

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO:
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM O
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO E
MICROAMBIENTE TUMORAL

HALINE BALLESTERO FÊO

BOTUCATU – SP
2016



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

**TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO:
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM O
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO E MICROAMBIENTE
TUMORAL**

HALINE BALLESTERO FÊO

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título
de Doutor, área de concentração:
Clínica Médica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Noeme Sousa Rocha

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

Fêo, Haline Ballestero.

Tumor venéreo transmissível canino : expressão de genes relacionados com o comportamento biológico e microambiente tumoral / Haline Ballestero Fêo. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Noeme Sousa Rocha
Capes: 50501062

1. Cães - Câncer. 2. Tumores venéreos veterinários.
3. Microambiente tumoral. 4. Expressão gênica. 5. Sistema imunológico.

Palavras-chave: Câncer; Cão; Microambiente tumoral; TVT.

Nome da Autora: Haline Ballesterio Fêo

Título: TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO: EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS COM O COMPORTAMENTO BIOLÓGICO E
MICROAMBIENTE TUMORAL

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Noeme Sousa Rocha
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi
Membro
Departamento de Química e Bioquímica
IBB – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Patrick Vianna Garcia
Membro
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
IB – UNICAMP – Campinas

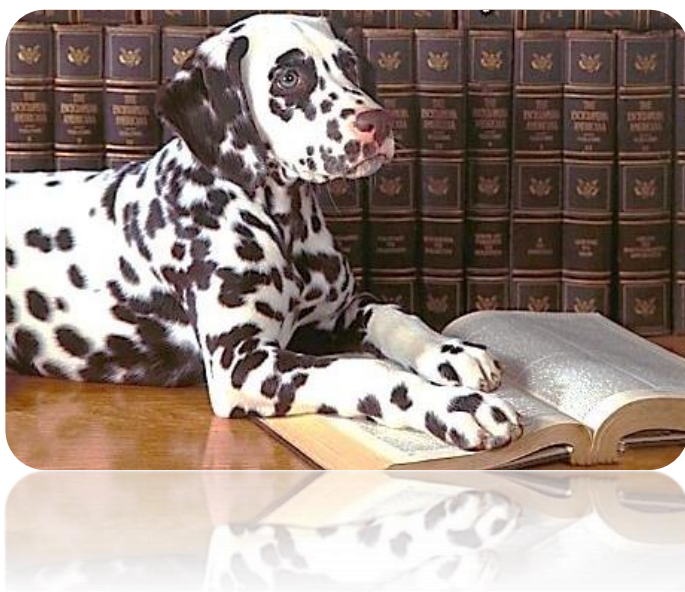
Profª Drª Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura
Membro
Departamento de Patologia Animal
EVZ – UFG – Goiânia

Profª Drª Anne Santos do Amaral
Membro
Departamento de Clínica de Pequenos Animais
CCR – UFSM – Santa Maria

Data da Defesa: 01 de Dezembro de 2016.



*“Regras sociais muito semelhantes,
capacidade de contágio emocional,
incrível facilidade para entender nossos desejos
pela simples entonação da nossa voz:
Nenhum outro animal consegue compreender
o homem melhor que o cão.”*



*Aos meus **Pais**,
minha fortaleza
sem eles não teria chegado aqui*

*Ao meu **Noivo**,
meu porto seguro
essencial em todos os momentos*

*Aos **Animais**,
sem eles não teria sido possível !*

*“Chorar não resolve, falar pouco é uma virtude,
aprender a se colocar em primeiro lugar não é egoísmo.
Para qualquer escolha se segue alguma consequência,
vontades efêmeras não valem a pena.
Quem faz uma vez,
não faz duas necessariamente,
mas quem faz dez, com certeza faz onze.
Perdoar é nobre, esquecer é quase impossível.
O que está no passado
tem motivos para não fazer parte do seu presente,
não é preciso perder para aprender a dar valor,
e os amigos ainda se contam nos dedos.
Nos poucos você percebe o que vale a pena,
o que se deve guardar pro resto da vida,
e o que nunca deveria ter entrado nela.
Não tem como esconder a verdade,
nem tem como enterrar o passado,
o tempo sempre vai ser o melhor remédio,
mas seus resultados nem sempre são imediatos.”*

Charles Chaplin

Agradecimentos Especiais

À **Deus**, em sua onipresença, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades. Graças ao Senhor pude buscar, conquistar e vencer mais uma etapa!

