básicas de biologia molecular. *Rev. Bras. Reumatol*. 2001; 41:83-94.
 121. Sobral RA, Tinucci-Costa M, Camacho A. Ocorrência do tumor venéreo transmissível em cães na região de Jaboticabal. *Ars Vet*. 1998; 14(1):1-10.
 122. Varaschin MS, Wouters F, Bernins VMO, Soares TMP, Tokura VN, Dias MPLL. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais; formas de apresentação, clínico-patológicas. *Clinica Veterinária*. 2001; 6(32):332-8.
 123. Vermooten MI. Canine transmissible venereal tumour (TVT): A review. *J S Afr Vet Assoc*. 1987; 58(3):147-50.
 124. Vonholdt BM, Ostrander EA. The singular history of a Canine Transmissible Tumor, *Cell*. 2006; 126(3):445-7.