

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE *MMP-2* E *9*, *TIMP-1* E *2*, *ATM*,
TP53, *VEGF*, *COX-2* E *CDH-1* NO TVT CANINO**

Rafael Ricardo Huppes

Médico Veterinário

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE *MMP-2* E *9*, *TIMP-1* E *2*, *ATM*,
TP53, *VEGF*, *COX-2* E *CDH-1* NO TVT CANINO**

Rafael Ricardo Huppes

Orientadora: Profa. Dra. Renée Laufer Amorim

Co-orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi

Co-orientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária.

2014

M499a Huppes, Rafael Ricardo

EXPRESSÃO GÊNICA DE MMP-2 E 9, TIMP-1 E 2,
ATM, TP53, VEGF, COX-2 E CDH-1 NO TVT CANINO

xix, 99 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador (a): Renée Laufer Amorim

Banca examinadora: Rosimere de Oliveira Vasconcelos, Georgia
Mode Magalhães, Rafael Torres Neto, Bruno Watanabe Minto,
Bibliografia

1. TVT, MMPs 2 e 9, Timps 1 e 2. 2. ATM, P53. 3. VEGF,
COX-2, CDH-1. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.728.3:636.92

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL RICARDO HUPPES – Nascido, dia dois de abril de 1981, na cidade de Guaíra-Paraná, graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO), no ano de 2006. Em 31 de agosto de 2007, iniciou o curso de pós graduação *latu senso* em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais, curso este concluído em 14 de dezembro de 2008, na Universidade Federal do Paraná/UFPR, Câmpus de Palotina/PR. Em 14 de maio de 2009, ingressou no Programa de Mestrado em Cirurgia e Anestesiologia Veterinária na Universidade de Franca/UNIFRAN, Franca/SP, e o concluiu em 17 de fevereiro de 2011. Em março de 2011, ingressou no Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, curso de Doutorado, na FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal. No dia 10 de novembro de 2012, iniciou o curso de pós graduação *latu senso* em Cirurgia Ortopédica na Universidade de São Paulo (USP), curso que terá a duração de dois anos. Em março de 2014, ingressou na atividade de docente na disciplina de Técnica Operatória pela Faculdade Uningá, na cidade de Maringá Paraná.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, José Carlitos Huppés e Dione Maria Huppés, por serem meus melhores amigos, por me apoiarem em todos os momentos da minha vida, ruins ou bons e em minhas dificuldades, e por serem os grandes responsáveis pelo que eu sou. Agradeço ao meu irmão, Tiago José Huppés, por torcer por mim. Dedico também a minha avó, Olga Helena Galina e minha Tia, Liane Maria Galina, minhas outras duas mães. Não posso esquecer-me de minha avó, Olga Josefina Huppés, te amo muito e apesar dos poucos momentos juntos, sempre dedicou-me amor e carinho. Avó, que Deus a tenha.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em minha vida, guiando meus passos.

A Professora Renée Laufer Amorim pelo apoio e orientação e muita paciência, por acreditar na minha capacidade e por compartilhar seus conhecimentos comigo.

Ao “Grupo SOV”, Letícia, Thiago, Paulo, Erika, Rosana, Josiane, Rafaela, Paulo, Marília, Sofia, Leandro e a Professora Mirela, todos me ajudaram a superar todas as dificuldades.

De forma especial agradecer ao Professor Andriago Barboza De Nardi, por acreditar em mim, ter paciência, por me ajudar em meus trabalhos, pelo incentivo em minhas cirurgias. Andriago devo muito de minha formação a você!

Quero agradecer aos residentes de cirurgia pela ótima convivência, Mônica, Paulo, Guilherme, Erika, Marcos, Carolina, Bruna. Assim como aos residentes do Serviço de Anestesiologia, Diego e do Serviço de Obstetrícia, Ana Paula e Marina, e aos doutorandos Felipe e Leandro.

À FAPESP e CNPq pela bolsa concedida e financiamento da pesquisa.

Ao pessoal do laboratório de imuno-histoquímica de Botucatu, em especial ao Rafael Torres Neto e ao Carlos Eduardo Fonseca Alves, pela ajuda na realização da técnica de imuno-histoquímica e leitura das lâminas.

Quero agradecer ao Márcio de Carvalho por me ajudar a entender e a fazer o PCR desta pesquisa.

Quero agradecer as pessoas com quem eu morei no período do doutorado, Cássia, Gláucia, Artur e em especial ao Ricardo, por me ajudar em meus trabalhos e pelo companheirismo.

Quero também agradecer em especial ao José Carlos Zanella, pelo apoio em todo o período da realização do doutorado.

SUMARIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Tumor Venéreo Transmissível	16
2.2 Mecanismos de desenvolvimento de invasão e metástase mediados por <i>MMPs</i> 2 e 9.	19
2.2.1 Mecanismos de inibição de invasão e metástase mediada por <i>TIMP</i> 1 e 2.....	23
2.2.2 ATM.....	26
2.2.2.1 <i>TP53</i>	27
2.2.2.2 <i>VEGF</i>	29
2.2.2.3 <i>COX-2</i>	30
2.2.2.4 <i>CDH - 1</i>	32
3. REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 2 - <i>MMP-2</i> AND <i>TIMP-1</i> OVEREXPRESSION IN IMPLANTATION TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR	51
ABSTRACT	51
INTRODUCTION.....	51
OBJETIVE.....	52
MATERIAL AND METHODS.....	52
RESULTS	58
DISCUSSION.....	60
CONCLUSSION.....	64

ACKNOWLEDGMENTS.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
CAPÍTULO 3 – NÍVEIS DE <i>ATM</i> E <i>TP53</i> PODEM INFLUENCIAR O BAIXO POTENCIAL METASTÁTICO DO TVT CANINO?	70
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	70
INTRODUÇÃO.....	71
OBJETIVO.....	72
MATERIAL E MÉTODOS.....	72
RESULTADOS.....	77
DISCUSSÃO.....	78
CONCLUSÃO.....	80
ACKNOWLEDGMENTS.....	80
REFERENCIAS.....	81
CAPÍTULO 4 - AUMENTO DA EXPRESSÃO DE VEGF, COX-2 E CDH1 PODEM FAVORECER IMPLANTAÇÃO DO TVT?	84
RESUMO.....	84
ABSTRACT.....	84
INTRODUÇÃO.....	85
OBJETIVO.....	85
MATERIAL E MÉTODOS.....	86
RESULTADOS.....	91
DISCUSSÃO.....	92
CONCLUSÃO.....	95
ACKNOWLEDGMENTS.....	95
REFERENCIAS	96

EXPRESSÃO GÊNICA DE *MMP-2* E *9*, *TIMP-1* E *2*, *ATM*, *TP53*, *VEGF*, *COX-2* E *CDH-1* NO TVT CANINO

RESUMO - A literatura cita que 1 a 5% dos casos de tumor venéreo transmissível (TVT) primário são metastáticos. Sendo assim, é importante estudar os mecanismos que colaborem para a invasão metastática assim como para sua implantação. Dentre estes mecanismos as metaloproteinases (*MMP-2* e *MMP-9*) e seus inibidores (*TIMP-1* e *TIMP-2*), assim como o *ATM*, *COX-2*, *VEGF* e *CDH-1* podem explicar a implantação tumoral no sítio primário e a ocorrência da invasão metastática do TVT no cão. O objetivo do presente trabalho é avaliar a expressão gênica dos marcadores acima e correlacionar a sua expressão com o poder de implantação e invasão metastática no TVT. Para este estudo foram avaliadas 32 amostras tumorais, que foram congeladas e delas extraídos RNAm. Utilizou-se o método de qRT-PCR para todos os transcritos. Os resultados foram comparados com sangue periférico de 10 cães saudáveis (grupo controle) com o teste de Mann Whitney. A expressão gênica de *MMP-2* e *TIMP-1* foi significativamente maior do que o grupo controle ($p < 0,001$; $p = 0,037$; respectivamente). A expressão dos transcritos dos genes *MMP-9* e *TIMP-2* não apresentou diferença estatística entre o TVT e grupo controle ($p = 0,535$; $p = 0,906$; respectivamente). A avaliação de expressão de transcritos do *ATM* apresentou aumento significativo ($p < 0,0001$) de sua expressão no tecido tumoral (TVT) quando comparado com o grupo controle, enquanto a expressão dos transcritos do gene *TP53* não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p = 0,26$). Na avaliação da *COX-2*, *VEGF*, *CDH-1* foi verificado aumento significativo ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p = 0,04$, respectivamente) da expressão de transcritos dos genes no tecido tumoral (TVT) em relação ao grupo controle. A super-expressão de *MMP-2* e o *TIMP-1* pode explicar a capacidade de implantação das células tumorais assim como a maior expressão de *VEGF* e *COX-2* pode explicar o crescimento rápido local do tumor e rica vascularização. Já a alta expressão do *ATM*, *TP53* e *CDH-1*, pode colaborar com a baixa capacidade metastática, próprias deste tumor.

Palavras-chave: angiogênese, carcinogênese, expressão gênica, gelatinases, implantação

MMP-2 AND 9, TIMP-1 AND 2, ATM, TP53, VEGF, COX-2 AND CDH-1 GENE EXPRESSION IN CANINE TVT

ABSTRACT - The literature reports that 1-5% of cases of primary transmissible venereal tumor (TVT) are metastatic. Thus, it is interesting to study the mechanisms that collaborate to the metastatic invasion and implantation of TVT. Among these mechanisms, the metalloproteinases (*MMP-2 and MMP-9*) and their inhibitors (*TIMP-1 and TIMP-2*), as well as *ATM, COX-2, VEGF* and *CDH-1* may explain the tumoral implantation in the primary site and metastatic invasion of TVT in dogs. The objectives of this study are to evaluate the gene expression of these markers and to correlate their expression with the high ability of deployment and metastatic invasion of TVT. For this study, 32 tumor samples were frozen and their mRNA were extracted using the qRT-PCR method for all transcripts. The results were compared with peripheral blood of 10 healthy dogs (control group) using the Mann Whitney test. The expression of *MMP-2* and *TIMP-1* were significantly higher than the control group ($p < 0.001$, $p = 0.037$, respectively). The expression of *MMP-9* and *TIMP-2* showed no statistical difference between the TVT and the control group ($p = 0.535$, $p = 0.906$, respectively). The expression of *ATM* was increased in tumor tissue (TVT) when compared with the control group, while the expression of *TP53* had no statistical difference between groups ($p = 0.26$). The evaluation of *COX-2, VEGF* and *CDH-1* were increased in tumor tissue when compared with control group. The over expression of *MMP-2* and *TIMP-1* may explain the implantation ability of the tumor cells, as well as the increase of *VEGF* and *COX-2* may explain the rapid tumor growth and the rich vasculatization. While the over expression of *ATM, TP53* and *CDH-1* may contribute to the low metastatic capacity of the TVT tumor.

Keywords: angiogenesis, carcinogenesis, genetic expression, gelatinases, implantation

LISTA DE ABREVIATURAS

µl - Microlitros
µm – Micrômetro
Acs - Anticorpos
AP-1 – Ativador de proteína
ATM - Ataxia telangectasia
CDH1 – Gene responsável por expressar E-caderina
COX-2 - Ciclooxygenase
DAB – Diaminobenzidina
gp-p – Glicoproteína P
Gy –Grays
HIF – 1 – Fator indutor de hipóxia 1
HIF - 1α – Fator indutor de hipóxia 1α
IL-6 - Interleucina 6
IM – Intramuscular
IV – Intravenoso
KDa – Unidade de medida
kg – Quilograma
MB – Membrana basal
MDR1 – Gene MDR1
MEC – Matriz extra-celular
mg – Miligrama
mL – Mililitros
MMP – Metaloproteinase de matriz
MMP-2 int. – Metaloproteinase-2 inativa
MT- MMP – Metaloproteinase ligada à membrana
NF-KB – Fator de transcrição nuclear KB
NK – Célula Natural Killer
°C – Graus Celsius
PBA – Biopsia aspirativa por agulha fina
PCR – Reação em cadeia de polimerase

PGH - Prostaglandina

PGI₂ - Prostaciclina

SRD – Sem raça definida

STAT-3 – Fato de sinal ativador de transcrição

TIMP – Fator Inibidor de metaloproteinase

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

TVT – Tumor venéreo transmissível

TVTC – Tumor Venéreo Transmissível Canino

TXA₂ - Tromboxano

VEGF – Fator de crescimento endodermal

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2	Página
Table 1 TVT RNAm concentration analyzed by Nanodrop.....	56
Table 2 Blood mRNA concentration analyzed by Nanodrop.....	57
Table 3 TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 and MMP-9 sequence primers used in the experiment.....	57
Table 4 Endogenous genes primers sequences used in this experiment, designed with the Primer Express program.....	57
CAPÍTULO 3	
Tabela 1 Concentração de mRNA pelo aparelho Nanodrop no TVT.....	75
Tabela 2 Concentração de mRNA pelo aparelho Nanodrop no Sangue.....	76
Tabela 3 Primers para a expressão genica, desenhados com auxílio do programa Prmer Express.....	76
Tabela 4 Sequência dos primers iniciadores utilizados na análise de expressão gênica. Estes dados foram obtidos segundo Brinkhof et al. (2006) e com o <i>software Primer Express 2.0</i>	76
CAPÍTULO 4	
Tabela 1 Concentração de mRNA pelo aparelho Nanodrop no TVT.....	89
Tabela 2 Concentração de mRNA pelo aparelho Nanodrop no Sangue.....	90
Tabela 3 Primers para a expressão genica, desenhados com auxílio do programa Primer Express e também com base nos trabalhos de Clements et al. (2009) e Kanemoto et al. (2011)	90
Tabela 4 Sequência dos iniciadores utilizados na análise de expressão gênica. Estes dados foram obtidos segundo Brinkhof et al. (2006) com o <i>software Primer Express 2.0</i>	90

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2	Página
Figure 1 Blood RNA integrity evaluation by Bioanalyser RIN: 7.40.....	58
Figure 2 TVT RNA integrity by Bioanalyser RIN: 8,60.....	58
Figure 3 Representation of median QR \pm standard deviation in the blood (control group) and TVT. a) <i>MMP-2</i> ; b) <i>MMP-9</i> ; c) <i>TIMP-1</i> ; d) <i>TIMP-2</i> . Notice the statistical difference in <i>MMP-2</i> and <i>TIMP-1</i> gene expression in TVT samples when compared to control group. Mann-Whitney test	59
Figure 4 Scatterplots and regression lines in TVT tumor cells: a) <i>MMP-2</i> and <i>TIMP-2</i> ; b) <i>MMP-2</i> and <i>TIMP-1</i> ; c) <i>MMP-9</i> and <i>TIMP-2</i> ; c) <i>MMP-9</i> and <i>TIMP-1</i> . Spearman test, $p < 0.05$ significance.....	60
CAPÍTULO 3	
Figura 1 Análise da integridade do RNA pelo aparelho Bioanalyser da amostra do sangue. Valor de RIN: 7.40.....	77
Figura 2 Análise da integridade do RNA pelo aparelho Bioanalyser da amostra TVT. Valor de RIN: 8,60.....	77
Figure 3 Representação gráfica da mediana do QR \pm desvio padrão do marcador no sangue (grupo controle) e no TVT do <i>ATM</i> . Teste de Mann-Whitney	78
Figure 4 Representação gráfica da mediana do QR \pm desvio padrão do marcador no sangue (grupo controle) e no TVT do <i>TP53</i> . Teste de Mann-Whitney	78
CAPÍTULO 4	
Figura 1 Análise da integridade do RNA pelo aparelho Bioanalyser da amostra do sangue. Valor de RIN: 7.40.....	91
Figura 2 Análise da integridade do RNA pelo aparelho Bioanalyser da amostra TVT. Valor de RIN: 8,60.....	91
Figure 3 Representação gráfica da mediana do QR \pm desvio padrão dos marcadores no sangue (grupo controle) e no TVT. A) <i>COX-2</i> ; B) <i>VEGF</i> . Teste de Mann-Whitney	92
Figure 4 Representação gráfica da mediana do QR \pm desvio padrão dos marcadores no sangue (grupo controle) e no TVT. C) <i>CDH-1</i> . Teste de Mann-Whitney.....	92

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma neoplasia de células redondas, que acomete cães (LAPA, 2009; TINUCCI-COSTA, 2009). Esta neoplasia começou a ser estudada em 1905, porém Sticker em 1906, referiu-se a esta neoplasia como sarcoma, sendo assim por muito tempo chamado de tumor de Sticker (AMBALI; MOHAMMED, 1994; SOUZA et al., 2000; LAPA, 2009; TINUCCI-COSTA, 2009).

Esta é uma neoplasia de ocorrência natural que acomete machos e fêmeas. Sua principal forma de transmissão é por meio de contato direto principalmente pelo coito e os principais locais de implantação são vulva, pênis e prepúcio (LOUAR, 1996; GONÇALVEZ et al., 1997; SOUZA et al., 2000; LAPA, 2009; TINUCCI-COSTA, 2009; BELOV, 2012).

Macroscopicamente o tumor é caracterizado por coloração avermelhada, com aspecto de “couve-flor”, consistência friável e exudato hemorrágico. Essas características macroscópicas podem sugerir o diagnóstico de TVT (LAPA, 2009; TINUCCI-COSTA, 2009), porém exames de citologia e histopatologia devem ser realizados para confirmação do diagnóstico (WILLARD; TVEDTEN e TURNWAL, 1989; FLORES et al., 1993; JOHNSON, 1994; LAPA, 2009).

Apesar de raramente ocorrer metástase, existem relatos de disseminação à distância, principalmente em linfonodos (poplíteo e inguinal), bexiga, útero, medula óssea e olhos (NAK et al., 2005; VON HOLDT; OSTRADER, 2006). Devido à falta de estudos sobre o mecanismo de implantação do tumor e de metástase, se faz necessário avaliar os mecanismos incriminados tanto na ruptura da matriz extracelular, como na metástase à distância, fatores já estudados em neoplasias como os carcinomas mamários, orais, pulmão, cabeça e pescoço no homem (KATO et al., 2005; LIU et al., 2005; VICENTE et al., 2005; BARROS, 2006; KRAWCZUC-RYBAK et al., 2010). Oscasos de metástase e óbito em cães por TVT, são raros possivelmente devido à adequada resposta ao tratamento com quimioterapia antineoplásica. Entretanto é importante entender porque alguns cães desenvolvem metástases, considerando que é uma neoplasia que se implanta em praticamente

todos os tecidos do corpo dos cães, após mínimo trauma e contato direto com o tumor (LAPA, 2009; BELOV, 2012).

Neste estudo, objetivou-se avaliar a expressão gênica das metaloproteinases de matriz (*MMPs-2 e 9*) e *ATM* (ataxia telangectasia), *TP53*, *VEGF*, *COX-2* e *CDH-1*, que possam estar envolvidas no processo de implantação, angiogênese e crescimento do TVT em cães. Também teve-se como objetivo, estudar a via natural de inibição das *MMPs-2 e 9* pela avaliação dos fatores inibidores de metaloproteinase *TIMPs-1 e 2* para sugerir motivo da existência de poucos relatos de metástase e o mecanismo de implantação dos TVT em cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tumor Venéreo Transmissível

O TVT é uma neoplasia de ocorrência natural, transmitida principalmente pelo contato sexual. Experimentalmente, por meio de cultivo celular o TVT pode ser implantado em pacientes alogênicos (KARSON; MANN, 1952; ALEXANDER; BRAUNSTEIN; ALTEMEIER, 1964; TINUCCI-COSTA, 1999; LAPA, 2009, TINUCCI-COSTA, 2009). Nos camundongos (modelos experimentais transplantados), o desenvolvimento do TVT passa por quatro fases: transplantação, progressão, latência e regressão em um período de seis meses (KOIKE; OTOMO; KUDO, 1979).

A regressão do tumor transplantado tem sido correlacionada ao sistema imune, principalmente aos mecanismos humorais e celulares presentes no hospedeiro, especialmente pela ação de linfócitos T. Observou-se que, após a regressão em pacientes que apresentavam o tumor, estes se tornavam resistentes a novas implantações, sugerindo o desenvolvimento de imunidade ativa. Além disto, existem relatos que os filhotes de mães que tiveram TVT também podem apresentar resistência à implantação do tumor (TINUCCI-COSTA, 2009).

O TVT pode se desenvolver em praticamente todos os tecidos dos cães, porém sua maior ocorrência é na mucosa vulvar de cadela, nos machos, desenvolve-se principalmente no prepúcio ou pênis (COHEN, 1985; JOHNSON, 1994; KNAPP; WATERS; SCHMIDT, 2000; MacEWEN, 2001; BELOV, 2012). Porém, o TVT pode

ocorrer em outros locais, como cavidade oral, devido principalmente ao hábito social dos cães de se lambem e, na maioria das vezes, estes tumores progridem, invadindo a cavidade nasal (COHEN, 1985; JOHNSON, 1994; KNAPP; WATERS; SCHMIDT, 2000; MacEWEN, 2001).

Metástases são infrequentes, em torno de 1 a 5% dos casos, porém a baixa descrição de casos metastáticos pode ser decorrente do sub-diagnóstico pelos médicos veterinários (BOSCOS et al., 1998; ROGERS; WALKER e DILLON, 1998; FERREIRA et al., 2000; KNAPP; WATERS; SCHMIDT, 2000; PEREIRA et al., 2000; DAS; DAS, 2000; SOUSA et al., 2003; LAPA, 2009; HUPPES et al., 2012). Os linfonodos inguinais constituem os sítios metastáticos mais comuns. Todavia, outros sítios de metástase são descritos e incluem a pele, outros linfonodos, baço, fígado, rins, olhos, cérebro, testículos, musculatura, ovários, tubas uterinas e útero (VERMOOTEN, 1987; OLGIVIE; MOORE, 1995; ROGERS; WALKER e DILLON, 1998; HUPPES et al., 2012).

Esta neoplasia ocorre no mundo todo, e nos países pouco desenvolvidos e emergentes apresenta maior ocorrência. Este fato se deve, provavelmente, ao maior controle sobre a natalidade e a baixa presença de cães errantes em países desenvolvidos (DAS; DAS, 2000; TUNICCI-COSTA 2009; LAPA, 2009).

Quanto à predisposição sexual do TVT na população canina, muitos estudos relatam maior frequência em fêmeas quando comparado aos machos (BRANDÃO et al., 2002; TINUCCI-COSTA, 2009). Em relação à raça, cães sem raça definida parecem ser mais acometidos quando comparado aos cães de raça pura, provavelmente pela maior frequência desse tumor em animais errantes e devido a não esterilização precoce dos mesmos, ao longo de suas vidas os cães possam cruzar aumentando as chances de transmissão do TVT entre os cães (HASLER; WEBER, 2000; PEREIRA et al., 2000; PAPAZOGLU et al., 2001; BRANDÃO et al., 2002; FONSECA, 2009; TINUCCI-COSTA, 2009).

Os sinais clínicos dependem da localização e do estágio em que a doença se encontra, e podem se caracterizar pela ocorrência de secreção serosanguinolenta, presença de deformidade do local acometido, odor intenso, necrose local e ulceração. Quando localizado em região prepucial e peniana pode-se verificar, hematúria, disúria, fimose ou parafimose (TINUCCI-COSTA, 2009; MORGAN, 2010). Porém, como

descrito acima, pode ocorrer o desenvolvimento do TVT em outros locais do corpo, como o tecido cutâneo. Geralmente, estas lesões se caracterizam por aumento de volume, supuração, dor intensa, exsudato e miíase. Já em cavidade nasal o principal aspecto é o aumento de volume, fistulação naso-oral, dificuldade respiratória, descarga serosanguinolenta e espirros (GINEL et al., 1995).

As informações obtidas no momento da anamnese e do exame físico contribuem para o diagnóstico (TINUCCI-COSTA, 2009; MORGAN, 2010). Além destas avaliações, recomenda-se realizar a coleta de material para exame citológico, sendo que pode ser feito com auxílio de punção aspirativa com agulha fina (PAF), "imprint" ou escarificação, sendo, muitas vezes, suficiente para diagnosticar o TVT. Porém, sempre que necessário, podem ser utilizados outros métodos de diagnóstico, como por exemplo, a avaliação histopatológica, onde se observam microscopicamente a presença de células grandes, variando de redondas, poliédricas, com núcleo grande arredondado com presença de vacúolos intra-citoplasmáticos e numerosas figuras de mitose. Ou ainda, a avaliação imuno-histoquímica, utilizando anticorpo específico, a Lisozima ou reação em cadeia de polimerase (PCR) (WHITE, 1991; VARASCHIN et al., 2001; BATISTA et al., 2007; FONSECA, 2009; LAPA, 2009).

Quanto ao tratamento, existem várias modalidades terapêuticas para o TVT, dentre elas encontra-se a cirurgia, quimioterapia antineoplásica, radioterapia, terapia fotodinâmica, imunoterapia e radiofrequência (DAS; DAS, 2000; LAPA, 2009; TINUCCI-COSTA, 2009). A cirurgia é um método de tratamento pouco utilizado. Esta consiste na remoção total da lesão, com margem ampla de segurança, porém muitas vezes não é adequada devido à localização do tumor, podendo desta forma acontecer recidivas tumorais. Outro fator que faz com que a cirurgia seja contraindicada seria a necessidade da realização de penectomia e uretostomia em machos. Estas técnicas são invasivas, radicais e frequentemente apresentam complicações pós-operatórias representando desvantagem tendo em vista que o tumor responde consideravelmente à quimioterapia antineoplásica (LAPA, 2009; TINUCCI-COSTA, 2009).