Aos meus *pais*, **Sérgio** e **Tere**, referência para mim ao longo da minha vida. Muito obrigada pelo imenso amor incondicional, compreensão, incentivo e apoio durante toda esta jornada. Meu reconhecimento e eterna gratidão... Sem vocês eu nada seria!

Ao meu *noivo*, **Leandro**, que sempre me apoiou em cada decisão, sempre esteve ao meu lado em cada incerteza, em cada alegria, em cada desabafo, em cada conquista, em cada derrota, em cada vitória e principalmente em cada momento do qual eu precisei. Te agradeço pelo amor e respeito, companheirismo e tolerância, incentivo e carinho!

[...]

*Onde houver dúvida, que eu leve a fé;
Onde houver erro, que eu leve a verdade;
Onde houver desespero, que eu leve a esperança;
Onde houver trevas, que eu leve a luz.*

[...]

Pois é dando que se recebe!

[...]

[São Francisco de Assis]

Agradecimentos

A parte dos agradecimentos de uma Tese é talvez a melhor parte de se ler. É nela que temos a oportunidade de rapidamente tomar ciência do processo todo pelo qual passamos e principalmente pelas pessoas que estiveram junto e fizeram parte dessa etapa. Antes de mais nada, quero agradecer a todas as pessoas que me ajudaram a desenvolver essa tese e fizeram parte da minha vida nesses 3 anos e meio. Algumas foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho, outras para o crescimento pessoal, outras ainda foram importantes só pelo fato de estarem ao lado. Como já dizia o sábio filósofo Antoine de Saint-Exupéry: *“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmos e deixa um pouco de si mesmo. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que nada é ao acaso.”*

Professora Noeme Sousa Rocha por me acolher em seu laboratório e me dar a oportunidade de crescer como profissional e como pessoa. Agradeço pela dedicação, preocupação, confiança e amizade.

Mauricio Montoya Flórez por ter me auxiliado não só no começo do projeto como durante todo o percurso, pela prontidão em tirar dúvidas e responder os e-mails, pela paciência em ajudar sempre na resolução dos problemas, na interpretação dos resultados e na discussão das hipóteses, pelos momentos de convívio e principalmente pelo apoio e amizade.

Anderson Prado Duzanski pela amizade e principalmente pelas conversas, além do apoio durante a maior parte do projeto, estando sempre presente e trabalhando em conjunto nos processos de coleta, citometria e quimioterapias.

Ricardo Seiti Yamatogi não só por ter me dado as primeiras explicações sobre o universo genômico, mas também pela paciência das padronizações, além do acolhimento diante dos obstáculos durante todo o processo.

*Professor **Ramon Kaneno***, pela permissão para o uso de seu laboratório, além de sempre estar auxiliando com o seu conhecimento no que diz respeito à imunologia e à tumores.

*Professor **João Pessoa de Araújo Júnior*** pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, pela disponibilidade para o uso do RT-qPCR, pela confiança e paciência desde o início até o fim do trabalho.

*Professor **Rogério Antônio de Oliveira*** pelo auxílio e pela paciência durante as análises estatísticas.

*Técnico **Claudinei*** pela sua presteza, disposição e amizade demonstradas durante convívio no Serviço de Patologia Veterinária.

*Professora **Renée Laufer Amorim*** pela oportunidade e pela paciência em ter me aceitado e me guiado nas aulas de estágio docência.

Aos *professores* da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP Botucatu – ***Alessandre Hataka, Julio Lopes Sequeira, Regina Takahira, Antônio Carlos Paes, Márcio Garcia Ribeiro, Luiz Henrique de Araújo Machado, Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt, Maria Lucia Gomes Lourenço e Carla Adriene da Silva Franchi*** pelas experiências compartilhadas nas disciplinas ministradas.

Aos *amigos* que fiz durante esses anos morando em Botucatu: ***Bruna, Gustavo Michelin, Gustavo D’Ercole, Vitória, Lucas, Carlos Eduardo, Francisco Pupo, Laura Carolina, Cristiane Beck, Eliana Curvelo, Isamery, Priscila, Cadú, Talita, Diogo, Cláudia, Juliano, Léo, Maíra, Caio, Fabrício, Tati e Renata.***

A minha *amiga-irmã*, ***Thainá***, pelas inúmeras conversas, desabafos e aconselhamentos durante todo o percurso e durante toda a vida.

As minhas *primas* ***Patrícia e Natália***, ao meu *primo* ***Luís Henrique*** e aos *agregados* ***Juninho e Camila*** pela divertida amizade e companheirismo, desde os momentos mais fúteis aos mais importantes!

Aos meus *eternos amigos*, **Bertão** e **Marafon**, por sempre me ouvirem e me aconselharem em todos os momentos da minha vida.

Ao **Botuca** e a **Sônia** (*in memoriam*) por sempre me acolherem em sua casa!

As minhas *avós*, **Mara** e **Rosa** (*in memoriam*), pelos sempre sábios conselhos e palavras de ternura.

A minha *cunhada*, **Natália**, pelo apoio durante esse projeto.

Obrigada, mais uma vez, ao meu *pai* **Sérgio** e a minha *mãe* **Tere**, que sempre me apoiaram e que me ensinaram a ter iniciativa e a perseguir os sonhos.

Aos *membros da banca* **profa. Valéria** e **prof. Júlio** pelas considerações durante meu exame de qualificação.

A todos os **colegas**, especialmente a *Camila* do Instituto de Biotecnologia – IBTEC por sempre estar de prontidão para o auxílio dos PCRs e a todos do Laboratório de Imunologia de Tumores – UNESP, especialmente a *Graziela*, pela sempre disponibilidade em ajudar a buscar respostas às dificuldades encontradas neste trabalho.

Ao **Carlos Pazini Junior**, e a todos da *Seção Técnica de Pós-Graduação FMVZ* – UNESP/Câmpus de Botucatu pela amizade, atenção e cuidado em resolver todos os problemas referentes à pós-graduação, e ao programa de pós-graduação de Medicina Veterinária e Zootecnia por ter me acolhido, dando-me a oportunidade de estudar e aprender.

A todos os **professores, funcionários e colegas** do Departamento de Patologia – Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e a todos do Departamento de Genética do Instituto de Biociências – UNESP, pelo carinho, companheirismo e amizade.

A **Secretaria de Graduação** pela paciência em sempre me direcionar quanto aos estágios docência.

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

Aos **membros da banca** pela atenção e análise desse trabalho.

A **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)**, pelo subsídio financeiro por meio da concessão de Bolsa de Doutorado para a realização deste trabalho.

Ao **CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)**, pelo financiamento que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho (CNPq 445250/2014-3).

A **FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)**, pelo auxílio que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho (FAPESP 2012/19285-2).

E finalmente agradeço, com muito respeito, aos **animais** que participaram involuntariamente desta pesquisa.

*“N*ão importa o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. ”

William Shakespeare

*A todos vocês, meus afetos,
minha gratidão e mais sinceras reverências.*

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

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APC	Célula apresentadora de antígeno
Bax	Proteína pró-apoptótica (do inglês <i>Bcl-2 Associated X protein</i>)
Bcl-2	Proteína antiapoptótica (do inglês <i>B-Cell Lymphoma 2</i>)
Bcl-xL	Proteína antiapoptótica (do inglês <i>B-Cell Lymphoma extra Large</i>)
CDK	Quinases dependentes de ciclina (do inglês <i>Cyclin-Dependent protein Kinase</i>)
CAAF	Citologia aspirativa por agulha fina
Cip	Proteínas inibidoras de cinase
CPA	Complexo promotor de anáfase
CXCL	Quimiocina motivo (CXC) ligante
CXCR	Quimiocina motivo (CXC) receptor
DC	Células dendríticas (do inglês <i>Dendritic Cells</i>)
DMEM	Meio MEM modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's Modified Essential Medium</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPCs	Células progenitoras endoteliais
GDP	Guanina difosfato
GTP	Guanina trifosfato
HIF1-α	Fator 1 α induzido por hipóxia (do inglês <i>Hypoxia-Inducible Factor 1α</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IAP	Proteínas inibidoras da apoptose
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
JAK	Janus quinases (do inglês <i>Janus family</i>)
Ki-67	Antígeno de proliferação celular
LTC	Linfócito T citotóxico
M1 e M2	Macrófagos tipo 1 e 2
MAPs	Proteínas associadas a microtúbulos (do inglês <i>Microtubule Associated Proteins</i>)
MDM2	Proteína MDM2 (do inglês <i>Murine Double Minute 2</i>)
MEC	Matriz extracelular