A radioterapia é um método muito eficaz, no entanto algumas desvantagens são relatadas, como falta de equipamentos e de pessoas qualificadas para utilizar e trabalhar na rotina, além dos altos custos do tratamento. Esta modalidade pode ser

utilizada tanto antes da cirurgia quanto após o procedimento, utilizando doses de radioterapia relativamente baixas (15 Gy), por uma ou três sessões (LAPA, 2009; TINUCCI-COSTA, 2009).

A imunoterapia se baseia na utilização direta ou indireta do sistema imune do paciente para combater o tumor, podendo ser específica para destruir determinado antígeno ou inespecífica (TINUCCI-COSTA, 2009).

A quimioterapia antineoplásica é o tratamento de eleição, e os fármacos mais utilizados são o sulfato de vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida, sulfato de vimblastina e metotrexato, que podem ser utilizados sozinhos ou associados (MacEWEN, 1996; SINGH et al., 1996; SOUZA et al., 2000; RODASKI; DE NARDI, 2006). Somente 10% dos cães tratados com sulfato de vincristina se tornam quimiorresistentes. O principal mecanismo envolvido neste fenômeno é a ativação da glicoproteína-P (Gp-P). Esta é uma proteína de membrana plasmática de 170 KDa codificada pelo gene *MDR1*, sendo expressada por uma variedade de tecidos como: células tubulares renais, intestino, células epiteliais do cérebro e canalículos biliares (GERARDI, 2009).

Dentro dos substratos que a Gp-P transporta estão fármacos como os alcaloides da vinca, cetoconazol, itraconazol, ciclosporina A, doxiciclina, anti-histamínicos e esteroides (DOWLING, 2006; GERARDI, 2009). Este é um mecanismo de resistência aos quimioterápicos que funciona como aspirado hidrofóbico. A Gp-P intercepta o fármaco lipofílico quando ele se move pela camada lipídica da membrana celular e o remove da porção interna da membrana para externa e, então, para o meio extracelular, conferindo desta forma a quimiorresistência (GERARDI, 2009).

2.2 Mecanismos de desenvolvimento de invasão e metástase mediados por MMPs 2 e 9

A matriz extra-celular (MEC) consiste em uma rede de macromoléculas, que preenche espaços intercelulares, que mantêm a estrutura e homeostasia tecidual. Este componente está incriminado no controle inflamatório regulando a disponibilidade de citocinas e quimiocinas, organiza o tecido, mantendo as células unidas, além de proporcionar proliferação, diferenciação e crescimento dos mais variados tipos

celulares (ALBERTS, 2009; BRASILEIRO FILHO, 2009; NISSINEN; KAHARI, 2014).

A membrana basal (MB) está logo abaixo do tecido epitelial, envolvendo células musculares, tecido adiposo e separando tecido conjuntivo adjacente e portanto sendo a última barreira contra a invasão metastática (BORNSTEIN; SAGE, 2002).

A descontinuidade da MB está diretamente ligada com a invasão tumoral. Além disso, a descontinuidade desta estrutura e a degradação da MEC alteram a aderência celular e liberam fragmentos bioativos (células adjacentes a degradação), que estimulam a proliferação e crescimento tecidual, assim como a liberação de citocinas, quimiocinas facilitando a invasão tumoral (SCHENK; QUARANTA, 2003; NISSINEN; KAHARI, 2014).

A degradação da MEC ocorre mediada por serinaproteases, cisteinaproteases e metaloproteinasas, sendo estas enzimas consideradas de fundamental importância para invasão metastática, visto que nos processos neoplásicos a regulação alterada da proteólise favorece a degradação da MEC e desta maneira, os processos de invasão metastática (BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002; ITOH; NAGASE, 2002; NOWAK et al., 2013).

A família das metaloproteinasas é composta por mais de 25 enzimas que são classificadas quanto à sua localização em MMP secretada ou ligada a uma membrana (MT-MMP) (VISSE; NAGASE, 2003). Sua estrutura pode ser dividida em collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), que clivam a tripla hélice de colágeno; as gelatinases (MMPs 2 e 9), as do tipo membrana (MT1-MMP a MT6-MMP), que podem ser conhecidas como MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25, responsáveis por degradar fibronectina, gelatina, e outros substratos da MEC; as estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11 e MMP-26), que degradam os proteoglicanos, e as matrilisinas (MMP-7), que degradam fibronectina e laminina (VISSE; NAGASE, 2003; PAGE-MCCAW et al., 2007).

Segundo Kessenbrock, Plaks e Werb (2010), as metaloproteinasas possuem domínios distintos uma das outras, possuindo cada MMP, em média, três domínios, o pró-peptídeo, o catalítico e o C-terminal, semelhante à hemoperoxina, que está ligado ao domínio catalítico por uma região de ligação dobradiça flexível (ASADAMONGKOL; ZHANG, 2014). Além dos citados, as metaloproteinasas podem apresentar domínio transmembrânico C-terminal, enquanto as gelatinases (MMP-2 e 9) apresentam

repetições de fibronectina do tipo II inseridas no domínio catalítico e a MMP-7 (matrilisina) carece de um domínio C-terminal (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010; ASADAMONGKOL ; ZHANG, 2014).

Segundo Egeblad e Werb (2002), as MT-MMP são ligadas à membrana e as MMPs secretadas, localizam-se na superfície celular, ligadas às integrinas ou com ligações com proteoglicanos e colágeno tipo IV (RUNDHAUG, 2005).

As MMPs são secretadas no ambiente pericelular na forma de pró-enzimas inativas, denominadas zimógenos, devido à interação de um resíduo de cisteína do domínio pró-peptídeo com os íons de zinco do sítio catalítico. Somente após a interrupção dessa ligação no meio extra-celular pelas serinaproteases, como a plasmina, a triptase e a quinase, que a enzima se torna ativa (STAMENKOVIC, 2000; VISSE; NAGASE, 2003). Além disso, algumas MMP podem ser ativadas por processos de autoativação ou autoclivagem, bem como por uma cascata em que uma MMP ativa é capaz de ativar uma MMP latente (STAMENKOVIC, 2000), enquanto outras, como a MMP-11 e MMP-28 e as MT-MMP, podem ser ativadas no meio intracelular, por purinas citoplasmáticas, semelhantes às serinaproteases antes de alcançar a superfície celular (STERNLICHT; WERB, 2001).

As principais células envolvidas na síntese e secreção das MMPs são as inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos e mastócitos e, ainda, células endoteliais, fibroblastos e células progenitoras hematopoiéticas (KESSENBROCK; PLAKS e WERB, 2010). Normalmente as MMPs são expressas em quantidades muito baixas, sendo sua atividade proteolítica regulada em três níveis: transcrição, ativação proteolítica do zimogênio e inibição da enzima ativa pela presença de inibidores específicos das MMPs, nomeados TIMPs (MURPHY; NAGASE, 2008). Por isso, a degradação da MEC em situações fisiológicas está relacionada ao equilíbrio entre a produção, a ativação das MMPs e a inibição pelos TIMPs, o que impede sua proteólise excessiva (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006; NOWAK, et al., 2013).

As metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMPs 2 e 9) são enzimas proteolíticas únicas e específicas, que regulam a integridade da MEC. Constituem uma subfamília de enzimas proteolíticas, que apresentam diferentes substratos. São enzimas dependentes de zinco que degradam várias proteínas da MEC (colágeno, elastina,

proteoglicanas) e que têm papel em vários processos fisiológicos, como desenvolvimento embrionário, morfogênese, remodelagem tecidual e processos patológicos, como degeneração muscular, metástases, artrites e desenvolvimentos de aneurisma (THOMAS et al., 1999; CORBEL et al., 2000; HANDSLEY; EDWARDS, 2005; RIBEIRO et al., 2008; UZUELLI, 2008; NOWAK et al., 2013).

As MMPs têm grande importância na angiogênese, um evento necessário para o reparo tecidual, assim como para a implantação e crescimento dos tumores (STERNLICHT; WERB, 2001, WURTZ et al., 2005; FELLIN et al., 2009). Existem três mecanismos importantes interligados para a ocorrência da angiogênese influenciada pelas MMPs: degradação da matriz extra-celular, proporcionando a migração de células endoteliais pelo tecido circunvizinho, liberação de fatores pró-angiogênicos e regulação negativa, por meio da liberação de agentes anti-angiogênicos (STERNLICHT; WERB, 2001; ASADAMONGKOL; ZHANG, 2014).

Além disso, Mook, Frederiks e Van Noorden (2004) enfatizam o papel das MMPs 2 e 9 na angiogênese e no crescimento dos tumores. Conforme os autores, há acúmulo de evidências que suportam a associação, principalmente das gelatinases, com o comportamento agressivo de algumas neoplasias em humanos (MOOK; FREDERIKS; VAN NOORDEN, 2004).

A maioria das MMPs é secretada no espaço extra-celular, porém outras são estocadas dentro das células, como a *MMP-9*, que se acumula em grânulos de neutrófilos. No tecido cardíaco de humanos foi descoberto novas formas de *MMP-2* intracelular que podem estar associada a disfunções cardíacas (THOMAS et al., 1999; NAGASE et al., 2006; UZUELLI, 2008; JACOB-FERREIRA; SCHULZ, 2013).

Vários estudos têm evidenciado que as MMPs atuam na quebra da membrana basal e da degradação do estroma intersticial e, desta forma, facilitam a invasão de células neoplásicas, levando a metástases (THOMAS; LEWIS; SPEIGHT, 1999; HRABEC et al., 2007; UZUELLI, 2008; NOWAK et al., 2013).

Estudos mostraram que *MMP-2* e *9* pertencentes à subfamília das gelatinases têm função de lise de colágeno tipo IV e V, o principal componente da membrana basal. O aumento das gelatinases apresentaram correlação com estágio clínico, presença de metástase em linfonodos e prognóstico reservado em neoplasias malignas nos animais e humanos (LIU et al., 2005; BARROS, 2006; RIBEIRO et al.,

2008).

Além do colágeno tipo IV e gelatina, as MMP-2 e 9 tem outros substratos que incluem: colágeno tipo I, V, X, e, para MMP-2, a laminina (STAMENKOVIC, 2000; BARROS, 2006).

As MMP-2 e 9 são expressas em células normais, exibindo níveis baixos ou até ausentes, sendo induzida no momento em que necessita de remodelação tecidual (POLETTE et al., 2004; BARROS, 2006).

As gelatinases parecem estar envolvidas e participando ativamente das interações entre células epiteliais e os componentes mesenquimais (KUBOTA et al., 2000; BARROS, 2006).

Diversos estudos em humanos têm demonstrado aumento da expressão das MMPs 2 e 9 em neoplasias malignas, como carcinomas orais, de cabeça e pescoço, tireoide, ovário, carcinomas de células escamosas orais, em orofaringe, carcinomas mamários, tumores de endométrio, leucemias linfoblásticas e esta expressão é ainda maior nos casos em que estas neoplasias apresentaram metástase (KATO et al., 2005; LIU et al., 2005; VICENTE et al., 2005; BARROS, 2006; KRAWCZUC-RYBAK et al., 2010; SCHRÖPFER, et al., 2010; BURDUK et al., 2012; NOWAK, et al., 2013; WAJNER et al., 2014; HEO et al., 2014).

Portanto, a presença das MMPs 2 e 9 favorece a ruptura da MEC e a implantação de células tumorais em sítios distantes. A presença destes marcadores pode favorecer metástase à distância e, conseqüentemente, um prognóstico ruim (BARROS, 2006; CLARK et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008; UZUELLI, 2008; FELLIN et al., 2009; WAJNER et al., 2014; HEO et al., 2014).

2.2.1 Mecanismos de inibição de invasão e metástase mediada por TIMP 1 e 2

Em condições fisiológicas normais, a atividade das MMPs é controlada e ativada por meio de precursores zimogênicos sobre pró-MMPs e regulada por precursores endógenos de MMPs, denominados inibidores tissulares de metaloproteinase (TIMP) (GUTTMAN, 2004; KWIATKOWSKI et al., 2008; NOWAK et al., 2013).

A principal ação dos TIMPs é a inibição das MMPs. Desta forma, os TIMPs

impedem ou retardam a invasão neoplásica ou metastática (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010; NOWAK et al., 2013). Em humanos, acredita-se que neoplasias malignas apresentam baixos níveis de TIMPs, em contrapartida ocorre elevada expressão das MMPs (PAGE-MCCAW et al., 2007; WAJNER, et al., 2014). Estes dados demonstram o aumento da capacidade de invasão da MEC, assim como da progressão de lesões pré-neoplásicas (BREW; NAGASE, 2010; WAJNER, et al., 2014).

São conhecidos quatro tipos de TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4, com peso molecular variando em torno de 20 a 29 kDa, que podem inibir reversivelmente as MMPs com estequiometria de 1:1. Estes inibidores enzimáticos compartilham uma estrutura gênica conservada e 12 resíduos de cisteína separados de forma similar, por pontes de dissulfeto responsáveis pela estrutura de seis alças e dois domínios observados nestas moléculas (STERNLICHT; EWERB, 2001; BAHUDHANAPATI, et al. 2011). Estas moléculas possuem domínio N- e C-terminal, com seis resíduos de cisteína conservados que formam três pontes dissulfídicas cada. A região N-terminal liga-se ao domínio catalítico das MMPs e inibe sua atividade, enquanto que a C-terminal interage com as pró-formas, estabilizando o complexo inibidor da pró-enzima (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010; BAHUDHANAPATI, et al. 2011).

Por regular a atividade das MMPs, o principal papel fisiológico dos TIMPs é mediar a degradação e também o desenvolvimento e a remodelação da membrana basal e matriz extra celular (RIES, 2014). Outras funções atribuídas a essas proteínas incluem modulação do crescimento, proliferação, migração, invasão celular e efeitos anti-angiogênicos. Contudo, nem todos esses efeitos são mediados pela atividade inibitória dos TIMPs sobre as MMPs (BREW; NAGASE, 2010; RIES, 2014).

Cada TIMP é capaz de inibir várias MMPs na razão é de 1:1, formando complexos TIMP-MMP, incapazes de se ligar ao substrato (CURRAN; MURRAY, 1999). Entre todos os TIMPs, o TIMP-1 é o que tem menor capacidade inibitória, pois possui baixa afinidade com as MMP-14, MMP-16 e MMP-24 (WURTZ et al., 2005), porém, tem capacidade de inibir fortemente MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010). O TIMP-2 é o único membro dos TIMPs capaz de agir como inibidor e ativador das MMPs, e pode interagir com MT1-MMP e pró-MMP-2 facilitando a ativação da pró-MMP (BOURBOULIA; STETLER-

STEVENSON, 2010). A TIMP-3 inibe MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-13 e liga-se tanto à pró-MMP-2 quanto à pró-MMP-9. Já o TIMP-4 pode se ligar à pró-MMP-2 e inibir as MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9 e MMP-14 (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010).

A regulação da atividade dos TIMPs é realizada por citocinas (IL-1, IL-6) e fatores de crescimento de forma semelhante ao que ocorre nas MMPs. Sua concentração tissular geralmente excede em muito a concentração de MMP, limitando assim a atividade proteolítica destas enzimas para alguns focos pericelulares (STETLER-STEVENSON, 1996).

Especificamente em relação aos TIMPs-1 e 2, estes são co-expressos com as MMPs controlando a atividade proteolítica sobre o tecido (HOWARD et al., 1991). Por outro lado, os inibidores de MMPs são observados durante a remodelação tecidual fisiológica contribuindo desta maneira para manutenção do equilíbrio metabólico e estrutural da MEC (NAGASE; WOESSENER, 1999; HANDSLEY; EDWARDS, 2005; NOWAK et al., 2013). Os TIMPs se diferem quanto à sua habilidade de inibição das MMPs. O TIMP-1 tem maior afinidade por MMP-9, formando complexos com formas pró-enzimáticas de MMP-9 e inibindo a ativação desta protease, enquanto o TIMP-2 tem maior afinidade pela MMP-2 (FRIDMAN et al., 2003; MOOK; FREDERIKS; VAN NOORDEN, 2004).

Souza e Line (2002) descrevem que o TIMP-1 é mais efetivo que o TIMP-2 na inibição da MMPs-1 e 3, ao passo que para inibir a atividade da MMP-2, o TIMP-2 é 10 vezes mais efetivo que TIMP-1. O equilíbrio entre as MMPs e os TIMPs representa ponto crítico na manutenção da homeostasia da MEC, já que diversos processos patológicos demonstram taxas alteradas nas sínteses destes complexos enzimáticos e de seus respectivos inibidores (SOUZA; LINE, 2002).

Ambos os TIMPs-1 e 2 tem grande afinidade mitogênica em grande número de tipos celulares, enquanto a superexpressão destes inibidores reduz o crescimento de células tumorais (GOMEZ, 1997; WURTZ, et al., 2005). Finalmente o TIMP-2 é considerado inibidor de invasão e metástase de células tumorais in vitro e in vivo, além de ser inibidor de angiogênese associado a tumores (MURPHY, 1993).

Segundo Bjorklund e Koivuen (2005) as concentrações locais de TIMP-2 influenciam a ativação da MMP-2, sugerindo que níveis moderados ou baixos deste

componente possam ativar esta MMP-2, enquanto que níveis maiores possam inibir a ação da MMP-2.

2.2.2 ATM

Este gene sintetiza uma proteína quinase de 350 kDa e 3056 resíduos de aminoácidos (YE et al., 2007; RIPPERGER et al., 2009; TAVTIGIAN et al., 2009). O *ATM* é um transdutor primário na resposta de danos do DNA, sendo ativado principalmente na quebra da dupla fita, que é a lesão mais prejudicial ao DNA e se não reparada pode levar a rearranjos genômicos e instabilidade cromossomal contribuindo com o processo de tumorigênese (BENSIMON; AEBERSOLD; SHILOH, 2011). Portanto o *ATM*, tem papel importante na regulação da resposta ao dano e no reparo do DNA, assim como na regulação do ciclo celular e apoptose, por meio de alvos como *H2AX*, *MDC1*, *Rad50*, *Nbs1*, *Chk2*, *P53*, *MDM2*, *CHEK2*, *BRCA1* (LAVIN; KHANNA, 1999; GATEI et al., 2000; DOMBERNOWSKY et al., 2008; JIANG et al., 2009; BENSIMON; AEBERSOLD; SHILOH, 2011; LALLOO; EVANS, 2012).

Quando mutado, o gene *ATM* está associado ao desenvolvimento da doença autossômica conhecida como ataxia telangiectasia (*ATM*), que caracteriza ataxia cerebelar, telangiectasias oculares, deficiência imunológica, radiosensibilidade, diabetes insulino-resistente, envelhecimento precoce e predisposição ao câncer, inclusive ao câncer de mama em humanos (TERAOKA et al., 1999; GATEI et al., 2000; CUATRECASAS et al., 2006; PROKOPCOVA et al., 2007; LAVIN, 2008; BHATTI et al., 2010).

Entretanto os mecanismos envolvidos na desregulação ocasionada pelo *ATM* em neoplasias mamárias em mulheres ainda é desconhecida (PROKOPCOVA et al., 2007). Contudo, foram observadas mutações que levaram a baixa expressão gênica e proteica do *ATM* em carcinomas mamários em mulheres. Devido ao silenciamento epigenético do *ATM* ou ainda o envolvimento dos microRNAs (VO et al., 2004; SONG et al., 2011).

Portanto a baixa expressão do *ATM* em câncer de mama em humanos está diretamente ligada com a mutação no DNA e progressão tumoral, sendo que Ye et al., 2007, observaram baixos índices de *ATM* em tumores de mama em mulheres, quando

comparado ao tecido peritumoral normal . Estes autores também observaram que o aumento dos níveis de *ATM* em pacientes com neoplasias malignas relacionando ao tempo de sobrevivência mais longo, quando comparado aos pacientes com baixa expressão.

Corroborando com os dados de Ye et al., 2007, Bueno (2013), observou em 926 amostras de neoplasias mamárias em mulheres, que nos tumores que apresentavam aumento da expressão do *ATM*, as pacientes tinham maior sobrevivência e menor progressão metastática, contrariamente, tumores que apresentavam baixos níveis de *ATM* apresentavam progressão rápida da doença e menor sobrevivência.

Além disso o *ATM* tem papel importante na ativação do gene *TP53*, quando modificações na cromatina que levam à ativação do *ATM* e conseqüentemente ativação do *TP53*, gene este responsável por interromper o ciclo celular nas fases G1/S, na tentativa de reparar o erro no DNA . Caso não ocorra o reparo do *DNA*, a célula pode ser conduzida para apoptose , porém se ocorrer o reparo do mesmo a célula poderá voltar ao ciclo celular normalmente. Portanto tanto o *ATM* quanto o *TP53* podem estar envolvidos na iniciação e progressão tumoral (EISENBERG; KOIFMAN 2001; KHANNA; CHENEVIX-TRENCH, 2004; LACROIX; TOILLON; LECLERCQ, 2006; ALMEIDA et al., 2007; LOEHLBERG et al., 2007).

A ausência da expressão do *ATM* estimula a angiogênese, devido ao estímulo de subunidades de Fatores Indutores de Hipoxia 1 (HIF-1), o qual induz fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), favorecendo o crescimento tumoral por meio do fornecimento de oxigênio e nutrição, assim como facilita o transporte de células tumorais que se desprendem do sítio primário para se implantar em sítios distantes (CUATRECASAS et al., 2006). Devido a estes fatores, o *ATM* pode estar diretamente ligado ao desenvolvimento e progressão tumoral, assim como, as MMPs-2 e 9 e seus inibidores TIMPs-1 e 2.

2.2.2.1 TP53

Mutações em oncogenes fazem com que as células possam se dividir sem restrições enquanto mutações em genes supressores de tumor fazem com que haja a produção de proteínas defeituosas que não conseguem prevenir a replicação das

células que apresentam defeito em seu DNA. Portanto, os oncogenes e os genes supressores tumorais podem levar a formação de tumores malignos resultantes da mutação. Os oncogenes podem ser ativados e os genes supressores inativados (KANDIOLER-ECKERSBERGER et al., 2000; KUMARAGURUPARAN et al. 2006).

Dentre os mecanismos incriminados na progressão neoplásica, o gene supressor tumoral *TP53* é o sítio mais frequente de alterações genéticas nas neoplasias em humanos. Este codifica a proteína P53 e é considerado o guardião do genoma (CONTE; SALLES, 2002).

Mapeado em 17p.13.1 em humanos, o gene supressor tumoral codifica uma fosfoproteína 53 kDA, que tem importante função no controle do ciclo celular. O *TP53* bloqueia células que sofreram lesão no DNA, para que haja a correção do dano, sendo que a perda da função deste gene pode estar ligada tanto à iniciação como a progressão do processo tumoral (ALMEIDA et al., 2007).

Em uma célula normal a proteína P53 é mantida em baixas concentrações pela ação de seu regulador MDM2 e possui meia vida curta. Muitas vezes a P53 pode estar na forma latente e inativa para transcrição e deve receber o sinal para iniciar sua função que resulta em aumento de sua expressão e conseqüentemente sua ativação (LEVRERO et al., 2000).

Este gene é ativado em resposta a danos no DNA, assim como na hipóxia celular. Por exemplo, o *TP53* pode promover a parada do ciclo celular na fase G1, antes de ocorrer a duplicação do DNA (fase S1), permitindo, desta forma, o reparo do DNA. Ainda o *TP53* pode parar a célula na fase G1 não permitindo que a célula progrida no ciclo celular (senescência) ou ainda iniciando a morte celular programada (apoptose) (CONTE; SALLES, 2002; VOUSDEN; PRIVES, 2009; ZUCKERMAN et al., 2009).

Por exercer papel importante na manutenção e integridade do genoma celular o *TP53* tem papel importante no desenvolvimento tumoral em 50% das neoplasias em humanos (VOUSDEN; PRIVES, 2009; ZUCKERMAN et al., 2009). Ainda segundo Zörnig et al. (2001), relataram a ocorrência de mutações específicas no gene *TP53* que podem estar associadas com resistência primária à quimioterapia e recidiva precoce em mulheres com câncer de mama. A expressão da proteína P53 defeituosa,

está relacionada com alta taxa de proliferação tumoral e recorrência precoce da doença (SOKOLOWSKA et al., 2005).

Segundo Wu et al. (2006), as mutações no *TP53* estão associadas a menor sobrevida de pacientes portadores de câncer e o seu estudo como marcador prognóstico, pode prever o comportamento clínico e a resposta à terapia no câncer de mama. Estudos em cadelas mostraram que 17% de 69% dos carcinomas mamários caninos apresentavam mutação no gene *TP53* e análises multivariadas indicaram que esta mutação conferiu aumento no risco de recidiva do tumor e morte (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Stockmann et al. (2011) relataram aumento da expressão do P53 em células tumorais de TVT porém não à correlacionaram ao prognóstico dos pacientes.

Se levarmos em conta o papel do *TP53* na interrupção do ciclo celular ou da apoptose, é possível sugerir que a perda de sua função pode permitir que células mutadas acumulem ainda mais mutações e ainda inativem outros supressores e proto oncogenes favorecendo o desenvolvimento das neoplasias (STEELE; LANE, 2005; ROGER; GADEA e ROUX, 2006; SUZUKI et al., 2009; ARAKI et al., 2010).

2.2.2.2 VEGF

Dentro dos fatores indutores de invasão metastática um dos mais importante ocorre pela formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos, porém a angiogênese depende de vários fatores como a COX-2, fator indutor de hipóxia (HIF), VEGF e angiopoietina (HOLASH; WIEGAND; YANCOPOULOS, 1999; KINOSHITA, et al., 2001).

O gene VEGF codifica um fator angiogênico, também conhecido como fator de permeabilidade vascular e vasculotropina. A expressão deste gene é estimulada quando ocorre baixo índice de oxigenação (FERRARA et al., 2003).