MET	Transição epitélio-mesenquimal
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade (do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MMP	Metaloproteinase de matriz
NK	<i>Natural Killer</i> (célula exterminadora natural)
NOXA	Proteína pró-apoptótica (Latim para <i>damage</i>)
P-gp	Glicoproteína-p
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular (do inglês p53 <i>Proliferative Nuclear Cell Antigen</i>)
PUMA	Proteína pró-apoptótica (do inglês p53 <i>Upregulated Modulator of Apoptosis</i>)
Ras	Oncogene Ras (do inglês, <i>Rat sarcoma</i>)
RASSF1A	Família do domínio de associação a Ras isoforma 1A
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas tóxicas de oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SDF-1α	Fator 1 α derivado de célula estromal
SFB	Soro fetal bovino
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo simples
SRC	Src quinases (do inglês <i>Src family</i>)
STAT	Proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (do inglês <i>Signal Transducer and Activator of Transcription proteins</i>)
SYBR	Corante intercalante de DNA (2 ^a geração)
TGF-β	Fator transformador do crescimento tumoral (do inglês <i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
Th	Linfócito T auxiliar (do inglês <i>T helper</i>)
TILs	Linfócitos T infiltrantes do tumor
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases
TK	Tirosina-quinase (do inglês <i>Tyrosine Kinases</i>)
Treg	Linfócito T regulatório
TVT	Tumor Venéreo Transmissível
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VHL	Supressor tumoral de Von Hippel-Lindau
XPA	Proteína de reparo de DNA (do inglês <i>Xeroderma Pigmentosum, Complementation group A</i>)

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Sequências de <i>primers</i> dos genes utilizados na RT-qPCR.....	41
Tabela 2 Dados clínicos dos pacientes portadores de TVT atendidos no Hospital Veterinário (FMVZ/UNESP – Botucatu).....	44
Tabela 3 Valores numéricos (QR) referentes à análise de RT-qPCR para os genes <i>IL-6</i> , <i>IFN-γ</i> , <i>TGF-β</i> , <i>TP53</i> , <i>P21</i> , <i>RASSF1</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-2</i> , <i>BCL-xL</i> , <i>CXCR4</i> e <i>VEGF</i> em amostras de tecidos e de culturas de TVT.....	52

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Carcinogênese: transformação de uma célula normal em células cancerosas.....	6
Figura 2 Mecanismos envolvendo a p53 na supressão tumoral.....	12
Figura 3 Microambiente tumoral.....	19
Figura 4 Tumor venéreo transmissível: fases de progressão e regressão.....	32
Figura 5 Metodologia esquematizando amostras coletadas e armazenadas para análises de citogenética e RT-qPCR dos animais portadores de TVT.....	37
Figura 6 Tumor venéreo transmissível canino em um animal macho, com multilobulações e aspecto de “couve-flor”, em região de glândula e pênis distal.....	47
Figura 7 TVT em um animal fêmea. Lesão múltipla, multilobulada, com aspecto de “couve-flor”, aderida. Coloração róseo-claro a vermelho intenso, com áreas de hemorragia e necrose.....	47
Figura 8 Citologia do TVT de um cão, macho, SRD com localização genital. Padrão linfocitóide e plasmocitóide.....	48
Figura 9 Histopatologia do TVT plasmocitóide em fase de progressão e de regressão.....	49
Figura 10 Cultura celular de TVT – terceira passagem. Células com formatos que variam de fusiforme a oval.....	50
Figura 11 Cariótipo de célula em cultura de TVT. Contagem de 59 cromossomos, número inferior a 78 das células somáticas do cão.....	51

Figura 12	Gráfico da expressão relativa de RNAm de <i>BCL-xL</i> , evidenciando diferença estatisticamente significativa entre seus níveis de expressão em amostras teciduais em relação às amostras provenientes de cultivos celulares ($P < 0.05$).....	56
Figura 13	Gráfico da expressão relativa de RNAm de <i>TGF-β</i> evidenciando diferença estatisticamente significativa entre os níveis de expressão desse gene quando comparado com a subcategoria clínica da resposta dos animais ao tratamento com vincristina ($P < 0.05$).....	58
Figura 14	Gráfico da expressão relativa de RNAm de <i>CXCR4</i> evidenciando diferença estatisticamente significativa entre seus níveis de expressão em amostras teciduais em relação às amostras provenientes de cultivos celulares ($P < 0.05$).....	61
Figura 15	Gráfico da expressão relativa de RNAm de <i>RASSF1</i> evidenciando diferença estatisticamente significativa entre seus níveis de expressão em amostras teciduais em relação às amostras provenientes de cultivos celulares ($P < 0.01$).....	63

SUMÁRIO

	Página
LISTA ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Carcinogênese.....	5
2.1.1 Proto-oncogenes e Genes supressores tumorais.....	7
2.1.1.1 RASSF1.....	7
2.1.1.2 p21.....	10
2.1.1.3 p53.....	11
2.1.2 Apoptose.....	13
2.1.2.1 Família Bcl-2.....	14
2.1.3 Angiogênese.....	15
2.1.3.1 VEGF.....	16
2.1.3.2 CXCR4 e CXCL12.....	18
2.2 Tumor venéreo transmissível.....	20
2.2.1 Características morfológicas.....	22
2.2.2 Comportamento biológico.....	23
2.2.3 Tratamento.....	24
2.3 Sistema imune e o TVT.....	25
2.3.1 IL-6.....	28
2.3.2 TGF- β	29
2.3.3 IFN- γ	30
3 OBJETIVO.....	33
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34

4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Comitê de ética.....	36
4.2 Avaliação clínica dos cães com TVT.....	36
4.3 Coleta do tumor e classificação citopatológica.....	36
4.4 Análise do comportamento biológico.....	37
4.5 Cultura primária de TVT.....	38
4.5.1 Contagem cromossômica dos cultivos primários.....	39
4.6 Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR)	40
4.6.1 Desenho do primer para <i>RASSF1</i>	41
4.7 Análise estatística.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Dados clínicos e epidemiológicos dos animais.....	44
5.2 Contagem cromossômica dos cultivos primários.....	50
5.3 Expressão gênica.....	52
6 CONCLUSÕES.....	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
Trabalho Científico.....	93
Anexos.....	120
Anexo 1 – Atestado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - 81/2014).....	121
Anexo 2 – Atestado de alteração título do projeto aprovado pela CEUA e CONCEA.....	122
Anexo 3 – Formulário de avaliação dos parâmetros TNM, descrição de massas adicionais e seguimento do paciente tratado com o quimioterápico.....	123
Anexo 4 – Questionário referente ao protocolo semiológico e dados epidemiológicos fornecido pelos proprietários dos animais incluídos no estudo.....	124
Anexo 5 – Termo de consentimento livre esclarecido e assinado pelos proprietários dos animais incluídos no estudo.....	125

FÊO, H.B. **Tumor venéreo transmissível canino: expressão de genes relacionados com o comportamento biológico e microambiente tumoral**. Botucatu, 2016. 125p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O tumor venéreo transmissível (TVT) é um câncer transmissível, que se propaga naturalmente entre os cães, pela transferência alogênica de células tumorais, principalmente, durante o coito. Sabe-se que o microambiente tumoral influencia diretamente no comportamento do tumor, além de interagir com o sistema imune do hospedeiro. Face aos escassos estudos relacionados aos eventos celulares envolvidos no microambiente tumoral, o presente estudo teve por objetivo quantificar a expressão de genes relacionados com esse microambiente, tanto em células do TVT *in vivo* como *in vitro*, correlacionando-os com a resposta clínica dos animais tratados com vincristina. Para tal, foram incluídos neste estudo 18 cães atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, Campus de Botucatu, portadores de TVT de ocorrência natural. As amostras tumorais foram coletadas antes do tratamento quimioterápico, cultivadas e submetidas à análise citogenética e quantificação por meio de RT-qPCR. Observou-se amostras tumorais com reduzido número cromossomos (59) em relação ao cão (78) e o subtipo celular prevalente foi o plasmocitóide, embora células com padrão linfocitóide também tenham sido observadas. Quando comparou-se os resultados referentes às expressões gênicas, o gene *TP53* se apresentou elevado na maioria dos casos, indicando possível alteração do mesmo, enquanto *BCL-2*, *BCL-xL*, *BAX* e *RASSF1* apresentaram-se variáveis, dependendo do animal analisado, fato esse que pode ser devido a alterações genéticas e/ou epigenéticas no TVT, além da possibilidade de uma origem policlonal. Ademais, nessas situações, parece não estar ocorrendo a regulação apoptótica esperada desses genes pelo *TP53*. No caso das citocinas *IFN-γ* e *IL-6*, em sua maioria, verificou-se baixa expressão. Nesses casos, provavelmente não ocorreu expressão de MHC nas células tumorais e nem ativação de células imunes a fim de eliminar o tumor. Os genes *P21* e *TGF-β* mostraram-se, em sua maioria, com expressões normalizadas. Já o *VEGF* exibiu expressões extremamente elevadas, evidenciando seu papel angiogênico para o crescimento tumoral, enquanto que *CXCR4* se apresentou diminuído, possivelmente devido ao baixo potencial metastático que o TVT apresenta. Dessa forma, conclui-se que o microambiente tumoral, assim como o sistema imune do hospedeiro, possui influência no TVT, supostamente alterando a tumorigênese e a resposta clínica do animal relacionada ao tratamento.