A expressão deste gene em tumores caninos é semelhante ao que ocorre em humanos, assim como a sinalização do VEGF é semelhante em ambas as espécies em processos patofisiológicos (MILLANTA et al., 2010). Para que ocorra o crescimento e disseminação tumoral a distância se faz necessário que este tumor seja irrigado, e portanto é imprescindível a formação de novos vasos (KINOSHITA et al.,

2001; SANTOS et al., 2010). O VEGF tem a capacidade de iniciar a cascata angiogênica e desta forma, estimular as células do endotélio vascular a formar novos vasos sanguíneos (FERRARA, 2004). A expressão do VEGF, tem sido associado ao pior prognóstico em várias neoplasias em humanos, inclusive em tumores mamários (KINOSHITA et al., 2001; SCHOEFFNER et al., 2005; PAVLAKIS et al., 2008). Existem estudos na veterinária que relatam pior prognóstico dependendo da expressão ou não do VEGF associado ao tipo histológico em tumores mamários em cadelas (AL-DISSI et al., 2007; DICKINSON et al., 2008).

Segundo Adams et al., (2000), altos níveis da expressão deste gene foram encontrados em carcinomas mamários infiltrativos em mulheres quando comparado com tumores benignos. Santos et al. (2010), verificaram que não há relação entre a expressão do VEGF e a característica patológica, sugerindo que a expressão do mesmo ocorre tanto em tumores benignos como em tumores malignos de mama em cadelas, independentemente das suas características invasivas localmente ou com características metastáticas a distância.

Segundo Millanta et al. (2010), na avaliação imuno-histoquímica, a reatividade proteica de VEGF em carcinoma mamário inflamatório em cadelas foi maior quando comparado, com o grupo de carcinoma não inflamatório. Qiu et al. (2008), relatam maior expressão proteica de VEGF em tumores mamários em cadelas quando comparado ao tecido normal mamário. Por estes motivos se faz necessário a avaliação da expressão do VEGF em TVT para discutir os mecanismos de implantação e desenvolvimento local e a distância em TVT.

2.2.2.3 COX-2

Os produtos do metabolismo do ácido araquidônico compõem um conjunto de mediadores que modulam a resposta inflamatória e imunológica, são decorrentes da oxidação do ácido araquidônico, o qual é gerado pela ação da enzima fosfolipase A₂, sobre fosfolípidios da membrana celular. A oxidação do ácido araquidônico pode ser realizada por duas vias enzimáticas: ciclooxigenase (também conhecida como PGH sintetase) e a lipooxigenase. A ação do sistema enzimático da ciclooxigenase sobre os fosfolípidios de membrana converte o ácido araquidônico em uma prostaglandina

endoperóxida estável (PGG₂), que é subsequentemente reduzida para PGH₂. Esta pode ser usada como substrato para sintetizar várias prostaglandinas, como a PGE₂, PGD₂ e PGF_{2α}. A PGH₂ pode ainda ser convertida em prostaciclina (PGI₂) ou tromboxano (TXA₂) (MONTENEGRO; FRANCO, 1999; SLAUSON; COOPER, 2002; CALDERÓN, 2005; QUEIROGA et al., 2005; WANG et al. 2006).

A resposta inflamatória modulada é importante em diversas situações como na reparação tecidual, cicatrização em resposta a patógenos, porém quando este processo se torna crônico o mesmo pode se tornar prejudicial (MARQUES, 2013). Sethi et al. (2012) correlacionam o processo inflamatório a promoção de ambiente favorável a conduzir a iniciação do desenvolvimento carcinogênico. Neste microambiente criado é possível que o processo inflamatório originado pela COX-2, possa favorecer a implantação local e a metastatização de células pelo estroma promovendo a invasão a distância (SETHI et al., 2012).

A inflamação crônica atua como reguladora da promoção e progressão tumoral, por meio da presença de citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS), 5 - lipooxigenase (LOX), metaloproteinases da matriz (MMPs) e da ciclooxigenase-2 (COX-2), assim como pela ativação de importantes fatores de transcrição como o NF-κB (fator nuclear κB), o STAT-3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), o AP-1 (ativador de proteína 1), o HIF-1α (fator indutor de hipoxia 1α), culminando numa aceleração da proliferação tumoral, evasão à apoptose, aumento da angiogênese e formação de metástase (SETHI et al., 2012).

Porém nos últimos anos se correlaciona a imunomarcagem da COX-2 ao pior prognóstico em tumores de seres humanos e animais (BEAM et al., 2003). Mecanismos associados à promoção tumoral, como aumento da angiogênese, inibição da apoptose, modulação da resposta imune, maior capacidade de invasão e metástase têm sido propostas baseados em estudos experimentais para explicar as consequências da super expressão de COX-2 (BOL et al., 2002; CAO; PRESCOTT, 2002; WANG; DUBOIS, 2004; MILLANTA et al., 2006).

Em neoplasias mamárias em cadelas, o número de células imunomarcadas pela COX-2 está diretamente ligada a classificação histopatológica, como nos carcinomas 60,3% e nos adenomas 32,1% que apresentaram diferenças na proporção de células positivas para COX-2 (DE NARDI, 2004).

Em humanos vários estudos demonstram a expressão de COX-2 em diferentes tipos histológicos como, carcinomas de cólon, mama, próstata e gástrico (DORÉ, 2011). Para alguns tumores a COX-2, parece ser um fator de prognóstico, enquanto que para outros sua expressão parece não ser importante, como nos casos de carcinomas de colo retal e nas neoplasias pulmonares em humanos (TURK et al., 2012; PENG et al., 2013). Porém em carcinomas de mama, próstata e pâncreas, este fator parece ser de grande relevância ao prognóstico e tem correlação com o tempo de sobrevida (COHEN et al., 2006; MIGLIETTA et al., 2010).

2.2.2.4 CDH-1

O *CDH-1* é o gene que expressa a E-caderina, que é uma glicoproteína presente em células epiteliais, que tem a capacidade de promover adesão celular. Sua expressão extracelular tem função de adesão, cálcio dependente e em sua região justamembranosa, esta se liga a *p-120 catenina* que modula a adesão das E-Caderinas. O seu seguimento distal citoplasmático se liga e interage com a β -catenina que se liga a α -catenina para então se ligar diretamente a F-actina acoplando a E-Caderina. Desta forma, as caderinas podem acoplar e formar citoesqueletos que possuem a função de formar complexos adesivos celular que são essenciais para estabelecer o equilíbrio tecidual e para formação dos tumores (ONDER et al., 2008; BARANWAL; ALAHARI, 2009; HULPIAU; ROY, 2009).

Em neoplasias em seres humanos, a redução da expressão proteica de E-caderina pode ocorrer pelas mutações somáticas, depleção cromossômica, clivagem proteolítica ou silenciamento do gene *CDH-1* (ONDER et al., 2008; YILMAZ; CHRISTOFORI, 2009). Além disso, mudanças na expressão de proteínas que fazem parte do complexo de adesão da E-Caderina, podem comprometer sua função. A reorganização da cromatina, hipermetilação, perda de fator de transcrição, coincidem com a perda da função da E-Caderina (SEMB; CHRISTOFORI, 1998). Por estes motivos, as células tumorais perdem a capacidade de adesão intercelular favorecendo a migração pelo interstício e via corrente sanguínea ou linfática para disseminação a distância (GOODSELL, 2002).

A expressão diminuída ou ausente em neoplasias epiteliais está diretamente ligada ao potencial metastático das mesmas, assim como também libera proteínas de seu complexo citoplasmático de adesão celular que exercem funções ambivalentes dependendo de sua localização. Um exemplo disso é a expressão da β -catenina, conhecida pelo seu duplo papel na adesão celular e a participação na via *Wnt*, nesta via a β -catenina em excesso se desloca para o núcleo, liga-se a fatores transcricionais e estimula a cromatina ativando, desta forma, a produção de células tronco e consequentemente promovendo a proliferação celular (CLEVERS, 2006; MANI et al., 2008).

Segundo João et al., (2011), 14 amostras (70%) dos casos de carcinomas de células escamosas apresentaram baixa expressão da E-caderina e somente seis (30%) apresentaram a molécula preservada. Neste mesmo trabalho a expressão da E-caderina foi inverso nos carcinomas de células basais, sendo que 12 amostras apresentaram expressão da E-Caderina em (75%) das células e somente três, (20%) a expressão estava reduzida. Já os carcinomas mamários de alta malignidade apresentam baixa expressão de E-caderina, diferente dos de baixa malignidade. Também é correlacionada a perda da expressão da E-caderina com o tamanho do tumor, presença de ulceração, invasão de linfonodos adjacentes e necrose (BRUNETTI et al., 2005; MATOS et al., 2006; PIEKARZ et al., 2008).

Segundo Fonseca - Alves et al. (2013) a expressão da E-caderina está diminuída em carcinomas de próstata em cães em relação com a próstata normal. Mackowiak et al. (2012) relatam menor imunomarcagem em mastocitoma de grau III quando comparado aos graus I e II, demonstrando a importância da baixa expressão na progressão desta neoplasia à distância. Aresu et al. (2010) observaram baixa expressão de E-caderina em 75% de 44 amostras de carcinomas coloretais em cães, quando comparada a mucosas intestinais não neoplásicas.

No homem a baixa expressão da E-caderina em tumores colorretal está relacionada a disseminação para sítios distantes, assim como a menor sobrevida (KWAK et al., 2007). Uma vez que não há na literatura consultada relatos sobre a expressão desses genes no TVT e que este tumor é um bom modelo de estudo de transmissão de células neoplásicas, a avaliação desses genes no TVT pode contribuir

para o entendimento da patogenia do processo, bem como na implantação de células metastáticas.

3. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 1549, 2009.

ALEXANDER, J.W.; BRAUNSTEIN, H.; ALTEMEIER, W. A Transplantation studies of the veneral sarcoma of dogs. **Journal of Surgical Research**, New York, v.4, n.4, p.151-159, 1964.

ALMEIDA, J. R. C.; PEDROSA, N. L.; LEITE, J. B.; FLEMING, T. R. P.; CARVALHO, V. H.; CARDOSO, A. A. A. Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 305-316, 2007.

AMBALI, A. G.; MOHAMMED, A. Clinic Accessions to Maiduguri Veterinary Teaching Hospital, 1996 to 1990. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 317-319, 1994.

ARAKI, S.; EITEL, J. A.; BATUELLO, C. N.; BIJANGI-VISHEHSARAEI, K.; XIAN-JIN, X.; DANIELPOUR, D.; POLLOK, K. E.; BOOTHMAN, D. A.; MAYO, L. D. TGF β -1-induced expression of human Mdm2 correlates with late-stage metastatic breast cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, London, v. 120, n. 1, p. 290-302, 2010.

ARESU, L.; PREGEL, P.; ZANETTI, R.; CALIARI, D.; BIOLATTI, B.; CASTAGNARO, M. E-cadherin and β -catenin expression in canine colorectal adenocarcinoma. **Research Veterinary Science**, London, v.89, n. 3, p. 409-414, 2010.

ASADAMONGKOL, B.; ZHANG, J. H. The development of hyperbaric oxygen therapy for skin rejuvenation and treatment of photoaging. **Medical Gas Research**, London, v. 1, n. 4, p. 1-7, 2014.

BAKER, A. H.; EDWARDS, D. R; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **Journal of Cell Science**, London, v. 115, p. 3719-3727, 2002.

BAHUDHANAPATI, H.; ZHANG, Y.; SIDHU, S.S.; BREW, K. Phage Display of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 (TIMP-2). **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 36, p. 31761-31770, 2011.

BARANWAL, S.; ALAHARI, S. K. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. **Biochemical and Biophysical research communications**, New York, v. 384, p. 6-11, 2009.

BARROS, S. S. L. V. **Expressão imuno-histoquímica de metaloproteínas em carcinomas epidermoide de lábio inferior e língua**. 2006. 130 p. Tese (Doutorado em Patologia) -Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2006.

BATISTA, J. S.; SOARES, S. H.; PERREIRA, R. H. M. A.; PETRI, A. ; SOUZA, F. D. N.; NUNES, F. C. R. Tumor venéreo transmissível intraocular e metástase no baço. **Acta Veterinária Brasilica**, Mossoróv, 1, n. 1, p. 45-48, 2007.

BEAM, S. L.; RASSNICK, K. M.; MOORE, A. S.; MCDONOUGH, S. P. An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in various feline neoplasms. **Veterinary Pathology**, New York, v. 40, p. 496-500, 2003.

BELOV, K. Contagious cancer: Lessons from the devil and the dog. **Bioessays Periodicals**, Cambridge, v.34, n. 4, p.1-8, 2012.

BENSIMON, A.; AEBERSOLD, R.; SHILOH, Y. Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 585, n. 11, p. 1625-1639. 2011.

BHATTI, S.; KOZLOV, S.; FAROOQI, A. A.; NAGI, A.; LAVIN, M.; KHANNA, K. K. . ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, v. 68, n.18, p. 2977-3006. 2010.

BJORKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 1755, n. 1, p. 37-69, 2005.

BOL, D. K.; ROWLEY, B.; HO, C. P.; PILZ, B.; SWERDEL, M.; KIGUCHI, K.; MUGA, S.; KLEIN, R.; FISCHER, M. Cyclooxygenase 2 overexpression in the skin of transgenic mice results in suppression of tumor development. **Cancer Research**, Chicago, v. 62, p. 2516-2521, 2002.

BORNSTEIN, P.; SAGE, H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 14, n. 5, p. 608-616, 2002.

BOSCOS, C.M.; VERVERIDIS, H. N.; TONDIS, D. K.; STAMOU, A. I.; SAMARTZI, F. COcular involvement of transmissible venereal tumor in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, Osney Mead, v.1, n.2-3, p.167-170, 1998.

BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Seminars in Cancer Biology**, London, v. 20, n. 3, p. 161-168, 2010.

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

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 1488.

BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1803, n. 1, p. 55-71, 2010.

BRUNETTI, B.; SARLI, G.; PREZIOSI, R.; MONARI, I.; BENAZZI, C. E-Cadherin and β -catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. **Veterinary Pathology**, New York, v.42, p.781-787, 2005. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/42/6/781.full.pdf+html>>. Acesso em: 13 abr. 2011. doi: 10.1354/vp.42-6-781.

BUENO, C. R.; CANEVAN, R. A.; VILLACIS, R. A. R.; DOMINGUES, M. A..C.; CALDEIRA, J. R. F.; ROCHA, R. M.; DRIGO, S. A. ROGATTO, S. R. ATM down-regulation is associated with poor prognosis in sporadic breast carcinomas. **Annals of Oncology**, Boston, v. 25, n. 1, p. 69-75, 2013.

BURDUK, P. K.; SAWICKI, M. B. P.; SZYLBERG, L.; WI_SNIEWSKA; E., KA_ZMIERCZAK, W.; MARTY_NSKA, M; MARSZAŁEK, A. Expression of metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors 1 and 2 as predictors of lymph node metastases in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **5th European Conference on Head and Neck Oncology in Poznan**, Poland, p. 18–21, 2012.

CALDERÓN, C. **Avaliação da ciclooxigenase-2 e do índice de proliferação celular dos mastocitomas cutâneos caninos pela histopatologia, histoquímica e imunoistoquímica**. 2005. 110 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

CAO, Y.; PRESCOTT, S. M.; Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **Journal of Cellular Physiology**, New York, v. 190, n. 3, p. 279-286, 2002.

CLARK, I. M.; SWINGLER, T. E.; SAMPIRE, C. L.; EDWARDS, D. R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **International Journal of Biochemistry; Cell Biology**, Amsterdam, v. 40, n. 6-7, p. 1362-78, 2008.

CLEVERS, H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. **Cell**, Cambridge, v. 127, n. 3 p. 469-480, 2006.

COHEN, B. L.; GOMEZ, P.; OMORI, Y.; DUNCAN, R. C.; CIVANTOS, F.; SOLOWAY, M. S.; LOKESHWAR, V.B.; LOKESHWAR, B. L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is an independent predictor of prostate cancer recurrence. **International Journal of Cancer**, New York, v. 119, n. 5, p. 1082-1087, 2006.

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

CONTE, A. C. F.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 24. n. 2. p. 85-89, 2002.

CORBEL, M.; BOICHOT, E.; LAGENTE, V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 749-754, 2000.

CUATRECASAS, M.; SANTAMARIA, G.; VELASCO, M.; CAMACHO, E. HERNANDEZ, L. SANCHES, M.; ORRIT, C.; MURCIA, C.; CARDESSA, A.; CAMPO, E.; FERNANDEZ, P. L. ATM gene expression is associated with differentiation and angiogenesis in infiltrating breast carcinomas. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 21, n. 2, p. 149–156, 2006.

CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. **Journal of Pathology**, London, v. 189, n. 3, p. 300-308, 1999.

DAS, U.; DAS, A. K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 24, n. 8, p. 545-556, 2000.

DE NARDI, A. B. **Expressão da ciclooxygenase-2 nas neoplasias de mama em cadelas (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758)**.2004. 54p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

DOMBERNOWSKY, S. L.; EISCHER, M.; ALLIN, K.H.; BOJESSEN, S. E.; HANSEN, A. T.; NORDESTGAARD, B. G. Risk of cancer by ATM missense mutations in the general population. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, New York, v. 26, n. 18, p. 3057-3062, 2008.

DORÉ, M. Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers. **Veterinary Pathology**, New York, v. 48, n. 1, p. 254-265, 2011.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the Matrix Metalloproteinase in Cancer Progression. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 2, n. 3, p. 161-174, 2002.

EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 377-388, 2001.

FELLIN, I. P. D.; GRIVICICH, I.; FELLIN, C. R.; FEDIRGO, C. A.; ROCHA, A. B. Metalloproteinases 2 and 9 immunohistochemistry expression is not associated to esophageal squamous cell carcinoma progression. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.45 n.4, p. 317-326, 2009.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, New York, v. 9, n. 6, p. 669-673, 2003.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 25, p. 581 – 611, 2004.

FERREIRA, A.J.; JAGGY, A.; VAREJÃO, A. P.; FERREIRA, M. L.; CORREIA, J. M.; MULAS, J. M.; ALMEIDA, O.; OLIVEIRA, P.; PRADA, J. . Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.41, n.4, p. 165-168, 2000.

FLORES, P. E.; DIEZ, Y. X.; DIAZ, R. A. M.; URCELAY, V. S.; CATTANEO, U. G. Comparison of the neoplasms recorded in two periods (1981-1985 and 1986-1988) at the surgery section of the faculty of Veterinary Medicine. **Avances en Ciencias Veterinarias**, Santiago, v. 8, n. 1, p. 61-65, 1993.

FONSECA, L. S. **Tumor venéreo transmissível espontâneo canino: A inserção do transposon line-1 no gene C-MYC e os critérios de malignidade**. 2009. p. 81. Tese (Doutorado em Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2009.

FONSECA-ALVES, C. E.; RODRIGUES, M. M.; DE MOURA, V. M.; ROGATTO, S. R.; LAUFER-AMORIM, R. Alterations of C-MYC, NKX3.1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 76, n. 12, p.1250-1256, 2013.

FRIDMAN, R.; MARTA, T.; IRENA, C.; SAMY, O. M.; MOBASHERY, S. Cell surface association of matrix metalloproteinase 9 (Gelatinase B). **Cancer and Metastasis Reviews**, Boston, v. 22, n. 3, p. 153-166, 2003.

GATEI, M.; SCOTT, S. P.; FILIPPOVITCH, I.; SORONIKA, N.; LAVIN, M. F.; WEBER, B.; KHANNA, K. K.. Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA11. **Cancer Research**, Chicago, v. 60, p. 3299–3304, 2000.

GERARDI, D. G. Mecanismos de resistência aos quimioterápicos. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2009. p. 179-194.

GINEL, P. J.; MOLLEDA, J. M.; NOVALES, M.; MARTIN, E.; MARGARITA, J. M.; LOPES, R. Primary transmissible venereal tumor in the nasal cavity of a dog. **The Veterinary Record**, London, v. 136, n. 9, p. 222-223, 1995.

GOMEZ, D. E. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, regulation and biological functions. **European journal Cell Biology**, Jena, v. 74, n. 2, p. 111-122, 1997.

GONÇALVEZ, C. G.; SANCHES, B. C. A.; VELES, H. M. E.; BUEN, D. E. Neoplasms of the reproductive system in bitches: retrospective study over 6 years. **Veterinária México**, Mexico D.F., v. 28, n.1, p. 31-34, 1997.

GOODSELL, D.S. The molecular perspective cadherin. **The Oncologist**, Dayton, v.20, n. 6 p.467-468, 2002.

GUTTMAN, D. Expression of MMP-9, TIMP-1, CD-34 and factor-8 as prognostic markers for squamous cell carcinoma of the tongue. **Oral Oncology**, Amsterdam, v. 40, n. 8, p. 798-803, 2004.

HANDSLEY, M. M.; EDWARDS, D. R. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. **International Journal Cancer**, v. 20, n. 115, p. 849-860, 2005.

HASLER, A. H.; WEBER, W. T. Theriogenology question of the month. Transmissible venereal tumor (TVT). **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 216, n (10): p. 1557-1559, 2000.

HEO, D. S.; CHOI, H.; YEOM, M. Y.; SONG, B. J.; OH, S. J. Serum levels of matrix metalloproteinase-9 predict lymph node metastasis in breast cancer patients. **Oncology Reports**, Athens, v. 31, n. 4, p. 1567-1572, 2014.

HOLASH, J.; WIEGAND, S. J.; YANCOPOULOS, G. D. New model of tumor angiogenesis dynamic balance between vessel regression and growth mediated by Angiopoietins and VEGF. **Oncogene**. v. 20, n. 18, p. 5356–5362, 1999.

HOWARD, E. W.; BULLEN, C. E.; BANDA, M. J. Preferential inhibition of 72 and 92 kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases 2. **Journal Biological Chemistry**, San Francisco, v. 266, n. 20, p. 13070-13075, 1991.

HRABEC E., NADUK J., STREK M., HRABEC Z.: Collagenases IV (MMP-2 and MMP-9) and their substrates –intracellular proteins, cytokines, chemokines and their receptors. **Postępy Biochemii**, Warszawa, v. 53, n.1, p. 37-45, 2007.

HULPIAU, P.; ROY, F. V. Molecular evolution of the cadherin superfamily. **The International Journal of Biochemistry; Cell Biology**, Amsterdam, v. 41, p. 349-369, 2009.

HUPPES, R. R.; MARINHO, P. V. T.; DA SILVA, J. A. R.; PAZZINI, J. M.; AMORIM, R. L. **Tumor venéreo transmissível (TVT) com metástase a distância na medula toracolombar em um cão**. Relato de caso. Congresso Paulista de Especialidades. São Paulo, 2012

ITOH, Y.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases in cancer. **Essays Biochemistry**, Portland, v.38, n. 21, p.21-36, 2002.

JACOB - FERREIRA, A. L.;SCHULZ, R. Activation of intracellular matrix metalloproteinase-2 by reactive oxygen-nitrogen species: Consequences and therapeutic strategies in the heart. **Archives Biochemistry Biophysics**, New York, v. 540, n. 1-2, p. 82-93, 2013.

JIANG, H.; REINHARDT, H. C.; BARTKOVA, L.; TOMMISKA, J.; NEVANLINNA, H.; BARTEK, J.;YAFFE, M. B.; HEMANN, M. T. The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response. **Genes; Development**, New York, v.15, n. 23, p.1895–1909, 2009.

JOÃO, C. F.; TINUCCI-COSTA, M.; CARDILLI, D. J.; FARIA, J. L. F.; MAGALHÃES, G. M.; ALESSI, A. C. Expressão da E-caderina em carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 41, n. 9, p. 1611-1616, 2011.

JOHNSON, C.A. Distúrbios Reprodutivos. In: NELSON, R. W., COUTO, C. G. **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 463-530, 1994.

KANDIOLER-ECKERSBERGER, D.; LUDWIG, C.; RUDAS, M.; KAPPEL, S.; JANSCHKE, E.; WENZEL, C.; SCHLAGBAUER-WAKL, H.; MITTLBÖCK, M.; GNANT, M.; STEGER, G.; JAKESZ, R. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. **Clinical Cancer Research**, Chicago, v. 6, n. 1, p. 50-56, 2000.

KARSON, A.G., MANN, F.C. The transmissible venereal tumor of dogs: observations of forty generations of experimental transfers. **Annals of the New York Academy Sciences**, New York, v.54, n. 6, p.1197-1223, 1952.

KATO, K.; HARA, A.; KUNO, T.; KITAORI, N.; HUILAN, Z.; MORI, H.; TOIDA, M.; SHIBOTA, T. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in oral Squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, Berlin, v. 131, n. 6, p. 340-346, 2005.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment, **Cell**, Cambridge, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010.

KHANNA, K. K.; CHENEVIX-TRENCH, G. ATM and genome maintenance: defining its role in breast cancer susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 9, n. 3, p. 247-62, 2004.

KINOSHITA, J.; KITAMURA, K.; KABASHIMA, A.; SAEKI, H.; TANAKA, S.; SUGIMACHI, K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast câncer. **Breast Cancer Research and Treatment**.Netherlands, v. 66, n. 2, p. 159–164, 2001.

KNAPP, D.W., WATERS, D.J.; SCHMIDT, B.R. Tumors of urogenital system and mammary glands. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine: diseases of the dog and cat**. 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000, v.1, p. 541-546.

KOIKE, T.; OTOMO, K.; KUDO, D. Clinical examination of canine transmissible venereal sarcoma: relationship between hematological and histological findings. **Journal of Japanese Veterinary Medicine Association**, Tokio, v.32, n.3, p.137-140, 1979.