Palavras-Chave: câncer, microambiente tumoral, TVT, cão

FÊO, H.B. **Canine transmissible venereal tumor: gene expression related to the biological behavior and tumor microenvironment.** 2016, 125p. Doctoral dissertation (Doctorate) – School of Veterinary Medicine and Zootechnics, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

ABSTRACT

Transmissible venereal tumor (TVT) is a transmissible cancer, which spreads naturally among dogs by the allogeneic transfer of tumor cells, mainly during coitus. It is known that the tumor microenvironment directly influences tumor behavior, in addition to interacting with the host immune system. Because of the scarce studies related to cellular events involved in the tumor microenvironment, the present study aimed to quantify the expression of genes related to this microenvironment in both TVT and *in vitro* cells, correlating them with the clinical response of treated animals with vincristine. To this end, 18 dogs were treated at the Veterinary Hospital of FMVZ-UNESP, Campus de Botucatu, with naturally occurring TVT. Tumor samples were collected before chemotherapeutic treatment, cultured and submitted to cytogenetic analysis and quantification by RT-qPCR. Tumor samples with reduced chromosome numbers (59) were observed concerning the dog (78) and the prevailing cell subtype was the plasmacytoid, although cells with a lymphocyte pattern were also observed. When comparing gene expression results, the *TP53* gene was shown to be elevated in most cases, indicating a possible alteration in this gene, whereas *BCL-2*, *BCL-xL*, *BAX*, and *RASSF1* presented variables, depending on the animal analyzed. which may be due to genetic and/or epigenetic changes in TVT, in addition to the possibility of a polyclonal origin. Furthermore, in these situations, the expected apoptotic regulation of these genes by *TP53* does not appear to have occurred. In the case of the cytokines *IFN-γ* and *IL-6*, mostly, low expression was verified. In these cases, MHC expression in tumor cells was probably not occurring nor activation of immune cells to eliminate the tumor. The *P21* and *TGF-β* genes were mostly normal. *VEGF* exhibited extremely high expression, evidencing its angiogenic role for tumor growth, whereas *CXCR4* was shown to be decreased, possibly due to the low metastatic potential of TVT. Thus, it is concluded that the tumor microenvironment, as well as the host immune system, influences TVT, supposedly altering the tumorigenesis and the clinical response of the animal related to the treatment.

Keywords: cancer, tumor microenvironment, TVT, dog

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos cânceres surge como resultado de mutações cumulativas em células somáticas durante a vida de um organismo e constitui uma expansão clonal de células transformadas com o genótipo derivado do hospedeiro (STRATTON; CAMPBELL; FUTRAL, 2009). Em vertebrados os tumores não são, de modo geral, contagiosos ou transmitidos a outros indivíduos, por serem alvos do reconhecimento imunológico (CASTRO, 2015).

Para se tornar transmissível, o câncer deve adquirir competências para suportar a transmissão física de suas células cancerígenas e para escapar da ação do sistema imune do hospedeiro. Uma vez transmissível, o câncer deve adquirir configuração genômica que proporcione um longo tempo de vida sem que isso induza a morte do hospedeiro (CASTRO, 2015).