KRAWCZUC-RYBAK, M.; KUZMICZ, M.; MROCZKO, B.; SZMITKOWSKI, M. Plasma matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in children treated for acute lymphoblastic leukemia. **Polski Merkuriuzs Lekarski**, Warszawa, v. 29, n. 169, p.8-14, 2010.

KUBOTA, Y.; NINOMIYAT, T.; OKA, S.; TAKENOSHITA, Y.; SHIRASUNA, K. Interleukin-1 dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of odontogênico jaw cysts. **Journal Dental Research**, Chicago, v. 79, n. 6, p. 1423-1430, 2000.

KUMARAGURUPARAN, R.; KARUNAGARAN, D.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B.M.; NAGINI, S. Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, Amsterdam, v.365, n.1, p.168-76. 2006.

KWAK, J.M.; MIN, B.W.; LEE, J.H.; CHOI, J.S.; LEE, S.I.; PARK, S.S. The prognostic significance of E-cadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer. **Diseases of the Colon and Rectum**, Philadelphia, v.50, p.1873-1880, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/0q34lpg57gt37737/fulltext.pdf>>. Acesso em: 13 abr. 2011. doi: 10.1007/s10350-007-9034-1.

KWIATKOWSKI, P.; GODLEWSKI, J.; ŚLIWIŃSKA-JEWSIEWICKA, A.; KMIEĆ Z. Rola metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie inwazji nowotworu. **Polish Annals of Medicine**, Olsztyn, v. 15, n. 1, p. 43-50, 2008.

LACROIX, M.; TOILLON, R. A.; LECLERCQ, G. P53 and breast cancer, an update. **Endocrine-Related Cancer**, Bristo, v. 13, n. 2, p. 293-325, 2006.

LALLOO, F.; EVANS, D. G. Familial breast cancer. **Clinical Genetics**, Copenhagen, v. 82, p. 105–114. 2012.

LAPA, F. A. S. **Estudo comparativo da eficácia de dois protocolos de tratamento de tumor venéreo transmissível em cães**. 2009. p. 73. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal-Fisiopatologia Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2009.

LAVIN, M. F.; KHANNA, K. K. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 75, n. 10, p. 1201–1214, 1999.

LAVIN, M.F. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 9, n. 10, p. 759-769. 2008.

LEVRERO, M.; DE LAURENZI, V.; CONSTANZO, A.; SABATINI, S.; GONG, J.; WANG, J. Y. J.; et al. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. **Journal of Cell Science**, San Diego, v. 113, n. 10, p. 1661-1670, 2000.

LIU, W.; ZENG, Z. Y.; WU, Q. L.; HOU, J. H.; CHEN, Y. Y. Overexpression of MMP-2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. **JAMA Otolaryngology-- Head; Neck Surgery**, Chicago, v. 132, n. 3, p. 395- 400, 2005.

LOEHLBERG, C. R.; THOMPSON, T.; KASTAN, M. B.; MACLEAN, K. H.; EDWARDS, D. G.; KITTRELL, F. S.; MEDINA, D.; CONNEELY, O. M.; O'MALLEY, B. W. Ataxia telangiectasia-mutated and p53 are potential mediators of Chloroquine-induced resistance to mammary carcinogenesis. **Cancer Research**, Chicago, v. 67, n. 24, p. 12026-12033, 2007.

LOUAR, A. S. Tumores do sistema genital e glândulas mamárias. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1996. p. 1894-1996.

MACEWEN, E. G. Transmissible venereal tumor. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 2 ed. Philadelphia: Saunders, cap. 29, 1996, p. 533-538.

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

MANI, S. A.; GUO, W.; LIAO, M. J.; EATON, E. N.; AYYANAN, A.; ZHOU, A. Y.; et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, Cambridge, v. 133, n. 4, p. 704-715, 2008.

MACKOWIAK, L. I.; GENTILE, L. B.; CHAIBLE, L. M.; NAGAMINE, L. M.; GUERRA, J. M.; MOTA, E. F. F.; MATERA, J. M.; MENNECIER, G.; SANCHES, D. S.; DAGLI, M. L. Z. E-cadherin in canine mast cell tumors: Decreased expression and altered subcellular localization in Grade 3 tumors. **The Veterinary Journal**, London, v. 194, n. 3, p. 405-411, 2012.

MARQUES, D. C S. **Avaliação da expressão da cox-2 em tumores mamários de cadela**. 2013, p. 90. Dissertação (Mestrado integrado em medicina veterinária) - Universidade de Lisboa. Lisboa, 2013.

MATOS, A.J.F.; ; LOPES, C.; CARVALHEIRA, J.; SANTOS, M.; RUTTEMAN, G.R.; GÄRTNER, F.E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. **Journal Comparative Pathology**, London, v.134, p.182-189, 2006. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg_imagekey=B6WHW-4JHMJX0-1-5;_cdi=6861;_user=972052;_pii=S0021997505001222;_origin=gateway;_coverDate=04%2F30%2F2006;_sk=998659997;view=c;wchp=dGLzVzbzSkzV;md5=8ab1a308298115bf31b02b00016e4d58;ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2011. doi: 10.1016/j.jcpa.2005.10.004.

MIGLIETTA, A.; TOSELLI, M.; RAVARINO, N.; VENCIA, W.; CHIECCHIO, A.; BOZZO, F.; MOTTA, M.; TORCHIO, B.; BOCCA, C. COX-2 expression in human breast carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, London, v. 14, n. 7, p. 655-664, 2010.

MILLANTA, F.; CANESCHI, V.; RESSEL, L.; CITI, S.; POLI, A. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Inflammatory and Non-inflammatory Mammary Carcinoma. **Journal Comparative Pathology**, London, v. 14.2, n. 1, p. 36-42, 2010.

MILLANTA, F.; CITI, S.; DELLA SANTA, D.; PORCIANI, M.; POLI, A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. **Breast Cancer Research and Treatment**, Netherlands, v. 98, n. 1, p. 115-120, 2006.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 320.

MOOK, O. R. F.; FREDERIKS, W. M.; VAN NOORDEN, C. J. F. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, Shanghai, v. 1705, n. 2, p. 69-89, 2004.

MORGAN, J. D. S. Chemotherapy administration. In: Cancer Management. In: **Small Animal Practice**. Copyright: cap. 4, 2010, p. 101-114.

MURPHY, A. N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits BFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. **Journal cellular physiology**, New York, v. 157, n. 2, p. 351-358, 1993.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 290-308, 2008.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, Cambridge, v. 69, n. 3: p. 562-573, 2006.

NAGASE, H.; WOESSENER, J. F. Jr. Matrix metalloproteinases. **Journal Biological Chemistry**, San Francisco, v. 274, n. 31, p. 21491-21494, 1999.

NAK, D.; NAK, Y.; CANGUL, I. T.; TUNA, B. A clinic-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumor in dogs. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, Série A, v. 52, n. 7, p. 366-370, 2005.

NISSINEN, L; KÄHÄRI, V. M. Matrix metalloproteinases in inflammation. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, 2014. In print. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.03.007>>.

NOWAK, E.; GALILEJCZYK, A.; SYPNIEWSKI, D.; BEDNAREK, I. MMP-9 directed shRNAs as relevant inhibitors of matrix metalloproteinase 9 activity and signaling. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej**, Warsaw, v. 5, n. 67, p. 742-749, 2013.

OLGIVIE, G.K.; MOORE, A.S. Tumors of the reproductive system. In: _____. **Managing the Veterinary Cancer Patient: a practice manual**. Trenton: Veterinary Learning Systems, 1995, p.415-429.

ONDER, T. T.; GUPTA, P. B.; MANI, S. A.; YANG, J.; LANDER, E. S.; WEINBERG, R. A. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. **Cancer Research**, Chicago, v. 68, n. 10, p. 3645-3654, 2008.

PAGE-MCCAW, A., EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 8, n. 3, p. 221–233, 2007.

PAPAZOGLU, L. G.; KOUTINAS, A. F.; PLEVRAKI, A. G.; TONTIS, D. Primary intranasal transmissible venereal tumour in the dog: a retrospective study of six spontaneous cases. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, Berlin, v. 48, n. 7, p. 391-400, 2001.

PAVLAKIS, K.; MESSINI, I.; VREKOUSSIS, T.; YIANNOU, P.; KERAMOPOULLOS, D.; LOUVROU, N.; LIAKAKOS, T.; STATHOPOULOS, E. N. The assessment of angiogenesis and fibroblastic stromagenesis in hyperplastic and pre-invasive breast lesions. **BMC Cancer**, London, v.8, p. 8- 88, 2008.

PENG, L.; ZHOU, Y.; WANG, Y.; MOU, H.; ZHAO, Q. Prognostic Significance of COX-2 Immunohistochemical Expression in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. 1-9, 2013.

PEREIRA, J. S.; SILVA, A. B.; MARTINS, A. L.; FERREIRA, A. M. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 43-47, 2000.

PIEKARZ, C.H.; BIONDO, A. W.; AMORIM, R. L.; RODASKI, S.; BARROS FILHO, I. R.; DE NARDI, A. B. Expressão das caderinas nos tumores mamários em cadelas. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Santiago, v.13, n. 1, p.13-21, 2008.

POLETTE, M.; NAWROCKI-RABI, B.; GILLES, C.; CLOVEL, C.; BIREMBOUT, P. Tumour invasion and matrix metalloproteinase. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 179-186, 2004.

PROKOPCOVA, J.; KLEIBL, Z.; BANWELL, C. M.; POHLREICH, P. The role of ATM in breast cancer development. **Breast Cancer Research and Treatment**, Netherlands, v. 104, n. 2, p. 121-128, 2007.

QIU, C. W.; LIN, D. G.; WANG, J. Q.; LI, C. Y.; DENG, G. Z. Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 32, p. 463–472. 2008.

QUEIROGA, F. L.; PEREZ-ALENZA, M. D.; SILVAN, G.; PENA, L.; LOPES, C.; ILLERA, J. C. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. **Anticancer Research**, Athens, v. 25, n. 6B, p. 4269-4275, 2005.

RIBEIRO, R. L. M. A.; JUNIOR, P. C. B.; CARDOSO, S. V.; CANDELARI, I. ; ESPÍNDOLA, F. S.; CASSALI, G. D.; LOYOLA, A. M. Expressão das metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em carcinomas basocelulares. **Jornal Brasileiro Patologia Medicina Laboratorial**. v. 44. n. 2. p. 115-121. 2008.

RIPPERGER, T.; GADZICKI, D.; MEINDL, A.; SCHLEGELBERGER, B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counseling. **European Journal of Human Genetics**, Basel, v. 17, n. 6, p. 722 – 731, 2009.

RIES, C. Cytokine functions of TIMP-1. **Cellular Molecular Life Science**, Boston, v. 71, n. 4, p. 659-672, 2014.

RODASKI, S.; DE NARDI, A. B. Classificação dos quimioterápicos. In: _____. **Quimioterapia Antineoplásica em Cães e Gatos**. Curitiba: Bio, 2006. p. 98-134.

ROGER, L.; GADEA, G.; ROUX, P. Control of cell migration: a tumor suppression function for p53 ? **Biology of the cell**, Ivry sur Seine France, v. 98, p. 141-152, 2006.

ROGERS, K. S.; WALKER, M. A.; DILLON, H. B. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. **Journal American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 34, n. 6, p. 463–470, 1998.

RUNDHAUG, J.E. Matrix metalloproteinases, angiogenesis and cancer. **Clinical Cancer Research**, Chicago, v. 9, n.2 p. 551-554, 2005.

SANTOS, A. A. F.; OLIVEIRA, J. T.; LOPES, C. C. C.; AMORIM, I F.; VICENTE, C. M. F. B.; GA`RTNER, F. R. M. MATOS, A. J. F. Immunohistochemical Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mammary Tumours. **Journal Comparative Pathology**, London, v. 143, n.4, p. 268 – 275, 2010.

SCHENK, S.; QUARANTA, V. Tales from the cryptic sites of the extracellular matrix. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 13, n. 7, p. 366-375, 2003.

SEMB, H.; CHRISTOFORI, G. The tumor-suppressor function of E-cadherin. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.63, p.1588-1593, 1998.

SETHI, G.; SHANMUGAM, M.K.; RAMACHANDRAN, L.; KUMAR, A.P.; TERGAONKAR, V. Multifaceted link between cancer and inflammation. **Bioscience Reports**. v.32, n.1, p.1-15, 2012.

SINGH, J. ; RANA, J. S.; SOOD, N.; PANGAWKAR, G. R.; GUPTA, P. P. Clinico-pathological studies on the effect of different anti-neoplastic chemotherapy regimens on transmissible venereal tumors in dogs. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 71-78, 1996.

SLAUSON, O. D.; COOPER, B. J. **Mechanisms of Disease**. 3. ed. Missouri: Gosby, 2002. p. 445.

SCHRÖPFER, A.; KAMMERER, U.; KAPP, M.; DIETL, J.; FEIX, S.; ANACKER, J. Expression pattern of matrix metalloproteinases in human gynecological cancer cell lines. **BMC Cancer**, London, v. 10, n. 553, 2010.

SOKOLOWSKA, J.; CYWINSKA, A.; MALICKA, E. p53 expression in canine lymphoma. **Journal of Veterinary Medicine - A Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, Berlin, v. 52, n. 4, p. 172-175, 2005.

SONG, L.; LIN, C.; WU, Z.; GONG, H.; ZENG, Y.; WU, J.; LI, M.; LI, J. MiR-18a impairs DNA damage response through downregulation of ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 9, p.25454. 2011.

SORENMO, K. U; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 5. ed. Saunders: St. Louis, 2013, p. 538-547.

SOUSA, M.G.; PEREIRA, G.; TAVARES, T.M.; BETINI, M. Transmissible venereal tumor inside abdominal cavity – laboratorial and ultrasonographic evaluation during treatment. In: Congress of Federation of European Companion Animal Veterinary Association, 9, Estoril. **Anais...Estoril: FECAVA**, 2003, p. 261.

SOUZA, A. P.; LINE, S. R. P. The biology of matrix metalloproteinases. **Rev Fob**, Bauru, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2002.

SOUZA, J.; SAITO, V.; NARDI, A. B.; RODASKI, S.; GUÉRIOS, S. D.; BACILA, M. Característica e incidência do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães e eficiência da quimioterapia e outros tratamentos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 41-48, 2000.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases, in tumor invasion and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, London, v. 10, n. 6, p. 415-433. 2000.

STEELE, R. J.; LANE, D. P. p53 in cancer: a paradigm for modern management of cancer. **The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland**, Edinburgh, v. 3, n. 3, p. 197-205, 2005.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, California, v. 17, p. 463-516, 2001.

STETLER-STEVENSON, W. G. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 148, n. 5, p. 1345-1350, 1996.

STOCKMANN, D.; FERRARI, H. F.; ANDRADE, A. L.; CARDOSO, T. C.; LUVIZOBOTTO, M. C. R. Detection of the tumour suppressor gene *TP53* and expression of p53, Bcl-2 and p63 proteins in canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Comparative Oncology**, Oxford, v. 9, n.4, p. 251-259, 2011.

SUZUKI, H. I.; YAMAGATA, K.; SUGIMOTO, K.; IWAMOTO, T.; KATO, S.; MIYAZONO, K. Modulation of microRNA processing by p53. **Nature**, London, v. 460, p. 529-534, 2009.

TAVTIGIAN, S. V.; OEFNER, P.J.; BABIKYAN, D.; HARTMANN, A.; HEALEY, S.; LE CALVEZ-KELM, F.; LESUEUR, F.; BYRNES, G.B.; CHUANG, S.; FOREY, N.; CHENEVIX-TRENCH, G. Rare, evolutionarily unlikely missense substitutions in ATM confer increased risk of breast cancer. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 85, p. 427–446, 2009.

TERAOKA, S. N.; TELATAR, M.; BECKER-CATANIA, S.; LIANG, T.; ONENGUT, S.; TOLUN, A.; CHESSA, L.; SANAL, O.; BERNATOWSKA, E.; GATTI, R. A.; CONCANNON, P. Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 64, n.6, p. 1617–1631, 1999.

THOMAS, G. T.; LEWIS, M. P.; SPEIGHT, P. M. Matrix metalloproteinases and oral cancer. **Oral Oncology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 227-233, 1999.

TINUCCI-COSTA, M. Tumor venéreo transmissível canino. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2009. cap. 34, p. 540-551.

TINUCCI-COSTA, M. **Tumor Venéreo Transmissível Canino: estudos imunohistoquímicos e de transplantações xenogênicas e alogênicas**. 1999. 149 p. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 1999.

TURK, H. M.; CAMCI, C.; SEVINC, A.; BUKYUKBERBER, S.; SARI, I.; ADLI, M. Cyclooxygenase-2 Expression is not a Marker of Poor Survival in Lung. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 13, n. 1, p. 315-318, 2012.

UZUELLI, J. U. **Alterações das concentrações plasmáticas de troponina I e de metaloproteinases 2 e 9 da matriz extracelular após embolia aguda em cães**. 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

VARASCHIN, M. S.; WOUTERS, F.; BERNINS, V. M. O.; SOARES, T. M. P.; TOKURA, V. N.; DIAS, M. P. L. L. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais; formas clínico-patológica. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 6, n. 32, p. 332-338, 2001.

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

VICENTE, J. C.; FRESNO, M. F.; VILLALAIN, L.; VEGA, J. A.; HERNÁNDEZ VALLEJO, G. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinases-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, Amsterdam, v. 41, n. 3; p. 283- 293, 2005.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, Baltimore, v. 92, n. 8, p. 827-829, 2003.

VO, Q. N.; KIM, W. J.; CVITANOVIC, L.; BOUDREAU, D. A.; GINZINGER, D. G.; BROWN, K. D. The ATM gene is a target for epigenetic silencing in locally advanced breast cancer. **Oncogene**, v.16, n. 23, p. 9432-9437. 2004.

VON HOLDT, B. M.; OSTRANDER, E. A. The singular history of a canine transmissible tumor. **Cell**, Cambridge, n. 126, n. 3, p. 445-447. 2006.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. **Cell**, Cambridge, v. 137, n. 3, p. 413-431, 2009.

WAJNER, S.M.; CAPP, C.; BRASIL, B. A. MEURER, L.; MAIA, A. L. Reduced tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression is associated with advanced medullary thyroid carcinoma. **Oncology Letters**, Athens, v. 7, n. 3, p. 731-737, 2014.

WANG, L. S.; HUANG, Y. W.; LIU, S.; CHANG, H. L.; YE, W.; SHU, S.; SUGIMOTO, Y.; FUNK, J. A.; SMEAKS, D. D.; HILL, L. N.; LIN, Y. C. Conjugated linoleic acid (CLA) modulates prostaglandin E2 (PGE2) signaling in canine mammary cells. **Anticancer Research**, Athens, v. 26, n. 2A, p. 889-898, 2006.

WANG, W.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase 2 derived prostaglandin E₂ regulates the angiogenic switch. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United State of America**, Washington, v. 101, n. 2, p. 415-416, 2004.

WHITE, R. A. **Manual of Small Animal Oncology**.10 ed. Iowa Blackwell Public Professional, 1991, p. 380.

WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**, Philadelphia: W.B. Saunders,1989. p. 380.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine - A Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, Berlin, v. 53, n. 2, p. 65-68, 2006.

WURTZ, S. O.; SCHROHL, A.; MOLLER, N.; SORENSEN, N.; LADEMANN, U.; CHRISTENSEN, I. J.; MOURIDSEN, H.; BRUNNER, N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, Bristol, v. 12, n. 215-227, 2005.

YE, C.; CAI, Q.; DAI, Q.; SHU, X. O.; SHIN, A.; GAO, Y. T.; ZHENG, W.; Expression patterns of the ATM gene in mammary tissues and their associations with breast cancer survival. **Cancer**, New York, v. 109, n. 9, p. 1729-1735, 2007.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer and Metastasis Reviews**, Boston, v. 28, p. 15-33, 2009.

ZÖRNIG, M.; HUEBER, A. O.; BAUM, W.; EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam. v. 1551, n. F1-F37, 2001.

ZUCKERMAN, V.; WOLYNIECK, K.; SIONOV, R. V.; HAUPT, S.; HAUPT, Y. Tumor suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. **Journal of Pathology**, London, v. 219, n.1, p. 3-15, 2009.

CAPÍTULO 2 – *MMP-2* AND *TIMP-1* OVEREXPRESSION IN IMPLANTATION TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR

ABSTRACT - The Transmissible Venereal Tumor (TVT) is a round cell neoplasm, with low metastasis rates and implantation in dogs. The *MMPs-2* and *9*, as well as their selective inhibitors *TIMPs-1* and *2*, are involved in metastasis and in the mechanism of breaking the extracellular matrix. The aim of this study was to evaluate *MMP-2*, *MMP-9*, *TIMP-1* and *TIMP-2* gene expression by qRT-PCR. Fragments of TVT were collected from 32 dogs and the gene expression was compared with mRNA of circulating leukocytes from normal dogs. *MMP-2* and *TIMP-1* expressions showed significant increase ($p < 0.001$, $p = 0.037$, respectively) in tumor tissue (TVT) when compared to circulating leukocytes. The transcript levels of *MMP-9* and *TIMP-2* were not significantly different ($p = 0.535$, $p = 0.906$, respectively). These findings may suggest the role of *MMP-2* and *TIMP-1* in the transmissible characteristic of TVT cells in dogs.

Keywords: dog, metalloproteinase, TVT

INTRODUCTION

Transmissible venereal tumor (TVT) is a round cell neoplasm that may be transmitted among dogs especially through coitus and affects mainly the external genitalia, penis in males and vulva in females. However, it can affect any part of the animal body; and it has been reported in nasal and oral cavities, as well as on skin (ALBANESE et al., 2002; TINUCCI-COSTA, 2009; HUPPES et al., 2012; VARUGHESE et al., 2012). Although rare or under-diagnosed TVT metastases have been related in literature, especially in lymph nodes adjacent to the tumor (popliteal and inguinal), and other organs such as the spleen, liver, eyes and bone marrow (MARCOS et al., 2006; PARK et al., 2006; HUPPES et al., 2012; VARUGHESE et al., 2012).

Among the mechanisms involved with tumor metastasis, metalloproteinases (*MMPs-2* and *9*) are being investigated due to their angiogenic potential and ability to break the extracellular matrix and stimulate tumor growth (STERNLICHT; WERB, 2001; FELLIN et al., 2009). Studies have shown that *MMPs-2* and *9* act on basalmembrane breakdown and extracellular matrix degradation (ECM), thus

facilitating metastasis (UZUELLI, 2008; ŁUKASZEWICZ et al., 2008; NOWAK, et al., 2013).

On the other hand, the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), especially *TIMPs-1* and *2* play the opposite role, they inhibit the action of *MMPs-2* and *9*, thus decreasing the chances of developing metastasis and ECM degradation. These enzymes are co-expressed with *MMPs*, controlling the proteolytic action, and are expressed in tissue remodeling contributing to maintain ECM metabolic and structural equilibrium (NAGASE; WOESSENER, 1999; VISSE; NAGASE, 2003; GIANTI et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

TIMP-1 forms a pro-enzymatic complex with *MMP-9*, capable of inhibiting the activation of this protease while *TIMP-2* is considered the inhibitor of invasion and metastasis of tumor cells *in vitro* and *in vivo*, as well as inhibitor of angiogenesis associated with tumors (MURPHY, 1993; GIANTI et al., 2012). Bjorklund e Koivuen (2005) reported that local concentrations of *TIMP-2* influence the activation of *MMP-2*, suggesting that moderate or low levels of this inhibitor can activate *MMP-2*, whereas higher levels may inhibit its action.

OBJECTIVE

The objective of this work was to evaluate *MMPs-2* and *9* and their inhibitors *TIMPs-1* and *2* gene expression, in order to elucidate the involvement of these enzymes in the transmission of TVT cells.

MATERIAL AND METHODS

We used 32 dogs with TVT from the Zoonosis Center (Botucatu/SP and Seropédica/RJ, Brazil) were selected, of which 19 females and 13 males, averaged 4 years old (range 2-6 years). From the total, 29 dogs were mongrel dogs, one Pit Bull and two Poodles. Primary diagnosis was made by cytology and the lesion was collected for histopathology in 10% buffer formalin and frozen in liquid nitrogen for gene expression. The lesions were from vulva or penis.

The control group for gene expression consisted of another 10 dogs selected for blood collection and subsequent extraction of leukocytes. These mongrel dogs averaged 2.5 years old (range 2-3 years), of which six were females and four males. These dogs were selected based on clinical examination to confirm that they were healthy. This experiment was approved by Unesp Ethics Committee under protocol number 011 303/11.

To collect TVT fragments, the dogs were pre-medicated, intramuscularly, with 0.3 mg/kg midazolam associated with 3mg/kg tramadol. After 15 minutes, they underwent transcutaneous puncture of the cephalic vein using catheter and fluid therapy with 0.9% saline solution ($10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$). They were anesthetized intravenously with 4mg/kg propofol. Subsequently, a tumor sample was collected, without further anesthesia. A 40 milligrams portion of the tumor was removed with a scalpel, and two 20 milligrams fragments were immediately placed in sterile cryotubes and kept in liquid nitrogen until stored in a freezer at -80°C .

The TVT frozen samples were sequentially cut in a cryostat microtome (Leica) into 5- μm histological sections. The slides were stained with hematoxylin and eosin and analyzed under a light microscope (Leica) in order to verify the presence of the tumor in the frozen samples. All samples had 95% of neoplastic cells.

Subsequently, these samples were subjected to cleavage through pipes with magnetic bids in the equipment Precellys R (BioAmerica Inc., Florida, USA), followed by RNA extraction using Trizol® protocol (Invitrogen), following the manufacturer's instructions.

To compare TVT *MMPs-2* and *9* and *TIMPs-1* and *2* expression, blood sample was drawn from 10 healthy dogs and conditioned in tubes with anticoagulant and immediately refrigerated. The blood samples were centrifuged at 4°C for 10 minutes at 1000 rpm. Subsequently, the isolated leukocytes were transferred to a new tube containing 1 mL of red cell lysis buffer (RCLB – pH 7.6 1X: 10mM Tris, 5mM MgCl_2 and 10 mM NaCl) and centrifuged at 4°C for 10 minutes at 1800 rpm to obtain a leukocyte pellet free of red blood cells. The leukocyte pellet was re-suspended in 1 mL TRIZOL Reagent (Invitrogen) for total RNA extraction.

Total RNA from blood and TVT samples was extracted using the TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The samples were

incubated for 5 minutes at room temperature, 200 μ L of chloroform was added to the tubes. After a 3 minutes homogenization followed by 3 minutes incubation at room temperature, the samples were centrifuged at 12.000 x g for 15 minutes at 4°C. The supernatant was transferred to a new tube using a micropipette, and added 500 μ L of isopropyl alcohol. After incubation at room temperature for 10 minutes and centrifugation at 12.000 x g for 10 minutes at 4°C, the supernatant was removed and the sediment washed with 70% ethanol. After another centrifugation at 7.500 x g for 5 minutes at 4°C, excess ethanol was removed by vacuum drying, and the sediment re-suspended with water was free of DNases and RNases.

The RNA concentration and purity was assessed by spectrophotometer (Nanodrop™ ND-8000, Thermo Scientific) (Tables 1 and 2), while RNA integrity was evaluated by the Bionalyzer equipment (kit for RNA 6000 Nano Series, GE), (Figures 1 e 2).

To eliminate any contamination with genomic DNA, the extracted total RNA was treated with DNase. Reverse transcription from RNA to cDNA was performed using 1 μ g of total RNA and the enzyme Super Script III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen). The protocol uses 1 μ L oligodT (500 μ g/mL), 1 μ L random primers (100 μ g/mL) and 1 μ L dNTP. The mixture was heated at 65°C for 5 minutes, to which 4 μ L of transcription buffer 5x, 1 μ L of 0.1 M DTT and finally, 1 μ L of enzyme Super Script III (200 U/ μ L) were added. Subsequently, the mixture was incubated at 25°C for 5 minutes; at 50°C for 1½ hours; followed by 70°C for 15 minutes. After transcription, the cDNA was kept at -20°C.

TIMP-1, *TIMP-2*, *MMP-2* and *MMP-9* primers were designed using the Primer Express software and also based on the works of Clements et al. (2009) and Kanemoto et al. (2011) (Table 3). The tested reference genes (endogenous) were RPS5, RPS19, RPL8, ACTB, HPRT, and the primers of these genes were obtained according to Brinkhof et al. (2006) (Table 4). The specificity of the primers of each gene was assessed by the BLAST software available on the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), for both forward and reverse sequences.

The RT-qPCR reactions were standardized for each primer while the efficiencies of the reactions for each primer pair were also determined, using the standard curves from leukocytes cDNA.

The amplification reactions were performed in 96-well plates containing duplicates of each TVT and leukocyte sample that did not have cDNA, considered as a negative control. An 11.5 μL aliquot of a solution consisting of 6.25 μL of the reagent Power SYBR Green PCR MasterMix (Applied Biosystems), 0.3 μL of each primer (reverse and forward sequences) at 10 Mm and 1 μL of cDNA (dilution 1:10) was added to each well.

Amplification reaction conditions for all primers were 40 cycles of 15 seconds at 94°C and 1 minute at 60°C. Dissociation curves were included at the end of each run to determine the specificity of the PCR products, visualized by a single peak of the amplified product.

The analysis of each reaction was performed by first determining the baseline, which is the fluorescence quality read during the PCR initial cycles. Subsequently, the threshold was determined according to Livak and Schmittgen (2001).

Amplification reaction conditions for all primers were 40 cycles of 15 seconds at 94°C and 1 minute at 60°C. Dissociation curves were included at the end of each run to determine the specificity of the PCR products, visualized by a single peak of the amplified product.

The analysis of each reaction was performed by first determining the baseline, which is the fluorescence quality read during the PCR initial cycles. Subsequently, the threshold was determined according to Livak and Schmittgen (2001).

For the statistical analysis, data normality was evaluated and the values from TVT *MMP-2*, *MMP-9*, *TIMP-1* and *TIMP-2* gene expression were compared with blood samples (control) using the Mann-Whitney test. The correlation between TVT variables was performed by the Spearman test. All analyses were made using the GraphPrisma software, at 95% significance level.

Table 1. TVT RNAm concentration analyzed by Nanodrop.

TVT Sample	mRNA concentration (ng/μl)	260/280	260/230
1	1701	2,03	2,18
2	1316	2,05	2,14
3	2996	1,7	1,72
4	1368	2,02	2,19
5	1489	2,05	2,19
6	2789	1,87	1,95
7	2963	1,51	1,43
8	1912	2	1,98
9	2611	1,92	1,91
10	1211	2,07	2,05
11	2768	1,9	1,76
12	2823	1,32	1,25
13	2792	1,31	1,23
14	2950	1,54	1,5
15	2837	1,47	1,42
16	1801	2,07	2,1
17	2986	1,57	1,6
18	3019	1,64	1,67
19	2898	1,8	1,83
20	2895	1,39	1,38
21	2682	1,91	1,97
22	3032	1,62	1,62
23	2552	1,93	1,95
24	1602	1,72	3
25	2140	1,85	1,39
26	2234	1,96	1,48
27	2812	1,38	1,05
28	2899	1,77	1,44
29	2926	1,61	1,34
30	2950	1,57	1,21
31	2859	1,8	1,46
32	2996	2,03	2,18

Table 2. Blood mRNA concentration analyzed by Nanodrop .

Blood samples	mRNA concentration (ng/μl)	260/280	260/230
1	504,6	1,93	0,31
2	265,3	2,03	0,43
3	745,9	2,01	0,72
4	665	1,98	0,75
5	568	1,93	0,33
6	323,6	2,07	0,51
7	91,05	2,06	0,66
8	190	2,11	0,94
9	64,98	2,01	0,98
10	16,6	2,04	1,25

Table 3. *TIMP-1*, *TIMP-2*, *MMP-2* and *MMP-9* sequence primers used in the experiment

GENE	FORWARD SEQUENCE (5' - 3')	REVERSE SEQUENCE (5' - 3')
TIMP 1^a	TTAAACCGGCGTTATGAGATCA	TTTCAGCGCCTTGGGGA
TIMP 1^b	AAGTCAACCAGACCGACTTAAACC	TCCCCAAGGCGCTGAAA
TIMP 2^a	CCCTGGACATCGGAGGAAA	CGTTCCTCCGCGCCTTT
MMP 2^a	ACGCCATCCCGGATAACC	AGCTATGACCACTGCCTTGCA
MMP 2^b	ACTTTGATGACGATGAGCTATGGA	CCGTCGGCATTCCCACT
MMP 9^a	CCCTTGAACACGCATGACAT	AAGCGGTCCTGGCAGAAGTA
MMP 9^c	CACGCATGACATCTTCCAGT	CGAGAATTCACACGCCAGTA

a. Primer Express Program.

b. Kanemoto et al. (2011).

c. Clements et al. (2009).

Table 4. Endogenous genes primers sequences used in this experiment, designed with the Primer Express program.

GENE	FORWARD PRIMER (5' - 3')	PRIMER REVERSE (5' - 3')
RPS5	TCACTGGTGAGAACCCCT	CCTGATTCACACGGCGTAG
RPS19	CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG	GTTCTCATCGTAGGGAGCAAG
RPL8	CCATGAATCCTGTGGAGC	GTAGAGGGTTTGCCGATG
ACTB	GGCATCCTGACCCTCAAGTA	CTTCTCCATGTCGTCCCAGT
HPRT	AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC	TTATAGTCAAGGGCATATCC

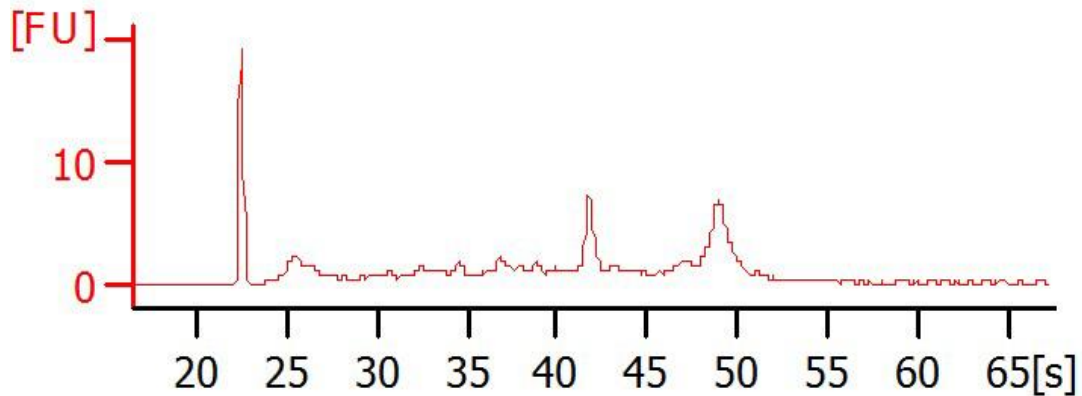


Figure 1. Blood RNA integrity evaluation by Bioanalyser RIN: 7.40

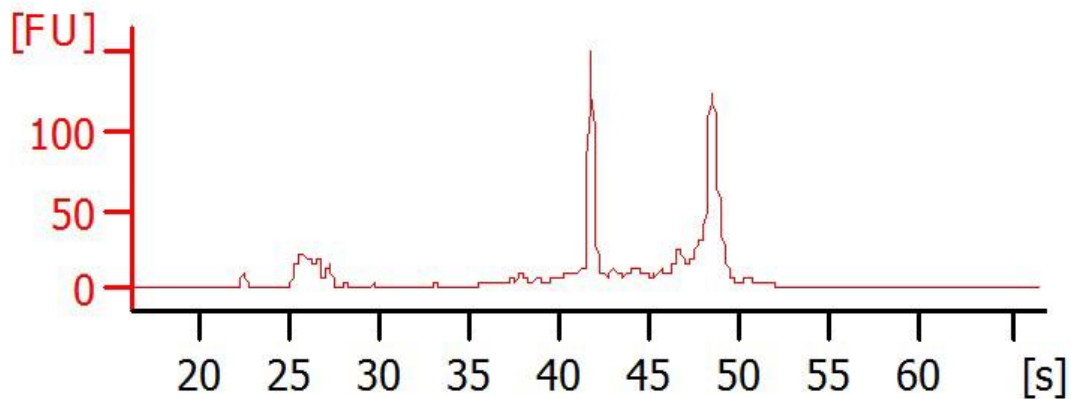


Figura 2. TVT RNA integrity by Bioanalyser RIN: 8,60

RESULTS

The evaluation of *MMP-2* and *TIMP-1* showed a significant increase ($p < 0.001$, $p = 0.037$, respectively) of transcript expression of genes in the tumor tissue (TVT) when compared with leukocytes (Figures 3a; 3c). The transcript expression of *MMP-9* and *TIMP-2* genes were not significantly different between TVT and leukocytes ($p = 0.535$, $p = 0.906$, respectively) (Figures 3b; 3d).

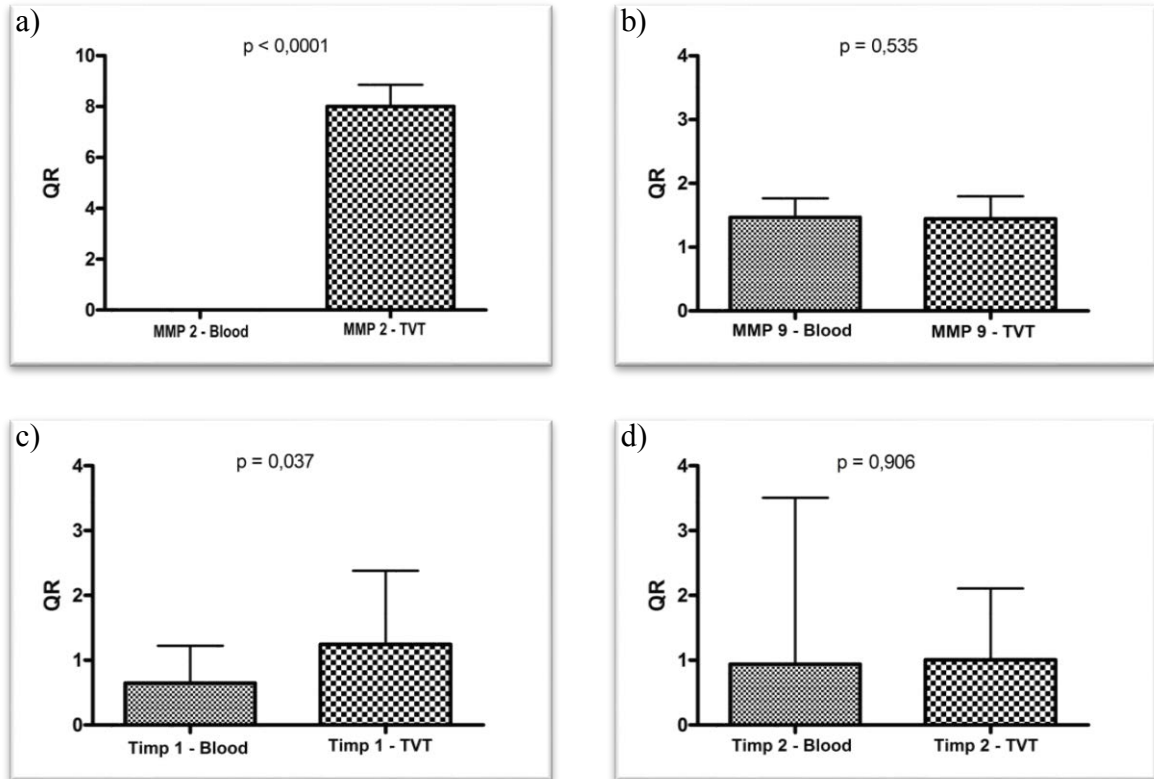


Figure 3. Representation of median QR \pm standard deviation in the blood (control group) and TVT. a) *MMP-2*; b) *MMP-9*; c) *TIMP-1*; d) *TIMP-2*. Notice the statistical difference in *MMP-2* and *TIMP-1* gene expression in TVT samples when compared to control group. Mann-Whitney test.

Tumor tissue displayed a positive correlation between *MMP-2* and *TIMP-1* ($p=0.043$), as well as between *MMP-9* and *TIMP-1* ($p=0.036$), (Figures 4b; 4d). However, no correlation was observed between *MMP-2* and *TIMP-2* ($p = 0.977$); and between *MMP-9* and *TIMP-2* ($p = 0.125$) (Figures 4a, 4c).

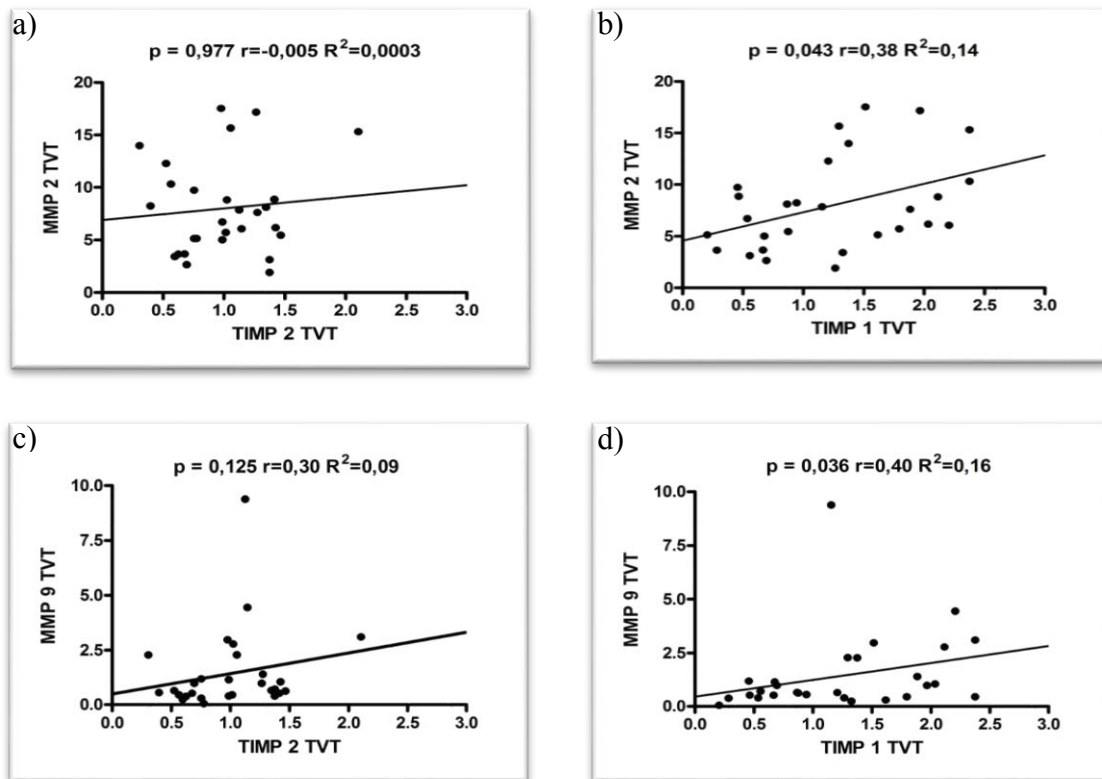


Figure 4. Scatterplots and regression lines in TVT tumor cells: a) *MMP-2* and *TIMP-2*; b) *MMP-2* and *TIMP-1*; c) *MMP-9* and *TIMP-2*; c) *MMP-9* and *TIMP-1*. Spearman test, $p < 0.05$ significance.

DISCUSSION

Among the mechanisms responsible for metastasis, many genes such as MMPs-2 and 9 have been studied, especially in malignant neoplasias with high mortality in human medicine such as squamous cell carcinomas of the oral cavity, lymphoblastic leukemia, multicenter lymphomas, osteosarcomas, lung, breast, head, neck and oral carcinomas, which have a poor prognosis mainly due to the spreading of metastatic cells (KATO et al. 2005; LIU et al., 2005; VICENTE et al., 2005; BARROS, 2006; KRAWCZUC-RYBAK et al., 2010). Although TVT metastases are rare, the literature refers around 5% of cases with distant metastasis being the most common sites the lymph nodes (popliteal and inguinal), eyes, spleen, intestines, mesentery, bladder, uterus (DAS; DAS, 2000; MARCOS et al., 2006; PARK et al., 2006; LAPA, 2009; HUPPES et al., 2012; VARUGHESE et al., 2012).

Regarding *MMPs-2* gene expression tumor values were higher than the leukocytes (control group). This result was expected since the dogs were healthy and had no pathological or inflammatory processes that could induce tissue remodeling. On the other hand, tumor cells were expected to have higher expression of MMPs due to their participation in tumor development and favoring of tumor microenvironment (PEREIRA et al., 2005), but only *MMP-2* expression was statistically increased in TVT cells which is according to Aresu et al. (2011), who reported increased expression of MMPs-2 in peritumoral and malignant epithelial cells compared to breast tumors in bitches (ARESU et al., 2011). Aricó et al., (2013a) higher MMP-9 expression immunohistochemical levels were observed in T-cell lymphomas compared to B-cell lymphomas and healthy controls. However, Ferreira (2012) reported the opposite; his results showed higher expression immunohistochemical of MMP-9 in epithelial and stromal cells of complex and papillary ductal mammary carcinomas compared to normal mammary tissue from dogs.

It is believed that an over expression of MMPs-2 and 9 and a lower expression of TIMPs-1 and 2 occur in malignant tumors, leading to increased proteolytic activity and consequent breaking of the ECM, thus promoting tumor implantation (GIANTI et al., 2012). During tumor progression, cancer cells release inflammatory factors such as cytokines (IL-1 and IL-6) and VEGF, causing the tumor to develop, in addition to stimulating MMPs expression and inhibiting TIMPs expression (EGEBLAD; WERB, 2002; JOBIM et al., 2008; GIANTI et al., 2012). The resulting apoptosis inhibition can modulate the host immune system, which allows tumor development, and metastatic invasions (EGEBLAD; WERB, 2002; JOBIM et al., 2008; GIANTI et al., 2012).

MMPs-2 and 9 overexpression may be mediated by inflammatory factors and cytokines (IL-1 and IL-6), secreted by tumor, stromal inflammatory peritumoral cells such as macrophages and neutrophils (PARK et al., 2006). Although the inflammatory process can contribute to the *MMPs* expression, in our study the TVT samples contained more than 80% tumoral cells, so the over expression of these metalloproteinases are due to tumoral cell transcription. This characteristic allows the tumor cells with a more malignant potential, since the higher MMP expression, the higher the proteolytic activity and extracellular matrix degradation (OPDENAKKER; VAN DEN STEEN; VAN DAMME, 2001; NATHAN, 2002; PARK et al., 2006), a normal

barrier for migrating tumor cells and vascular invasion (JOBIM et al., 2008).

Aresu et al. (2011) observed TIMP-2 lower expression in mammary carcinomas compared to mammary adenomas in bitches, unlike our results in which no significant difference was observed between *TIMP-2* expression in TVT and leukocytes (control group). In addition, highly malignant tumors showed a significant increase of MMPs-2 and 9 and lower levels of TIMPs-1 and 2 in mammary carcinomas compared to mammary adenomas in dogs (KAWAI et al., 2006).

The MMPs are not only involved in metastasis, but they also have the ability to promote sustained growth of both primary and metastatic tumors by activation of growth factors such as VEGF, growth factor endodermal or by the release of ECM mitogenic molecules. Thus, they modulate the bioavailability of growth factors favoring the growth of tumor cells, regulating the behavior of endothelial cells and fibroblasts which promote tumor growth via vascular involvement (EGEBLAD; WERB, 2002; FELLIN et al. 2009).

We observed a positive correlation between *MMP-2* and *TIMP-1*. The highest *TIMP-1* expression in tumor cells has already been associated with an anti-apoptotic, angiogenic and tumor growth activity, as well as the effects of MMP-2 that has inflammatory, angiogenic, tissue modeling activity, factors that may predispose to metastasis (WURTZ et al., 2005; VIZOSO et al., 2007). *TIMP-1* levels were significantly higher in T-cell lymphomas than in B-cell lymphomas. Higher mRNA and protein levels of MMP-9 were observed in T-cell lymphomas than in B-cell lymphomas and healthy control lymph nodes, (ARICÓ, et al., 2013 a; ARICÓ, et al., 2013 b). These molecules are associated with a more aggressive clinical behaviour in human lymphoma, and they appear to exert their influence through two different mechanisms: MMP-9 causes ECM degradation, whereas *TIMP-1* shows an anti-apoptotic action (KOSSAKOWSKA et al., 1991; KOSSAKOWSKA, et al., 1999).

We can also suggest that *TIMP-2* expressed to similar degree in the tumor and leukocytes, enhances the breakage of the extracellular matrix. The *MMP-2* are also involved in the disruption of the extracellular matrix as well as in angiogenesis, favoring tumor adhesion and development (WURTZ et al., 2005). As suggested by Bjorklund e Koivuen (2005), moderate or low local concentrations of *TIMP-2* can activate *MMP-2* while higher levels can inhibit it. However, these markers did not show correlation in

this study.

TIMP-2 is the selective MMP-2 inhibitor (MOOK; FREDERIKS; VAN NOORDEN, 2004) while it is little expressed in TVT cells. Therefore, we infer that MMP-2 is not inhibited by TIMP-2 and continues to play its role, a factor that could contribute to the spreading and transmissible characteristic of TVT cells.

The expression of *TIMP-2* and *MMP-9* was similar in TVT tumor cells and leukocytes, and the expression of these two genes showed no correlation in TVT tissue. These findings, together with the results of Miyajima et al. (1995), Hong et al. (2000) may explain the low metastatic potential of TVT (DAS; DAS, 2000; LAPA, 2009). Several studies demonstrate that highly proliferative tumors, with invasive growth, high histologic grade and metastatic capacity are related with high stromal MMP-9 expression. Furthermore, tumors from patients with short survival time and disease-free intervals also present high expression of MMP-9 in stromal cells (SANTOS et al., 2012). Similar results were found by Docampo et al. (2011), where MMP-9 was overexpressed in malignant melanomas when compared with melanocytomas. In human non-Hodgkin lymphoma a trend toward an unfavourable prognosis and MMP-9 expression has been demonstrated (VACCA, et al., 2000; ARICÓ, et al., 2013a).

Thus, based on our results of higher *TIMP-1* expression in TVT in relation to leukocytes, and the positive correlation between *TIMP-1* and *MMP-9* in the tumor, we may suggest that *TIMP-1* can play an inhibitory role in the development of metastasis and that *MMP-9* collaborates with it, according to (KAWAI et al., 2006).

TVT displays easy cell adhesion to the new tissue since TVT cells only need direct contact to install in the new tissue (PEREIRA et al., 2000; ALBANESE et al., 2002; DAS; DAS, 2000; LAPA, 2009). This transmission ability of the TVT cell can be explained by the *MMP-2* over-expressed on tumor cells, which breaks the extracellular matrix, associated with the anti-apoptotic role played by the low levels of *TIMP-2* in the TVT cells, as reported by WURTZ et al. (2005).

TVT is the only tumor with transmission of neoplastic cells in domestic animals and, therefore, a good natural model to study the dissemination mechanisms of neoplastic cells. There are no studies in the literature presenting this approach in relation to TVT.

CONCLUSION

The data reported in this study indicates that *MMP-2* and *TIMP-1* are over-expressed in TVT cells. This factor may suggest their involvement in cell adhesion, thus making TVT cells highly transmissible and with low metastatic capacity, typical of this tumor.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2011/08290-2).

REFERENCES

ALBANESE, F.; POLI, A.; MILLANTA, F.; ABROMO, F. Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with *Leishmania*-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin?. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 13, n. 5: p. 243-246, 2002.

ARESU, L.; GIANTIN, M.; MORELLO, E.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; GARBISA, S.; ARICÒ, A.; BRADASCHIA, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors. **BMC Veterinary Research**, London, v. 7, n. 33, p. 10-21, 2011.

ARICÒ, A.; GIANTIN, M.; GELAIN, M. E.; RIONDATO, F.; COMAZZI, S.; RÜTGEN, B. C.; ESSLER, S. E.; DACASTO, M.; CASTAGNARO, M.; ARESU, L. The role of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in canine lymphoma: in vivo and in vitro study. **BMC Veterinary Research**, London, v. 9, n. 94, p. 1-10, 2013a.

ARICÒ, A.; GIANTIN, M.; GELAIN, M.; RIONDATO, F.; MORTARINO, M.; COMAZZI, S.; DACASTO, M.; CASTAGNARO, M.; ARESU, L. Matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor expression in canine leukaemias. **Veterinarian Journal**, London, v. 196, n.2, p. 260-262, 2013b.

BARROS, S. S. L. V. **Expressão imuno-histoquímica de metaloproteínas em carcinomas epidermoide de lábio inferior e língua**. 2006. 130 p. Tese (Doutorado em Patologia) -Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

BJORKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, Shanghai, v. 1755, n. 1, p. 37-69, 2005.

BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 1803, n. 1, p. 55-71, 2010.

CLEMENTS, D. N.; FITZPATRICK, N.; CARTER, S. D.; DAY, P.J.R. Cartilage gene expression correlates with radiographic severity of canine elbow osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, London, v. 179, p. 211–218. 2009.

DAS, U.; DAS, A. K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 24, n. 8: p. 545-556, 2000.

DOCAMPO, M.J.; CABRERA, J.; RABANAL, R. M.; BASSOLS, A. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and membrane-type 1 matrix metalloproteinase in melanocytic tumors of dogs and canine melanoma cell lines. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 72, n. 8, p. 1087-96, 2011.

EGEBLAD M, WERB Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 2, n. 3, p.161–174, 2002.

FELLIN, I. P. D.; GRIVICICH, I.; FELLIN, C. R.; FEDIRGO, C. A.; ROCHA, A. B. Metalloproteinases 2 and 9 immunohistochemistry expression is not associated to esophageal squamous cell carcinoma progression. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 45 n.4 , p. 317-323, 2009.

FERREIRA, H. H. **Classificação histológica e expressão de metaloproteinasas (mmp-9 e mmp-2) e seus inibidores (timp-1 e timp-2) no tecido mamário canino neoplásico**. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado do programa em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiânia, Goiânia, 2012.

GIANTIN, M.; ARESU, L.; BENALI, S.; ARICÒ, A.; MORELLO, E. M.; MARTANO, M.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R. M.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, London, v.147, n. 4, p. 419-429, 2012.

HONG, S. D.; HONG, S. P.; LEE, J. L.; LIM, C. Y. Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. **Oral Oncology**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 207-213, 2000.

HUPPES, R. R.; MARINHO, P. V. T.; DA SILVA, J. A. R.; PAZZINI, J. M.; AMORIM, R. L. **Tumor venéreo transmissível (TVT) com metástase a distância na medula toracolombar em um cão**. Relato de caso. Congresso Paulista de Especialidades. São Paulo, 2012.

JOBIM, F. C.; SCHWARTSMANN, G. S.; XAVIER, N. L.; UCHOA, D. M.; SACIOTO, M.; CHEMELLO, N. Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico. **Revista Brasileira Ginecologia Obstetetrícia**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 6, p. 287-293, 2008.

KANEMOTO, H.; OHNO, K.; SAKAI, M.; NAKASHIMA, K.; TAKAHASHI, M.; FUJINO, Y.; TSUJIMOTO, H. Expression of Fibrosis-Related Genes in Canine Chronic Hepatitis. **Veterinary Pathology**, New York, v. 48, n. 4, p. 839-845. 2011.

KATO, K.; HARA, A.; KUNO, T.; KITAORI, N.; HUILAN, Z.; MORI, H.; TOIDA, M.; SHIBOTA, T. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in oral Squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, Berlin, v. 131, n. 6, p. 340-346, 2005.

KAWAI, K.; UETSUKA, K.; DOI, K.; NAKAYAMA, H. The activity of matrix metalloproteinase (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in mammary tumors of dogs and rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, London, v. 68, n. 2, p. 105-111, 2006.

KOSSAKOWSKA, A. E.; EDWARDS, D. R.; PRUSINKIEWICZ, C.; ZHANG, M. C.; GUO, D.; URBANSKI, S. J.; GROGAN, T.; MARQUEZ, L. A.; JANOWSKA-WIECZOREK, A. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. **Blood**, New York, v. 94, n. 6, p. 2080–2089, 1999.

KOSSAKOWSKA, A. E.; URBANSKI, S. J.; EDWARDS, D. R. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas. **Blood**, New York, v. 77, n. 11, p. 2475–81, 1991.

KRAWCZUC-RYBAK. M.; KUZMICZ, M.; MROCZKO, B.; SZMITKOWSKI, M. Plasma matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in children treated for acute lymphoblastic leukemia. **Polski Merkuruz Lekarski**, Warszawa, v. 29, n. 169, p.8-14, 2010.

LAPA, F. A. S. **Estudo comparativo da eficácia de dois protocolos de tratamento de tumor venéreo transmissível em cães**. 2009. p. 73. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal-Fisiopatologia Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2009.

LIU, W.; ZENG, Z. Y.; WU, Q. L.; HOU, J. H.; CHEN, Y. Y. Overexpression of MMP-2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. **JAMA Otolaryngology- Head ; Neck Surgery**, Chicago, v. 132, n. 3, p. 395- 400, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402–408, 2001.

ŁUKASZEWICZ M., MROCZKO B., SZMITKOWSKI M. Rola metaloproteinaz i ich inhibitorów w raku trzustki. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej**, Warsaw, v. 7, n. 62, p.141-147, 2008.

MARCOS, R.; SANTOS, M.; MARRINHAS, C.; ROCHA. E. Cutaneous transmissible venereal tumor without genital involvement in a prepubertal female dog. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 35, n. 1, p. 106-109, 2006.

MIYAJIMA, Y.; NAKANO, R.; MORIMATSU, M. Analysis of expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma by in situ hybridization. **The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology**, St Louis, v. 104, n. 9, p. 678-684, 1995.

MOOK, O. R. F.; FREDERIKS, W. M.; VAN NOORDEN, C. J. F. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 1705, n. 2, p. 69-89, 2004.

MURPHY, A. N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. **Journal Cellular Physiology**, New York, v. 157, n. 2, p. 351-358, 1993.

NABESHIMA K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathology International**, Carlton South, v. 52. n.4, p. 255-64, 2002.

NAGASE, H.; WOESSENER, J. F. Jr. Matrix metalloproteinases. **Journal Biological Chemistry**, San Francisco, v. 274, n. 31, p. 21491-21494, 1999.

NAKOPOULOU, L.; GIANNOPOULOU, I.; LAZARIS, A.; ALEXANDROU, P.; TSIRMPA, I.; MARKAKI, S.; PANAYOTOPOULOU, E.; KERAMOPOULOS, A. The favorable prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 protein overexpression in breast cancer cells. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 111, n. 11, p. 1027-1036, 2003.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, London, v.420, n. 6917, p. 846–852 (2002).

NOWAK, E.; GALILEJCZYK, A.; SYPNIEWSKI, D.; BEDNAREK, I. MMP-9 directed shRNAs as relevant inhibitors of matrix metalloproteinase 9 activity and signaling. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej**, Warsaw, v. 5, n. 67, p. 742-749, 2013.

OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E.; VAN DAMME, J. Gelatinase B atuner and amplifier of immune functions. **Trends Immunology**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 571–579, 2001.

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

PEREIRA, A. L. A.; VERAS, S. S. L.; SILVEIRA, E. J. D.; SEABRA, F. R. G.; PINTO, L. P.; SOUZA, L. B.; FREITAS, R. A. O papel das proteínas extracelulares e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: atualização da bibliografia. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, Porto alegre, v. 71, n. 1, p. 81-86, 2005.

PEREIRA, J. S.; SILVA, A. B.; MARTINS, A. L.; FERREIRA, A. M. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 43-47, 2000.

SANTOS, A. A.; LOPES, C. C.; MARQUES, R. M.; AMORIM, I. F.; GÄRTNER, M. F.; DE MATOS, A. J. Matrix metalloproteinase-9 expression in mammary gland tumors in dogs and its relationship with prognostic factors and patient outcome. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v.73, n. 5, p. 689-97, 2012.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell and Developmental biology**, California, v. 17, p. 463-516, 2001.

THOMAS, G. T.; LEWIS, M. P.; SPEIGHT, P. M. Matrix metalloproteinases and oral cancer. **Oral Oncology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 227-233, 1999.

TINUCCI-COSTA, M. Tumor venéreo transmissível canino. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2009. cap. 34, p. 540-551.

UZUELLI, J. U. **Alterações das concentrações plasmáticas de troponina I e de metaloproteinases 2 e 9 da matriz extracelular após embolia aguda em cães**. 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

VACCA A, RIBATTI D, RIA R, PELLEGRINO A, BRUNO M, MERCHIONNE F, DAMMACCO F: Proteolytic activity of human lymphoid tumor cells, Correlation with tumor progression. **Developmental ; Comparative Immunology**, v. 7, n. 2-4, p. 77-88, 2000.

VARUGHESE, E. E.; SINGLA, V. K.; RATNAKARAN, U. GANDOTRA, V.K. Successful management of metastatic transmissible venereal tumour to skin of mammary region. **Reproduction Domestic Animals**, Berlin, v. 47, n. 6, p. 366-369, 2012.

VICENTE, J. C.; FRESNO, M. F.; VILLALAIN, L.; VEGA, J. A.; HERNÁNDEZ VALLEJO, G. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinases-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, Amsterdam, v. 41, N. 3, p. 283- 293, 2005.

VISSE R.; NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, Baltimore, v. 92, n. 8, p. 827-39, 2003.

VIZOSO, F. J.; GONZALEZ, L. O.; CORTE, M. D.; RODRIGUEZ, J. C.; VAZQUEZ, J.; LAMELAS, M. L.; JUNQUERA, S.; MERINO, A. M.; GARCIA-MUNIZ, J. L. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. **British Journal of Cancer**, London, v. 96, n. 6, p. 903-911, 2007.

WURTZ, S. O.; SCHROHL, A.; MOLLER, N.; SORENSEN, N.; LADEMANN, U.; CHRISTENSEN, I. J.; MOURIDSEN, H.; BRUNNER, N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, Bristol, v. 12, n. 215-227, 2005.

CAPÍTULO 3 – NÍVEIS DE *ATM* E *TP53* PODEM INFLUENCIAR O BAIXO POTENCIAL METASTÁTICO DO TVT CANINO?

RESUMO- Apesar de somente 1 a 5% dos pacientes com TVT apresentarem metástases a distância, o estudo deste modelo de transmissão natural de células neoplásicas pode contribuir para o entendimento do mecanismo de implantação de células metastáticas. Vários marcadores prognósticos vem sendo estudados na progressão tumoral, dentre eles a expressão gênica e proteica do ATM. Este gene, em baixas expressões, está ligado diretamente a progressão neoplásica, principalmente em neoplasias mamárias em humanos, assim como na menor sobrevida global nestes pacientes. Já a principal função do *TP53* é a interrupção do ciclo celular e reparação do DNA ou indução da apoptose e por tal motivo sugere-se que a perda de sua função pode permitir que células mutadas acumulem ainda mais mutações e ainda inativem outros supressores e proto oncogenes favorecendo o desenvolvimento e aparecimento das neoplasias. Este estudo teve o objetivo de avaliar a expressão gênica de *ATM* e *TP53* em TVT. Para isso, utilizamos 32 amostras de TVT canino, que tiveram seu mRNA extraído e submetido a técnica de qRT-PCR. Os resultados foram comparados com um grupo controle, composto por sangue periférico de 10 cães livres de neoplasia. Na avaliação de expressão de transcritos do *ATM* verificou-se maior expressão ($p < 0,0001$) no tecido tumoral (TVT) quando comparado com o grupo controle. Já o *TP53* não foi verificada diferença estatística ($p = 0,26$) entre os grupos. Estes fatores podem ajudar a explicar o baixo índice metastático originado por esta neoplasia.

Palavras Chaves: Expressão, invasão metastática, genes supressores tumorais

ABSTRACT- Although only 1-5% canine patients with TVT present metastases, the study of metastatic progression mechanisms of this neoplasm is necessary. Several prognostic markers have been studied, including ATM genic and protein expression. This gene when reported in low expression is associated to neoplastic progression, especially in human's mammary neoplasms as well with lower survival rates in these patients. The main function of *TP53* is to interrupt cell cycle and DNA repair or to induce the apoptosis, therefore it is suggested that the loss of its function may allow mutated cells to still accumulate more mutations, and even inactivate and I others suppressor and proto oncogenes favoring the development and onset of neoplasms. This study aimed to evaluate *ATM* and *TP53* gene expression in TVT. For this, 32 TVT canine samples that had their mRNA extracted and submitted to qRT-PCR technique were used. The results were compared to peripheral blood of 10 healthy dogs as control group. At the evaluation of the transcript *ATM* gene it was observed a significant increase expression in tumoral tissue (TVT) ($p < 0,0001$) when compared to control group. However, the *TP53* gene showed similar transcript gene between tumor tissue (TVT) ($p = 0,26$) and control group. These factors may explain the low metastatic rate of this neoplasm.

Key Words: expression, metastatic invasion, tumoral suppressor genes

INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível canino (TVT) é uma neoplasia maligna de células redondas, sendo transmitido naturalmente entre os cães, acometendo animais de ambos os sexos (VAZQUEZ-MOTA et al., 2008; VARUGHESE et al., 2012). Normalmente o TVT afeta a genitália externa (DAS; KUMAR, 2000) e sua transmissão ocorre por implantação das células tumorais principalmente pelo coito, entretanto, também pode ocorrer pela lambedura ou pelo ato do animal cheirar o órgão genital acometido (MARCHAL et al., 1997; BAUTISTA-GÓMEZ et al., 2011). Metástase do TVT raramente acontecem, entretanto, já foram descritas acometendo as tonsilas, globo ocular, fígado, baço, rim, pulmão, musculatura e até mesmo múltiplos órgãos (ODUYE et al., 1973; ROGERS; WALKER e DILLON, 1998; PARK et al., 2006).

Vários pesquisadores procuram entender a origem e a evolução do TVT (REBBECK et al., 2009) e estudos atuais sugerem que o TVT tenha se originado de uma mesma célula clonal de lobos há 65.000 anos e que este tumor seja geneticamente distinto de seu hospedeiro (BAUTISTA-GÓMEZ et al., 2011; MURCHISON, et al., 2014).

O gene mutado ataxia telangiectasia (*ATM*), identificado em 1995 (TERAOKA et al., 1999) em humanos, está associado com o desenvolvimento de várias enfermidades, como ataxia cerebelar, telangiectasias oculares, deficiência imunológica, radiosensibilidade, diabetes insulino-resistente, envelhecimento precoce e predisposição ao desenvolvimento de vários tipos de câncer (TERAOKA et al., 1999; GATEI et al., 2000; CUATRECASAS et al., 2006; PROKOPCOVA et al., 2007; LAVIN, 2008; BHATTI et al., 2010).

O *ATM* é um gene supressor tumoral, que é ativado em resposta a danos ao DNA, que quando não reparados podem levar a rearranjos genômicos e instabilidade cromossomal contribuindo com o processo de tumorigênese (BENSIMON; AEBERSOLD; SHILOH, 2011). Além disso o *ATM* tem importante papel no controle tumoral, visto que a sua expressão pode ativar o gene *TP53* na interface do ciclo celular na fase S/G1, para que haja a correção do DNA. Outras modificações nas cromatinas das células são capazes de ativar as proteínas quinases do *ATM* e portanto desta maneira, ativam o *TP53* (LAVIN, 1999; LOEHLBERG et al., 2007).

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica do *ATMe* do *TP53* em amostras caninas de tumor venéreo transmissível, a fim de investigar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na implantação de células tumorais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 32 cães, oriundos de Centros de controle de Zoonoses de (Botucatu/SP e Seropédica/RJ, Brasil), sendo 19 fêmeas e 13 machos, com média de idade de 4 anos (variando entre dois e seis anos). Destes, 29 cães eram sem raça definida (SRD), um American Pit Bull e dois Poodles. Os tumores coletados localizavam-se na vulva ou pênis, sendo o diagnóstico primário feito por exame citológico e posterior confirmação por exame histopatológico.

Como grupo controle foram selecionados 10 cães saudáveis e coletado sangue para posterior extração de leucócitos e avaliação de expressão do *RNAm*. Estes cães tinham idade média de 2,5 anos (variando entre 2 e 3 anos), todos eram sem raça definida, sendo seis fêmeas e quatro machos. A seleção destes animais baseou-se em exame clínico e complementares para confirmação da saúde dos animais. Este experimento foi aprovado pelo comitê de ética CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais-Jaboticabal-SP), protocolo número 011303/11.

Para a coleta dos fragmentos de TVT, os animais foram submetidos a medicação pré-anestésica, por via intramuscular, com a utilização de midazolam na dose 0,3 mg/kg associado a tramadol na dose de 3 mg/kg. Após 15 minutos, estes pacientes foram submetidos à punção transcutânea da veia cefálica com cateter para fluidoterapia com solução fisiológica 0,9% (10 ml/kg/h). A indução anestésica foi realizada com propofol, na dose de 4 mg/kg, por via intravenosa. A partir do momento em que o cão encontrava-se em plano anestésico-cirúrgico, foi feita a coleta do tumor, sem a necessidade de aprofundar o plano anestésico. Com o bisturi foi removida uma porção do tumor de 40 mg, sendo que o mesmo foi separado em dois fragmentos de 20 mg e imediatamente, os fragmentos foram acondicionados em criotubos estereis e mantidos em nitrogênio líquido, até serem armazenados em freezer -80°C.

As amostras de TVT congeladas foram cortadas em criostato (LEICA), por meio de cortes de congelamento sequenciais de 5 μm . As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e, posteriormente, analisadas em microscópio de luz (LEICA), a fim de se verificar a presença de tumor nas amostras congeladas. Todas as amostras apresentaram 95% de células neoplásicas.

Posteriormente, estas amostras foram submetidas à clivagem através de tubos com *bids* magnéticos no equipamento Precellys R (BioAmerica Inc, Florida, EUA), seguida pela extração do RNA, utilizando-se o protocolo de Trizol® (Invitrogen), conforme indicação do fabricante.

Para comparar a expressão de *ATM* e do *TP53* do TVT com o grupo controle (animais saudáveis) cerca de 5 mL de sangue foi extraído de cachorros saudáveis e acondicionados em tubos com anticoagulante EDTA e imediatamente refrigerado. Os tubos com sangue foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 1000 xg e, posteriormente, a papa leucocitária foi isolada e transferida para novo tubo com 1 mL de tampão de lise de célula vermelha (RCLB - pH7.6 1X: 10mM de Tris; 5mM de MgCl_2 e 10 mM de NaCl) e centrifugada a 4°C por 10 minutos a 1800 xg até a obtenção do *pellet* de leucócitos livre de hemácias. O *pellet* de leucócito foi ressuscitado em 1 mL do reagente TRIZOL (Invitrogen) para extração de RNA total.

Após a extração do RNA total das amostra de sangue e TVT com TRIZOL. As amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, 200 μL de clorofórmio foram adicionados ao tubo. Após homogeneização por 3 minutos e incubação a temperatura ambiente pelo mesmo tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com auxílio de micropipeta, sendo adicionados 500 μL de álcool isopropílico. Após incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12.000x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com etanol a 70%. Após nova centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C, o excesso de etanol foi retirado por secagem a vácuo, sendo o sedimento ressuscitado com água livre de DNases e RNases.

A concentração e a pureza do RNA total foram avaliadas em espectrofotômetro (Nanodrop™ ND-8000, Thermo Scientific) (Tabelas 1 e 2), enquanto a integridade do

RNA foi avaliada pelo equipamento Bionalyzer (kit para RNA 6000 Nano Series - GE), (Figuras 1 e 2).

Para amplificação do PCR foi realizada o uso de 1 µg de RNA total tratado com Dnase I e com a enzima Super-script III™ Reverse Transcriptase enzyme (Invitrogen Life Technologies Inc) segundo instruções do fabricante.

Para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com DNase. A transcrição reversa do RNA para cDNA foi realizada com 1 µg de RNA total e com a enzima Super-script III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen). Para este protocolo utilizou-se 1 µL de oligodT (500 µg/mL), 1 µL de random primers (100 µg/mL) e 1 µL de dNTP. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e, a seguir, foram adicionados 4 µL de tampão de transcrição 5x, 1 µL de DTT 0,1M e, por último, foi acrescido 1 µL da enzima Super-script III (200U/ µL) e feita a incubação a 25°C durante 5 minutos, 50°C por 1 hora e meia, seguido de 70°C por 15 minutos. Ao final da transcrição, o cDNA foi mantido a -20°C.

Os iniciadores do *ATM* e do *TP53* foram desenhados com auxílio do programa Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), enquanto os genes de referência *RPS5*, *RPS19*, *RPL8*, *HPRT* foram obtidos segundo Brinkhof et al. (2006) e *ACTB* com o software *Primer Express 2.0* (Tabela 3 e 4).

As reações de qPCR para o *ATM* e *TP53* e os genes de referência foram realizadas em duplicata em placa de 96 poços para o termociclador StepOne Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems). Em cada poço foi adicionado 11,5 µL de solução composta por 6,25 µL do reagente Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,3 µL de cada iniciador (sequência *forward* e *reverse*) a 10 Mm e 1 µL de cDNA (diluição de 1:10). As condições de reação de amplificação para todos os iniciadores foram 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C. Curva de dissociação foi incluída em todos os experimentos para determinar especificidade dos produtos da PCR. A quantificação relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para análise estatística avaliou-se a normalidade dos dados e comparou-se os valores de expressão gênica de *ATM* e do *TP53* do TVT com o grupo controle pelo teste de Mann–Whitney. Todas as análises foram feitas no programa GraphPrisma, considerando-se um nível de significância de 95%.

Tabela 1. Concentração de mRNA pelo aparelho Nanodrop no TVT.

Amostra TVT	Concentração de mRNA (ng/μl)	260/280	260/230
1	1701	2,03	2,18
2	1316	2,05	2,14
3	2996	1,7	1,72
4	1368	2,02	2,19
5	1489	2,05	2,19
6	2789	1,87	1,95
7	2963	1,51	1,43
8	1912	2	1,98
9	2611	1,92	1,91
10	1211	2,07	2,05
11	2768	1,9	1,76
12	2823	1,32	1,25
13	2792	1,31	1,23
14	2950	1,54	1,5
15	2837	1,47	1,42
16	1801	2,07	2,1
17	2986	1,57	1,6
18	3019	1,64	1,67
19	2898	1,8	1,83
20	2895	1,39	1,38
21	2682	1,91	1,97
22	3032	1,62	1,62
23	2552	1,93	1,95
24	1602	1,72	3
25	2140	1,85	1,39
26	2234	1,96	1,48
27	2812	1,38	1,05
28	2899	1,77	1,44
29	2926	1,61	1,34
30	2950	1,57	1,21
31	2859	1,8	1,46
32	2996	2,03	2,18

Tabela 2. Concentração de mRNA pelo aparelho Nanodrop no Sangue.

Amostra Sangue	Concentração de mRNA (ng/μl)	260/280	260/230
1	504,6	1,93	0,31
2	265,3	2,03	0,43
3	745,9	2,01	0,72
4	665	1,98	0,75
5	568	1,93	0,33
6	323,6	2,07	0,51
7	91,05	2,06	0,66
8	190	2,11	0,94
9	64,98	2,01	0,98
10	16,6	2,04	1,25

Tabela 3. Primers para a expressão gênica, desenhados com auxílio do programa Primer Express program.

GENE	PRIMER FOWARD (5'-3')	PRIMER REVERSE (5'-3')
ATM	CTTAGGAGGAGCCTGGGCCTTTG	CACAACACAGGGAAAGCTCCGTA
TP53	GAACGCTGCTCTGACAGTAGTGA	CCCGCAAATTTCTTCCA

Tabela 4. Sequência dos primers iniciadores utilizados na análise de expressão gênica. Estes dados foram obtidos segundo Brinkhof et al. (2006) e com o software *Primer Express 2.0*.

GENE	PRIMER FOWARD (5'-3')	PRIMER REVERSE (5'-3')
RPS5	TCACTGGTGAGAACCCCT	CCTGATTCACACGGCGTAG
RPS19	CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG	GTTCTCATCGTAGGGAGCAAG
RPL8	CCATGAATCCTGTGGAGC'	GTAGAGGGTTTGCCGATG
ACTB	GGCATCCTGACCCTCAAGTA	CTTCTCCATGTCGTCCCAGT
HPRT	AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC	TTATAGTCAAGGGCATATCC

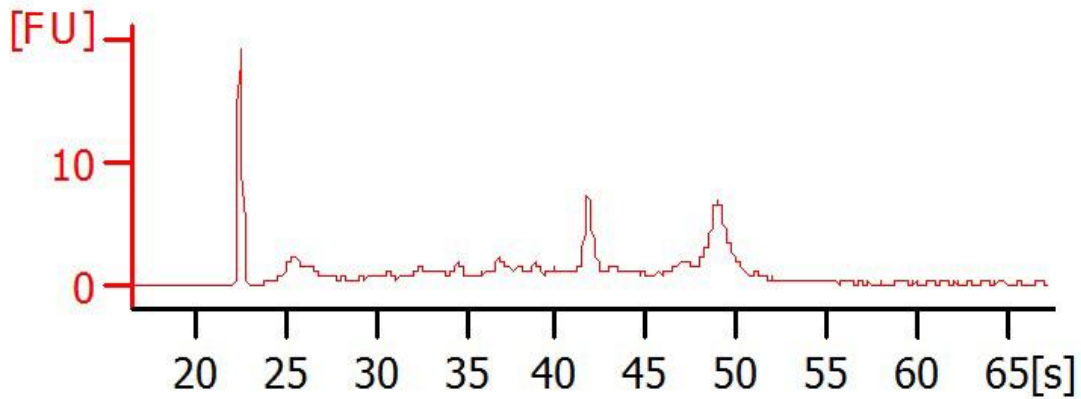


Figura 1. Análise da integridade do RNA pelo aparelho Bioanalyser da amostra do sangue. Valor de RIN: 7.40

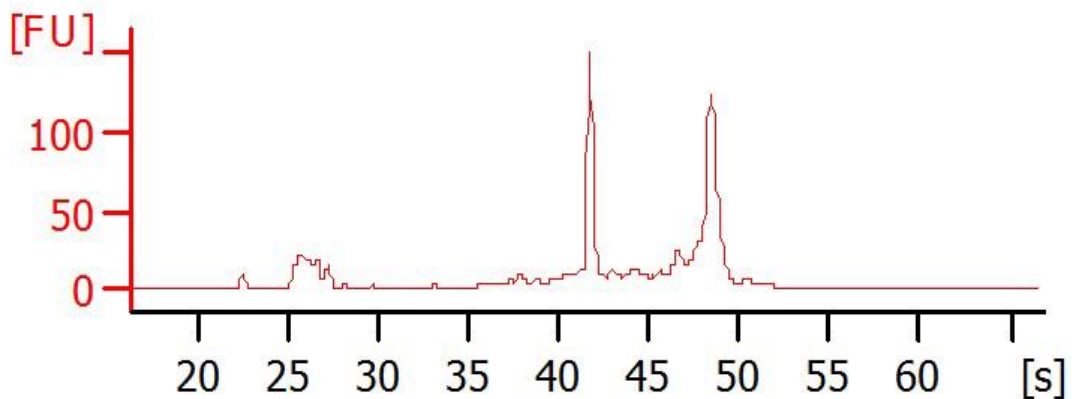


Figura 2. Análise da integridade do RNA pelo aparelho Bioanalyser da amostra TVT. Valor de RIN: 8,60

RESULTADOS

Os genes de referência mais estáveis, foram determinados pelo software GeNorm a partir do grupo com cinco genes (RPS 5, RPS 19, RPL 8, ACTB e HPRT).

Na avaliação de expressão de transcritos do *ATM* foi verificado aumento significativo ($p < 0,0001$) de sua expressão no tecido tumoral (TVT) em relação ao grupo controle (Figura 3). Na avaliação de expressão de transcritos do *TP53* não foi verificado diferença estatística ($p = 0,26$) (Figura 4).

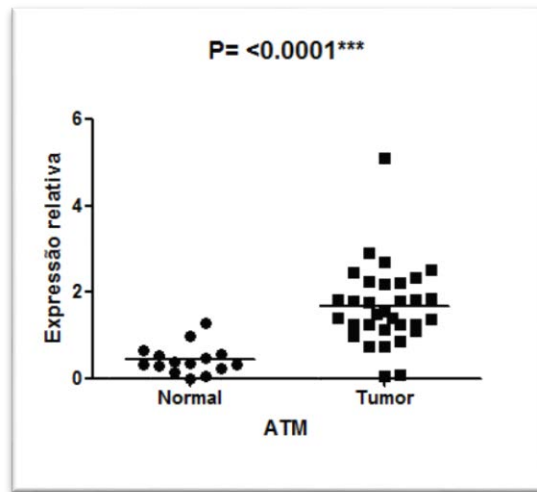


Figura 3. Representação gráfica da mediana do QR± desvio padrão do marcador no sangue (grupo controle) e no TVT do *ATM*. Teste de Mann-Whitney.

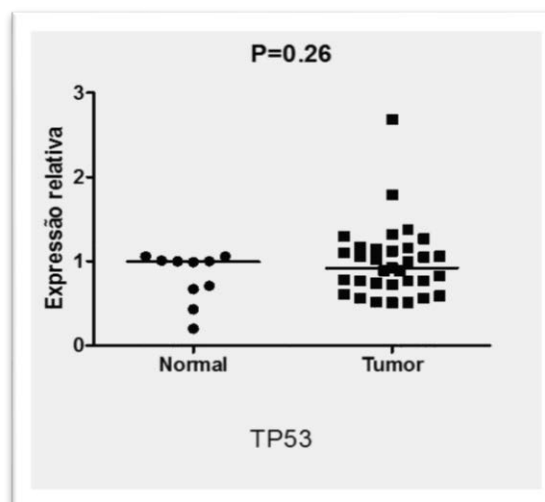


Figura 4. Representação gráfica da mediana do QR± desvio padrão do marcador no sangue (grupo controle) e no TVT do *TP53*. Teste de Mann-Whitney.

DISCUSSÃO

O tumor venéreo transmissível canino (TVT), apesar de ser considerado uma neoplasia maligna pela capacidade de se disseminar para outros órgãos, na maioria dos casos está associado ao prognóstico favorável, pela baixa taxa de invasão metastática e de mortalidade e a alta resposta aos tratamentos quimioterápicos

(VAZQUEZ-MOTA et al., 2008; LAPA, 2009; TINUCCI – COSTA, 2009; VARUGHESE et al., 2012). A forma como ocorre a sua transmissão, pela implantação direta de células tumorais diferentes de seu hospedeiro, faz com que o TVTc seja uma neoplasia diferenciada, havendo busca contínua para a compreensão dos mecanismos carcinogênicos que o levam a sua formação e a baixa malignidade (MARCHAL et al., 1997; BAUTISTA-GÓMEZ et al., 2011). Este fator pode ser correlacionado em nosso estudo pela expressão gênica de *ATM* nas células do TVT.

Bueno (2013) avaliou 926 amostras de neoplasias mamárias em mulheres, observou que a baixa expressão do *ATM* ocorre em neoplasias de alto grau, assim como na progressão da doença com invasão metastática. Outro dado observado foi que neoplasias que expressavam *ATM* tinham menor índice de invasão metastática. Segundo Cuatrecasas et al. (2006), em tumores mamários em mulheres a baixa expressão do *ATM* estimula a microvascularização, assim como o fator de indução de hipóxia, estimulando a angiogênese por meio da expressão de *VEGF*, fatores importantes da disseminação de células neoplásicas a distância assim como para o desenvolvimento tumoral localizado (OUSSET et al. 2010). No presente estudo foi verificado aumento da expressão de transcritos de *ATM* nas amostras caninas de TVT, quando comparado com o grupo controle, sugerindo associação de sua expressão no comportamento menos agressivo destes tumores.

Era de se esperar que o aumento de transcritos de *ATM* pudesse estimular os níveis de *TP53*, o que não foi observado, já que este último apresentou níveis semelhantes ao grupo controle. Segundo Lavine Khanna (1999) e Loehberg et al. (2007), a alta expressão do *ATM*, assim como alterações na cromatina celular, pode ativar o gene *TP53* e, desta maneira, interceptar as células com alteração genética na fase S/G1 e corrigir o erro no DNA e, caso o contrário, induzir a apoptose. Provavelmente outros mecanismos regulatórios influenciam nos níveis de transcritos de *TP53*, dentre eles silenciamento gênico ou ação de miRNA. Assim, a expressão do *TP53* não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle, fato também descrito por Moro et al. (2010).

Em TVT transplantados em fase de regressão espontânea, as células tumorais apresentaram baixos índices de imunomarcagem de P53, o que pode sugerir que o

P53 esta atuante e promovendo apoptose celular, e por este motivo ocorre a regressão do tumor (MORO et al., 2010).

Outro fator a se relatar é que mesmo em TVTs de origem natural a imunomarcção proteica para P53 foi fraca, sugerindo que esta proteina não participa diretamente no controle desta neoplasia (MORO et al., 2010). Esta não expresso proteica pode ser correlacionada ao silnciamento genético do *TP53* observado em nosso estudo.

Já em tumores mamários em cadelas, a imunomarcção do P53 é evidenciada sempre em neoplasias com característica metastática (BERTAGNOLLI et al., 2009). Lopes et al. (2010) relatam baixa imunoreatividade em neoplasias mioepiteliais mamárias e constantes mutações no gene *TP53* em adenocarcinomas mamários em humanos. Assim como Lopes et al., (2010), Terra, (2010), observaram maior imunomarcção de P53 em neoplasias mamárias malignas, quando comparado com o grupo de neoplasias benignas. Esses achados corroboram com o potencial maligno de neoplasias que acumulam a forma mutante da proteina P53 e diferem dos resultados observados em nosso estudo, dos quais os níveis de *TP53* se mantiveram dentro da normalidade, garantindo a ação deste gene supressor tumoral.

CONCLUSÃO

A baixa taxa de disseminação a distância do TVT pode estar relacionada ao aumento na expresso do *ATM*, assim com, pela expresso normal do *TP53* nas células tumorais do TVT, ambos genes desempenhando papel protetor na progresso tumoral.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2011/08290-2) e ao CNPq (processo 477670/2011-3).

REFERÊNCIAS

ARAKI, S.; EITEL, J. A.; BATUELLO, C. N.; BIJANGI-VISHEHSARAEI, K.; XIAN-JIN, X.; DANIELPOUR, D.; POLLOK, K. E.; BOOTHMAN, D. A.; MAYO, L. D. TGF β -1-induced expression of human Mdm2 correlates with late-stage metastatic breast cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, London, v. 120, n. 1, p. 290-302, 2010.

BAUTISTA-GÓMEZ, L. G.; MARTÍNEZ-CASTAÑEDA, S.; CÓRDOVA-ALARCÓN, E.; VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J. C. Analysis of canine transmissible venereal tumor genotypes using the D-loop region of mitochondrial DNA. **Genes; genetic systems**, Mishima, v. 86, n. 5, p. 351-355, 2011.

BENSIMON, A.; AEBERSOLD, R.; SHILOH, Y. Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 585, n. 11, p. 1625-1639, 2011.

BERTAGNOLLI, A. C.; CASSALI, G. D.; GENELHU, M. C. L. S.; COSTA, F. A.; OLIVEIRA, J. F. C.; GONÇALVES, P. B. D. Immunohistochemical expression of p63 and Δ Np63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. **Veterinary Pathology**, New York, v. 46, p. 407-415, 2009.

BHATTI, S.; KOZLOV, S.; FAROOQI, A. A.; NAGI, A.; LAVIN, M.; KHANNA, K. K. . ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, v. 68, n.18, p. 2977-3006. 2010.

BRINKHOF, B.; SPEE, B.; ROTHUIZEN, J.; PENNING, L. C. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression 2006. **Analytical Biochemistry**, New York, v. x; 2006.

BUENO, C. R.; CANEVAN, R. A.; VILLACIS, R. A. R.; DOMINGUES, M. A.C.; CALDEIRA, J. R. F.; ROCHA, R. M.; DRIGO, S. A. ROGATTO, S. R. ATM down-regulation is associated with poor prognosis in sporadic breast carcinomas. **Annals of Oncology**, Boston, v. 25, n. 1, p. 69-75, 2013.

CUATRECASAS, M.; SANTAMARIA, G.; VELASCO, M.; CAMACHO, E.; HERNANDEZ, L.; SANCHES, M.; ORRIT, C.; MURCIA, C.; CARDESA, A.; CAMPO, E.; FERNANDEZ, P. L.. ATM gene expression is associated with differentiation and angiogenesis in infiltrating breast carcinomas. **Histology and Histopathology**, Murcia v. 21, n. 2, p. 149–156, 2006.

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

GATEI, M.; SCOTT, S. P.; FILIPPOVITCH, I.; SORONIKA, N.; LAVIN, M. F.; WEBER, B.; KHANNA, K. K.. Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA11. **Cancer Research**, Chicago, v. 60, p. 3299–3304, 2000.

LAPA, F. A. S. **Estudo comparativo da eficácia de dois protocolos de tratamento de tumor venéreo transmissível em cães**. 2009. p. 73. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal-Fisiopatologia Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, 2009.

LAVIN, M. F.; KHANNA, K. K. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 75, n. 10, p. 1201–1214, 1999.

LAVIN, M.F. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signaling and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 9, n. 10, p. 759-769. 2008.

LOEHBERG, C. R.; THOMPSON, T.; KASTAN, M. B.; MACLEAN, K. H.; EDWARDS, D. G.; KITRELL, F. S.; MEDINA, D.; CONNEELY, O. M.; O'MALLEY, B. W. Ataxia telangiectasia-mutated and p53 are potential mediators of Chloroquine-induced resistance to mammary carcinogenesis. **Cancer Research**, Chicago, v. 67, n. 24, p. 12026-12033, 2007.

LOPES, R. A.; CARDOSO, T. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; ANDRADE, A. L. Occurrence and expression of p53 suppressor gene and c-Myc oncogene in dog eyelid tumors. **Veterinary Ophthalmology**, Osney Mead, v. 13, n. 2, p. 69-75, 2010.

MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; KAPLANSKI, C.; RIGAL, D.; MANGOL, J. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, New York, v. 57, n. 1 e 2, p. 1-11, 1997.

MORO, J. V.; TINUCCI-COSTA, M.; SILVEIRA, A.C.T.; GERARDI, D. C.; ALESSI, A. C. Reatividade da proteína P 53 no tumor venéreo transmissível. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n.2, p. 318-323, 2010.

MURCHISON, E. P.; DAVID C.; WEDGE, D. C.; ALEXANDROV, L.B.; FU, B.; MARTINCORENA, I.; NING, Z.; TUBIO, J. M. C.; WERNER, E.I.; ALLEN, J.; NARDI, A. B. D.; DONELAN, E. M.; MARINO, G.; FASSATI, A.; CAMPBELL, P. J.F; YANG, F.; BURT, A.; WEISS, R. A.; STRATTON, M. R. Transmissible dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. **Science**, New York, v. 24, n. 343, p. 437-440, 2014.

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

OUSSET, M.; BOUQUET, F.; FALLONE, F.; BIARD, D.; DRAY, C.; VALET, P.; SALLES, B.; MULLER, C. Loss of ATM positively regulates the expression of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) through oxidative stress: Role in the physiopathology of the disease. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 9, n. 14, 2010.

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

PROKOPCOVA, J.; KLEIBL, Z.; BANWELL, C. M.; POHLREICH, P. The role of ATM in breast cancer development. **Breast Cancer Research and Treatment**, Netherlands, v. 104, n. 2, p. 121-128. 2007.

REBBECK, C. A.; THOMAS, R.; BREEN, M.; LEROI, A. M.; BURT, A. Origins and evolution of a transmissible cancer. **Evolution**, Lancaster, v. 63, n. 9, p. 2340-2349, 2009.

ROGERS, K. S.; WALKER, M. A.; DILLON, H. B. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. **Journal American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 34, n. 6, p. 463-470, 1998.

STEELE, R. J.; LANE, D. P. p53 in cancer: a paradigm for modern management of cancer. **The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland**, Edinburgh, v. 3, n. 3, p. 197-205, 2005.

TERAOKA, S. N.; TELATAR, M.; BECKER-CATANIA, S.; LIANG, T.; ONENGUT, S.; TOLUN, A.; CHESSA, L.; SANAL, O.; BERNATOWSKA, E.; GATTI, R. A.; CONCANNON, P. Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 64, n.6, p. 1617-1631, 1999.

TERRA, E. M. **TGF β , pSmad2, p53, p63, E-caderina e Vimentina como marcadores prognósticos em tumores espontâneos de mama de cadelas**. 2010. 77p.Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

TINUCCI-COSTA, M. Tumor venéreo transmissível canino. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2009. cap. 34, p. 540-551.

VARUGHESE, E. E.; SINGLA, V. K.; RATNAKARAN, U. GANDOTRA, V.K. Successful management of metastatic transmissible venereal tumour to skin of mammary region. **Reproduction Domestic Animals**, Berlin, v. 47, n. 6, p. 366-369, 2012.

VAZQUEZ-MOTA, N.; SIMON-MARTINEZ, J.; CORDOVA-ALARCON, E.; LAGUNES, L.; FAJARDO, R. The T963C mutation of TP53 gene does not participate in the clonal origin of canine TVT. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, V. 32, n. 2, p. 187-191, 2008.

CAPÍTULO 4 - AUMENTO DA EXPRESSÃO DE VEGF, COX-2 E CDH1 PODEM FAVORECER IMPLANTAÇÃO DO TVT?

RESUMO - Devido aos baixos índices de metástase e ao alto poder de implantação do TVT se faz necessário estudar os fatores que podem estar envolvidos com este processo. Dentre os genes que colaboram com o processo de metástase e menor adesão celular, pode-se citar: o *VEGF*, *COX-2* e *CDH-1*, que codificam proteínas envolvidas na angiogênese e neovascularização, menor adesão celular, proliferação e inibição da apoptose. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica de *VEGF*, *COX-2* e *CDH-1* em TVT. Foram coletadas 32 amostras de TVTs, e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, para na sequência serem mantidas em freezer à -80°C. As amostras foram submetidas ao processo de extração do RNAm para em seguida ser submetida ao qRT-PCR. Os resultados foram comparados com um grupo controle composto por sangue periférico de 10 cães saudáveis. Foi observado aumento da expressão de *COX-2*, *VEGF*, *CDH-1* ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p = 0,04$, respectivamente) no tecido tumoral (TVT) quando comparado com o grupo controle. O aumento destes transcritos pode favorecer o comportamento biológico desta neoplasia transmissível.

Palavras Chaves: implantação, metástase, neoplasia, progressão

ABSTRACT - Due to low metastatic rates and high implantation ability of TVT, the study of factors that may be involved in these processes is necessary. Among the genes that collaborate to metastasis and cell adhesion reduction, it can be mention: *VEGF*, *COX-2* and *CDH-1* which can encode proteins involved in angiogenesis and neovascularization, cellular adhesion reduction, apoptosis proliferation and inhibition. The purpose of this study was evaluate genic expression of *COX-2*, *VEGF* and *CDH-1* in TVT. For that, 32 tumors collected and immediately frozen in liquid nitrogen and maintenance at - 80°C in freezer. Then, the mRNA of the material were extracted for qRT-PCR. Results were compared with control group represented by 10 healthy dogsperiferic blood. Significant increase of *COX-2*, *VEGF* and *CDH-1* ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$ and $p = 0,04$, respetively) was observed in tumoral tissue (TVT) compared with control group. The increse of this transcriptionsmay favor the biological behavior of the transmissible neoplasm.

Keywords: implantation, metastasis, neoplasm, progression

INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma neoplasia de células redondas, que pode se implantar em qualquer parte do corpo do animal, tendo sido relatado na cavidade oral, nasal e pele (ALBANESE et al., 2002; LAPA, 2009; TINUCCI-COSTA, 2009). Apesar de raras ou subdiagnosticadas, existem relatos de metástase do TVT, principalmente em linfonodos adjacentes (inguinais e poplíteos) e em outros órgãos como baço, fígado, olhos e medula (TINUCCI-COSTA, 2009).

Dentre os genes envolvidos no processo neoplásico estão COX-2, VEGF e *CDH-1*. A COX-2, possui ação importante na angiogênese assim como na proliferação celular e inibe a apoptose (BOL et al., 2002; CAO; PRESCOTT, 2002). O aumento da COX-2 estimula fatores de crescimento endotelial, como o VEGF e, desta forma, promove a angiogênese. Além disso, os novos vasos sanguíneos ou linfáticos predispõem a disseminação de células neoplásicas facilitando a metástase (MEYERS; WATSON, 2003; DUBOIS; WANG, 2004; NIJSTEN et al., 2004; QUEIROGA et al., 2005; SCHOEFFNER et al., 2005; KNOTTENBELT et al., 2006; DICKINSON et al., 2008; PAVLAKIS et al., 2008).

Outro fator importante é a adesão intercelular. Para a perda de adesão intercelular se faz necessário a redução gênica ou proteica da E-Caderina, promovendo desagregação das células neoplásicas facilitando, desta forma, a disseminação à distância. Além disto, no momento em que as células encontraram seu sítio de adesão, a baixa expressão da E-Caderina promove a liberação de proteínas do complexo de adesão celular como a β -Catenina com intuito de agregação e desenvolvimento do foco metastático (CLEVERS, 2006; ONDER et al., 2008).

OBJETIVO

Objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão gênica de *COX-2*, *VEGF* e *CDH1* em tumor venéreo transmissível de cães (TVT), a fim de verificar o papel desses genes na progressão tumoral e no mecanismo de implantação de células neoplásicas, característico desta neoplasia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 32 cães com TVT genital, oriundos de Centro de controle de Zoonoses de (Botucatu/SP e Seropédica/RJ, Brasil), sendo 19 fêmeas e 13 machos, com média de idade de quatro anos (variando de 2 a 6 anos). 29 cães eram sem raça definida (SRD), um American Pit Bull Terrier e dois Poodles. As lesões coletadas eram em vulva ou pênis sendo o diagnóstico inicial feito por exame citológico e posterior confirmação por exame histopatológico.

Outros 10 cães sadios foram selecionados para coleta de sangue e posterior extração dos leucócitos constituindo desta forma o grupo controle. Estes cães tinham idade média de 2,5 anos (variando de 2 a 3 anos), todos eram sem raça definida, sendo seis fêmeas e quatro machos. A seleção destes animais baseou-se em exames clínicos complementares para confirmação da higidez dos animais. Este experimento foi submetido ao comitê de ética, CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais, Jaboticabal-SP), protocolo número 011303/11.

Para a coleta dos fragmentos de TVT, os animais foram submetidos a medicação pré-anestésica, por via intramuscular, com a utilização de midazolam na dose 0,3 mg/kg associado a tramadol na dose de 3 mg/kg. Após 15 minutos, estes pacientes foram submetidos à punção transcutânea da veia cefálica com cateter e fluidoterapia com solução fisiológica 0,9% (10 mL/kg/h). A indução anestésica foi realizada com propofol, na dose de 4 mg/kg, por via intravenosa. A partir do momento em que o cão encontrava-se em plano anestésico-cirúrgico, foi feita a coleta do tumor, sem a necessidade de aprofundar o plano anestésico. Com o bisturi foi removida uma porção do tumor de 40 mg, sendo que o mesmo foi separado em fragmentos de 20 mg e imediatamente, os fragmentos foram acondicionados em criotubos estéreis e mantidos em nitrogênio líquido, até serem armazenados em freezer -80°C.

As amostras de TVT congeladas foram cortadas em criostato (LEICA), por meio de cortes de congelamento sequenciais de 5 µm. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e, posteriormente, analisadas em microscópio de luz (LEICA), a fim de se verificar a presença de tumor nas amostras congeladas. Todas as amostras apresentaram mais de 95% de células neoplásicas.

Posteriormente, estas amostras foram submetidas à clivagem por meio de tubos com *bids* magnéticos no equipamento Precellys R (BioAmerica Inc, Florida, EUA), seguida pela extração do RNA utilizando-se do protocolo de TRIZOL® (Invitrogen), conforme indicação do fabricante.

Para comparar a expressão de, *COX-2*, *VEGF* e *CDH-1* do TVT com o grupo controle cerca de 5 mL de sangue foi extraído de cachorros saudáveis e condicionado em tubos com anticoagulante e imediatamente refrigerado. Os tubos com sangue foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 1000 RPM e, posteriormente, a papa leucocitária foi isolada e transferida para um novo tubo com 1 mL de tampão de lise de célula vermelha (RCLB - pH7.6 1X: 10mM de Tris; 5mM de MgCl₂ e 10 mM de NaCl) e centrifugada a 4°C por 10 minutos a 1800 RPM até a obtenção do *pellet* de leucócitos livre de hemácias. O *pellet* de leucócito foi ressuscitado em 1 mL do reagente TRIZOL (Invitrogen) para extração de RNA total.

O RNA total das amostras de sangue e TVT foi extraído com o uso do reagente TRIZOL (Invitrogen) conforme o protocolo do fabricante. As amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados ao tubo. Após homogeneização por 3 minutos e incubação a temperatura ambiente pelo mesmo tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com auxílio de micropipeta, sendo adicionados 500 µL de álcool isopropílico. Após incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12.000x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com etanol a 70%. Após nova centrifugação a 7.500x g por 5 minutos a 4°C, o excesso de etanol foi retirado por secagem a vácuo, sendo o sedimento ressuscitado com água livre de DNases e RNases.

A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas em espectrofotômetro (Nanodrop™ ND-8000, Thermo Scientific) (Tabelas 1 e 2), enquanto a integridade do RNA foi avaliada pelo equipamento Bionalyzer (kit para RNA 6000 Nano Series - GE) (Figuras 1 e 2).

Para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com DNase. A transcrição reversa do RNA para cDNA foi realizada com 1 µg de RNA total e com a enzima Super-script III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen). Para este protocolo utilizou-se 1µL de oligodT (500 µg/mL), 1µL de random primers

(100 µg/mL) e 1 µL de dNTP. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e, a seguir, foram adicionados 4 µL de tampão de transcrição 5x, 1 µL de DTT 0,1M e, por último, foi acrescido 1 µL da enzima Super-script III (200U/ µL) e feita a incubação a 25°C durante 5 minutos, 50°C por 1 hora e meia, seguido de 70°C por 15 minutos. Ao final da transcrição, o cDNA foi mantido a -20°C.

Os primers para a expressão gênica de *COX-2*, *VEGF* e *CDH-1* foram desenhados com auxílio de um programa Primer Express e também com base nos trabalhos de Clements et al. (2009) e Kanemoto et al. (2011) (Tabela 3). Os genes de referência (endógenos) testados foram *RPS5*, *RPS19*, *RPL8*, *ACTB*, *HPRT* e os iniciadores destes genes foram obtidos segundo Brinkhof et al. (2006) (Tabela 4). A especificidade dos iniciadores de cada gene foi avaliada pelo programa BLAST do site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), tanto para a sequência *forward* quanto *reverse*.

As reações de RT-qPCR foram padronizadas para cada iniciador e também foram determinadas as eficiências das reações para cada par de iniciadores, utilizando curvas-padrão a partir do cDNA dos leucócitos.

As reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços, contendo duplicatas de cada TVT e da papa leucocitária, amostra que não tinha cDNA denominado branco, como controle negativo. Em cada poço foi adicionado 11,5 µL de solução composta por 6,25 µL do reagente Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,3 µL de cada iniciador (sequência *forward* e *reverse*) a 10 Mm e 1 µL de cDNA (diluição de 1:10).

As condições de reação de amplificação para todos os iniciadores foram 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C. Curvas de dissociação foram incluídas ao final de cada corrida para a determinação da especificidade dos produtos da PCR, visualizada por um pico único do produto amplificado.

A análise de cada reação foi realizada determinando primeiramente o *baseline*, que consiste na qualidade de fluorescência lida durante os ciclos iniciais da PCR. Posteriormente foi determinado o *threshold* de acordo com (LIVAK; SCHMITTGEN 2001).

Para análise estatística avaliou-se a normalidade dos dados e comparou-se os valores de expressão gênica de, *COX-2*, *VEGF* e *CDH-1* do TVT com o grupo controle

pelo teste de Mann–Whitney. Todas as análises foram feitas no programa GraphPrisma, considerando-se nível de significância de 95%.

Tabela 1. Concentração de mRNA pelo aparelho Nanodrop no TVT.

Amostra TVT	Concentração de mRNA (ng/μl)	260/280	260/230
1	1701	2,03	2,18
2	1316	2,05	2,14
3	2996	1,7	1,72
4	1368	2,02	2,19
5	1489	2,05	2,19
6	2789	1,87	1,95
7	2963	1,51	1,43
8	1912	2	1,98
9	2611	1,92	1,91
10	1211	2,07	2,05
11	2768	1,9	1,76
12	2823	1,32	1,25
13	2792	1,31	1,23
14	2950	1,54	1,5
15	2837	1,47	1,42
16	1801	2,07	2,1
17	2986	1,57	1,6
18	3019	1,64	1,67
19	2898	1,8	1,83
20	2895	1,39	1,38
21	2682	1,91	1,97
22	3032	1,62	1,62
23	2552	1,93	1,95
24	1602	1,72	3
25	2140	1,85	1,39
26	2234	1,96	1,48
27	2812	1,38	1,05
28	2899	1,77	1,44
29	2926	1,61	1,34
30	2950	1,57	1,21
31	2859	1,8	1,46
32	2996	2,03	2,18

Tabela 2. Concentração de mRNA pelo aparelho Nanodrop no Sangue.

Amostra Sangue	Concentração de mRNA (ng/μl)	260/280	260/230
1	504,6	1,93	0,31
2	265,3	2,03	0,43
3	745,9	2,01	0,72
4	665	1,98	0,75
5	568	1,93	0,33
6	323,6	2,07	0,51
7	91,05	2,06	0,66
8	190	2,11	0,94
9	64,98	2,01	0,98
10	16,6	2,04	1,25

Tabela 3. Primers para a expressão genica, desenhados com auxílio do programa Primer Express e também com base nos trabalhos de Clements et al. (2009) e Kanemoto et al. (2011).

GENE	SEQUÊNCIA FORWARD (5' - 3')	SEQUÊNCIA REVERSE (5' - 3')
VEGFA	GCAACTCCGGCAGAAGCAT	TGGCGATCCAATTCCAAGAG
CDH1	CAGCATGGACTCAGAAGACAGAAG	TTCCGGGCAGCTGATAGG
COX-2	GCTTCGATTGACCAGAGCAG	ACCATAAAGGGCCTCCAAG

Tabela 4. Sequência dos iniciadores utilizados na análise de expressão gênica. Estes dados foram obtidos segundo Brinkhof et al. (2006) com o *software Primer Express 2.0*.

GENE	PRIMER FOWARD (5' - 3')	PRIMER REVERSE (5' - 3')
RPS5	TCACTGGTGAGAACCCCCT	CCTGATTCACACGGCGTAG
RPS19	CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG'	GTTTCATCGTAGGGAGCAAG
RPL8	CCATGAATCCTGTGGAGC	GTAGAGGGTTTGCCGATG'
ACTB	GGCATCCTGACCCTCAAGTA	CTTCTCCATGTCGTCCAGT
HPRT	AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC	TTATAGTCAAGGGCATATCC

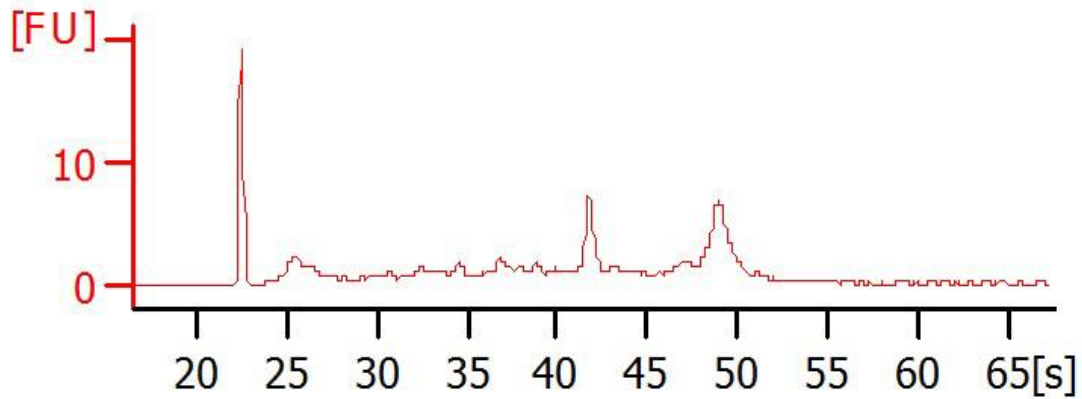


Figura 1. Análise da integridade do RNA pelo aparelho Bioanalyser da amostra do sangue. Valor de RIN: 7,40

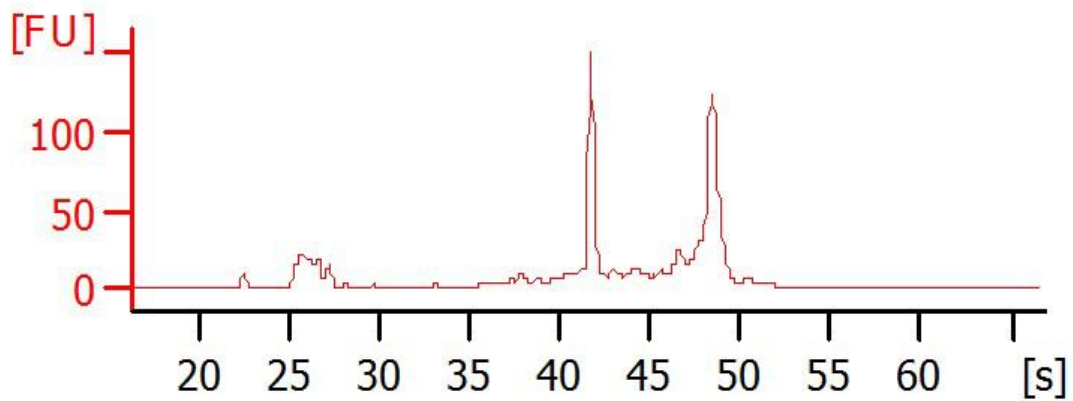


Figura 2. Análise da integridade do RNA pelo aparelho Bioanalyser da amostra TVT. Valor de RIN: 8,60

RESULTADOS

Na avaliação da *COX-2*, *VEGF*, *CDH-1* foi verificado aumento significativo ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p = 0,04$, respectivamente) da expressão de transcritos dos genes no tecido tumoral (TVT) quando comparados com o grupo controle (Figura 3A; 3B e Figura 4C).

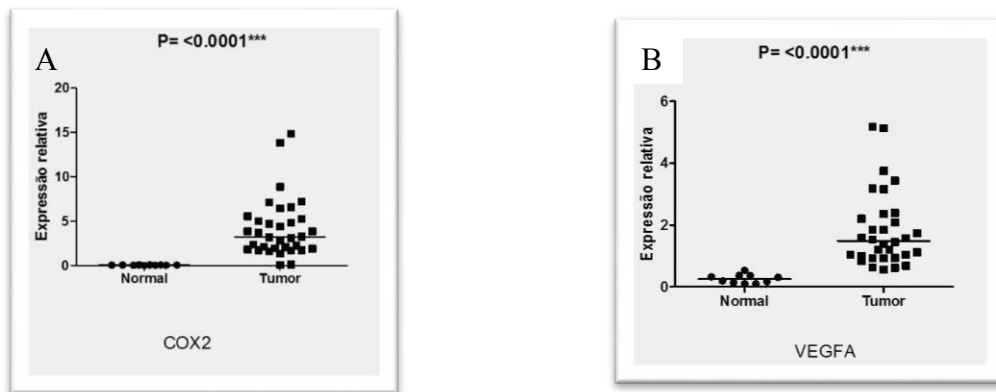


Figura 3. Representação gráfica da mediana do QR \pm desvio padrão dos marcadores no sangue (grupo controle) e no TVT. A) COX-2; B) VEGF. Teste de Mann-Whitney.

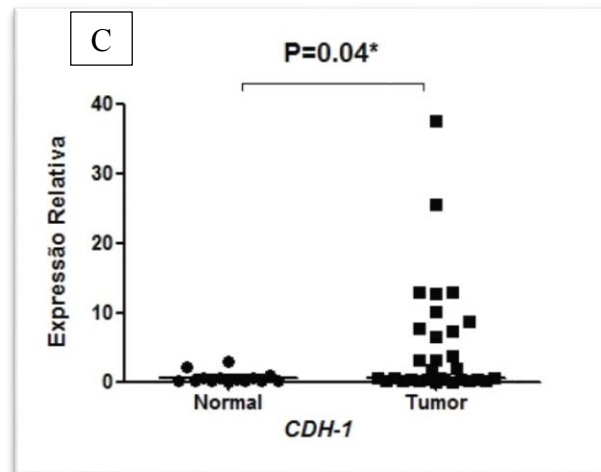


Figura 4. Representação gráfica da mediana do QR \pm desvio padrão dos marcadores no sangue (grupo controle) e no TVT. C) CDH-1. Teste de Mann-Whitney.

DISCUSSÃO

Dentre os mecanismos incriminados no desenvolvimento e invasão tumoral, aCOX-2 tem papel importante, pois o aumento da sua expressão está diretamente ligado aos fatores de crescimento, como angiogênese, crescimento endotelial, inibição da apoptose e, conseqüente progressão neoplásica maligna (BEAM et al., 2003; MILLANTA et al., 2006; DE NARDI et al., 2011). Em nossa avaliação da expressão de COX-2, somente as células do TVT apresentaram expressão gênica. Este dado corrobora com o descrito na literatura em que há aumento da expressão de COX-2

em neoplasias malignas (BEAM et al., 2003; MILLANTA et al., 2006; DE NARDI et al., 2011) ou processos inflamatórios. Em neoplasias mamárias de cadelas, De Nardi (2004) observou menor expressão proteica de COX-2 nas células de adenomas mamários quando comparados com os carcinomas mamários. De acordo com Levalle et al. (2009), Queiroga et al. (2010) e Pires et al. (2010), a expressão da COX-2 está aumentada em várias neoplasias de caráter recidivante localmente e metastático, como carcinomas em cavidade nasal, próstata e mama tanto em humanos como nos cães, sendo que estes dados são semelhantes aos de nosso estudo. Outro fator relevante sobre o aumento de expressão de COX-2 é a relação com o sistema imune que pode ocasionar a supressão de linfócitos B e T, assim como pode inibir a formação de células Natural Killer (NK), além de inativar as células T, permitindo então a progressão tumoral, visto que estas células possuem capacidade fagocítica sobre as células neoplásicas (WANG et al., 2006).

Como já se sabe, o TVT é uma neoplasia altamente vascularizada, de crescimento rápido, portanto o aumento da expressão da COX-2 nas células do tumor, em nosso trabalho, pode explicar maior velocidade de crescimento, pois esta enzima favorece o crescimento endotelial e estimula a angiogênese, permitindo desta forma a nutrição e oxigenação do tumor (WOLFESBERGER et al., 2006).

Assim como a COX-2 estimula a angiogênese, o crescimento acelerado do TVT ocasiona falta de oxigenação regional, isquemia e conseqüentemente necrose. Estes fatores que caracterizam agressividade em neoplasias malignas (FERRARA, 2003, TINUCCI-COSTA, 2009). Esta baixa oxigenação estimula o fator de crescimento endotelial *VEGF*, para formação de novos vasos sanguíneos (FERRARA, 2003). Assim, as células da periferia das regiões necróticas poderiam expressar *VEGF*, fato também observado em carcinomas mamários humanos por Mylona et al. (2007). Este fato pode ser correlacionado aos dados de nosso estudo que apresentam altos níveis de *VEGF*. Adams et al. (2000) observaram elevada imunomarcagem de *VEGF* em carcinomas mamários em mulheres, quando comprado com a expressão em adenomas mamários e tecido normal. Qiu et al. (2008) e Santos et al. (2010) também observaram maiores expressões de *VEGF* em tumores malignos de mama em mulheres quando comparados com as neoplasias mamárias benignas.

Porém, além de fatores angiogênicos, para que ocorra progressão tumoral, se faz necessária a perda da adesividade intercelular, com diminuição da expressão de *CDH-1* (ONDER et al., 2008). Este fato não foi observado pois em nosso estudo houve diferença estatística entre o grupo controle e o TVT. Terra (2010), não observou diferença significativa entre o grupo de neoplasias mamárias benignas e malignas em cadelas mais sim uma diminuição progressiva da expressão proteica da E-caderina entre as benignas e as malignas, bem como destas para as não metastáticas e para as metastáticas. Onder et al. (2008) observaram perda desta expressão com aumento dos níveis de progressão tumoral. Knudsen e Wheelock (2005), comparando diferentes tipos histológicos do carcinoma de mama de mulheres, relataram que os carcinomas ductais invasivos, apesar de não agressivos, expressam E-Caderina. Matos et al. (2006) associaram a baixa expressão desta proteína ao tipo histológico tumoral e constataram que em carcinoma sólidos de mama a expressão se encontra diminuída, o que pode explicar o grande número de cadelas acometidas por este tumor com metástase a distância.

Segundo HAN et al (2013), na avaliação de 24 melanomas orais em cães, 4 (17%) apresentaram expressão da E-Caderina preservada, enquanto em 20 (83%) a expressão foi reduzida ou negativa, o que pode sugerir o alto potencial metastático desta neoplasia. MACKOWIAK et al (2012), avaliaram a expressão da E-Caderina em mastocitomas cutâneos classificados em grau I, II e III e observaram perda da expressão da E-Caderina em mastocitomas de grau III, quando comparado aos de grau I e II. Diferentemente dos autores acima em nosso estudo houve expressão gênica do *CDH-1* e este dado pode corroborar com os resultados de VARA-RAMOS et al., (2011), que avaliaram 13 histiocitomas cutâneos para marcação imunohistoquímica de E-Caderina e observou que todos apresentavam forte imunomarcação. Apesar do histiocitoma cutâneo não ser de origem maligna diferentemente do TVT, podemos sugerir que as baixas taxas de metástases em TVT são decorrentes da expressão da *CDH-1*.

CONCLUSÃO

No TVT ocorre aumento de expressão de *VEGF*, *COX-2* e *CDH-1* em relação a leucócitos circulantes de animais saudáveis, fato que pode favorecer para o potencial de implantação deste tumor em outro animal.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2011/08290-2) e ao CNPq (processo 477670/2011-3).

REFERÊNCIAS

ADAMS, J.; CARDER, P.J.; DOWNEY, S.; FORBES, M.A.; MACLENNAN, K.; ALLGAR, V.; KAUFMAN, S.; HALLAM, S.; BICKNELL, R.; WALKER, J.J.; CAIRNDUFF, F.; SELBY, P.J.; PERREN T.J.; LANSDOWN, M.; BANKS, R.E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. **Cancer Research**, Chicago, v. 60, p. 2898–2905, 2000.

ALBANESE, F.; POLI, A.; MILLANTA, F.; ABROMO, F. Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with Leishmania-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin?. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 13, n. 5: p. 243-246, 2002.

AL-DISSI, A.N.; HAINES, D.M.; SINGH, B.; KIDNEY, B.A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor associated with tumor cell proliferation in canine cutaneous squamous cell carcinoma and trichoepitheliomas. **Veterinary Pathology**, New York, v. 44, p.823-830, 2007.

BEAM, S. L.; RASSNICK, K. M.; MOORE, A. S.; MCDONOUGH, S. P. An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in various feline neoplasms. **Veterinary Pathology**, New York, v. 40, n. 5, p. 496-500, 2003.

BOL, D. K.; ROWLEY, B.; HO, C. P.; PILZ, B.; SWERDEL, M.; KIGUCHI, K.; MUGA, S.; KLEIN, R.; FISCHER, M. Cyclooxygenase 2 overexpression in the skin of transgenic mice results in suppression of tumor development. **Cancer Research**, Chicago, v. 62, p. 2516-2521, 2002.

BRINKHOF, B.; SPEE, B.; ROTHUIZEN, J.; PENNING, L. C. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression..2006. **Analytical Biochemistry**, New York, v. x; 2006.

CAO, Y.; PRESCOTT, S. M.; Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **Journal of Cellular Physiology**, New York, v. 190, n. 3, p. 279-286, 2002.

CLEMENTS, D. N.; FITZPATRICK, N.; CARTER, S. D.; DAY, P.J.R. Cartilage gene expression correlates with radiographic severity of canine elbow osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, London, v. 179, p. 211–218. 2009.

CLEVERS, H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. **Cell**, Cambridge, v. 127, n. 3 p. 469-480, 2006.

DE NARDI, A. B. **Expressão da ciclooxygenase-2 nas neoplasias de mama em cadelas (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758).**2004. 54p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

DE NARDI, A. B.; RAPOSO, T. M. M.; HUPPES, R. R.; DALECK, C. R. AMORIM, R. L. cox-2 inhibitors for cancer treatment in dogs. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 31, n.4, p. 275-279, 2011.

DICKINSON, P. J.; STURGES, B. K.; HIGGINS, R. J.; ROBERTS, B. N.; LEUTENEGGER, C. M.; BOLLEN, A. W.; LECOUTEUR, R. A. Vascular endothelial growth factor mRNA expression and peritumoral edema in canine primary central nervous system tumors. **Veterinary Pathology**, New York, v. 45, n. 2, p.131e139, 2008.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOETER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, New York, v. 9, n. 6, p. 669-673, 2003.

HAN, J. I.; KIM, Y.; KIM, D. Y.; NA, K. J. Alteration in ECadherin/b-Catenin Expression in Canine Melanotic Tumors. **Veterinary Pathology**, New York, v. 50, n. 2, p. 274-280, 2013

KANEMOTO, H.; OHNO, K.; SAKAI, M.; NAKASHIMA, K.; TAKAHASHI, M.; FUJINO, Y.; TSUJIMOTO, H. Expression of Fibrosis-Related Genes in Canine Chronic Hepatitis. **Veterinary Pathology**, New York, v. 48, n. 4, p. 839-845. 2011.

KNOTTENBELT, C.; MELLOR, D.; NIXON, C.; THOMPSON, H.; ARGYLE, D. J. Cohort study of COX-1 and COX-2 expression in canine rectal and bladder tumors. **Journal of the Small Animal Practice**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 196-200, 2006.

KNUDSEN, K.A.; WHEELLOCK, M.J. Cadherins and the mammary gland. **Journal of cellular Biochemistry**, New York, v. 95, p. 488-496, 2005.

LAPA, F. A. S. **Estudo comparativo da eficácia de dois protocolos de tratamento de tumor venéreo transmissível em cães**. 2009. p. 73. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal-Fisiopatologia Animal) -Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2009.

LEVALLE, G. E. BERTAGNOLLI, A. C.; TAVARES, W. L. F.; CASSALI, G. D. Expression in canine mammary carcinomas: Correlation with angiogenesis end overall survival. **Veterinary Pathology**, New York, v. 46, n. 6, p. 1275-1280, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402-408, 2001.

MATOS, A. J. F.; LOPES, C.; CARVALHEIRA, J.; SANTOS, M.; RUTTEMAN, G. R.; GÄRTNER, F. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinic-pathological variables. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 134, n. 2-3, p. 182-189, 2006.

MACKOWIAK, L. I.; GENTILE, L. B.; CHAIBLE, L. M.; NAGAMINE, L. M.; GUERRA, J. M.; MOTA, E. F. F.; MATERA, J. M.; MENNECIER, G.; SANCHES, D. S.; DAGLI, M. L. Z. E-cadherin in canine mast cell tumors: Decreased expression and altered subcellular localization in Grade 3 tumors. **The Veterinary Journal**, London, v. 194, n. 3, p. 405-411, 2012.

MEYERS, M. O.; WATSON, J. C. Angiogenesis and hepatic colorectal metastases. **Surgical Oncology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 151-163, 2003.

MILLANTA, F.; CITI, S.; DELLA SANTA, D.; PORCIANI, M.; POLI, A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. **Breast Cancer Research and Treatment**, Netherlands, v. 98, n. 1, p. 115-120, 2006.

MYLONA, E.; ALEXANDROU, P.; GIANNOPOULOU, I.; LIAPIS, G.; SOFIA, M.; KERAMOPOULOS, A.; NAKOPOULOU, L. The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 104, p. 557-563. 2007.

NIJSTEN, T.; COLPAERT, C. G.; VERMEULEN, P. B.; HARRIS, A. L.; VAN MARCK, E.; LAMBERT, J. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. **The British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 151, n. 4, p. 837-845, 2004.

ONDER, T. T.; GUPTA, P. B.; MANI, S. A.; YANG, J.; LANDER, E. S.; WEINBERG, R. A. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. **Cancer Research**, Chicago, v. 68, n. 10, p. 3645- 3654, 2008.

PAVLAKIS, K.; MESSINI, I.; VREKOUSSIS, T.; YIANNOU, P.; KERAMOPOULLOS, D.; LOUVROU, N.; LIAKAKOS, T.; STATHOPOULOS, E. N. The assessment of angiogenesis and fibroblastic stromagenesis in hyperplastic and pre-invasive breast lesions. **BMC Cancer**, London, v.8, p. 8- 88, 2008.

PIRES, I.; GARCIA, A.; PRADA, J.; QUEIROGA, F. L. COX – 1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular emlanocytic tumours. **Journal Comparative Pathology**, London, v. 143, n. 2, p. 142-149, 2010.

QIU, C. W.; LIN, D. G.; WANG, J. Q.; LI, C. Y.; DENG, G. Z. Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 32, p. 463–472. 2008.

QUEIROGA, F. L.; PEREZ-ALENZA, M. D.; SILVAN, G.; PENA, L.; LOPES, C.; ILLERA, J. C. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. **Anticancer Research**, Athens, v. 25, n. 6B, p. 4269-4275, 2005.

QUEIROGA, F. L.; PIRES, I.; LOBO, L.; LOPES, C.S. The role of COX-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. **Veterinary journal**, London, v. 88, p. 441-445, 2010.

SANTOS, A. A. F.; OLIVEIRA, J. T.; LOPES, C. C. C.; AMORIM, I F.; VICENTE, C. M. F. B.; GAËRTNER, F. R. M. MATOS, A. J. F. Immunohistochemical Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mammary Tumours. **Journal Comparative Pathology**, London, v. 143, n.4, p. 268 – 275, 2010.

SCHOEFFNER, D. J.; MATHENY, S. L.; AKAHANE, T.; BERRY, A.; MERLINO, G.; THORGEIRSSON, U. P. VEGF contributes to mammary tumor growth in transgenic mice through paracrine and autocrine mechanisms. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 85, n. 5, p. 608-623, 2005.

TERRA, E. M. **TGF β , pSmad2, p53, p63, E-Caderina e Vimentina como marcadores prognósticos em tumores espontâneos de mama de cadelas**. 2010. 77p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

TINUCCI-COSTA, M. Tumor venéreo transmissível canino. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2009. cap. 34, p. 540-551.

VARA-RAMOS, J. A.; MILLER, M. A. Immunohistochemical Expression of E-cadherin Does Not Distinguish Canine Cutaneous Histiocytoma From Other Canine Round Cell Tumors. **Veterinary Pathology**, New York, v. 48, n. 3, p. 758-763, 2011.

WANG, W.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase 2 derived prostaglandin E₂ regulates the angiogenic switch. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United State of America**, New York, v. 101, n. 2, p. 415-416, 2004.

WOLFESBERGER, B.; WALTER, I.; HOELZL, C.; THALHAMMER, J. G.; EGERBACHER, M. Antineoplastic effect of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on canine osteosarcoma cells. **Research in Veterinary Science**, New York, v. 80, n. 3, p. 308-316, 2006.