O tumor venéreo transmissível (TVT) desperta nos pesquisadores em oncologia grande interesse por diversas características, dentre elas sua origem controversa (MOZOS et al., 1996; MUKARATIRWA; GRUYS, 2003), regressão espontânea questionável (TINUCCI-COSTA, 2009), resistência à quimioterapia (BOSCOS; TONTIS; SAMARTZI, 1999), além de se prestar como um excelente modelo de investigação para neoplasia comparada (BELOV, 2012).

As células do TVT possuem a particularidade de se implantar em mucosas, quando as mesmas perdem a integridade (STOCKMANN et al., 2011), de forma que o tumor se estabelece e prolifera, podendo desenvolver inclusive metástases (GANGULY; DAS; DAS, 2013). O mecanismo pelo qual ocorre a implantação ainda é incerto, entretanto, acredita-se que a redução da defesa imunológica pode contribuir fortemente para o processo. Uma vez estabelecido, a manifestação clínica pode variar desde uma solitária formação até múltiplos lóbulos, preferencialmente na genitália externa (SANTOS et al., 2008) podendo, entretanto, ser encontrado nos seios nasais, cavidade oral, mucosa conjuntival e pele (PARK et al., 2006).

O diagnóstico do TVT é feito, a princípio, pela manifestação clínica. Posteriormente realiza-se o exame citológico, que devido a sua alta sensibilidade, promove quase sempre diagnóstico conclusivo, permitindo inclusive classificá-lo em células redondas do tipo linfocitóide, plasmocitóide ou misto (AMARAL et al., 2007), o que facilita o estabelecimento do protocolo terapêutico adequado.

Considerando-se que o câncer resulta do acúmulo de mutações somáticas selecionadas durante a evolução tumoral, os processos de mutação e de seleção natural desempenham função essencial na carcinogênese. Além disso, alterações do sistema imunológico, estado hormonal, expressão de genes e sinalização entre tecidos pode afetar a probabilidade e o momento da progressão neoplásica (FRANK; NOWAK, 2004).

A caracterização do perfil de expressão gênica em tumores tem sido uma abordagem poderosa para o delineamento das vias moleculares e processos celulares alterados nas neoplasias. O comportamento biológico dos tumores, assim como a sua resistência à terapia, são fenômenos multifatoriais e geralmente regulam importantes processos. Dentre eles, processos moleculares envolvidos com mecanismos de autonomia proliferativa, instabilidade genômica, resistência à morte celular e evasão da resposta imunológica podem auxiliar a esclarecer as vias biológicas subjacentes ao câncer.

Assim, estudos citogenéticos têm ajudado a demonstrar a natureza da maioria das neoplasias e identificar as mudanças genéticas que ocorrem nas mesmas. Dessa forma, este estudo visou avaliar as diferenças na expressão de citocinas como *IL-6*, *IFN- γ* e *TGF- β* , assim como genes supressores tumorais (*TP53*, *P21*, *RASSF1*), pró (*BAX*) e antiapoptóticos (*BCL-2*, *BCL-xL*), e fatores angiogênicos (*VEGF*, *CXCR4*) no TVT, já que esses fatores são importantes para auxiliar no monitoramento e no prognóstico do paciente.

Revisão de

Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinogênese

Carcinogênese ou oncogênese designam a patogênese de uma neoplasia, desde as alterações mais precoces no DNA, que supostamente ocorrem em uma só célula ou em um pequeno grupo delas, até a formação de um tumor que pode lesionar o organismo hospedeiro (HANSEN; CAVENEE, 1987; SILVA, 2004).

Considera-se o câncer como sendo monoclonal quando todas as células dentro do tumor podem ser rastreadas até uma única célula progenitora e/ou iniciadora. Alternativamente, a malignidade policlonal deriva da transformação concomitante de duas ou mais células geneticamente distintas, e que não fornecem nenhum indicativo de origem comum (COMERTPAY et al., 2014). Embora a origem monoclonal seja ainda a mais aceita no universo científico, estudos já sugerem que alguns tipos cancerígenos possam apresentar origem policlonal (THLIVERIS et al., 2013; GU et al., 2015).

Há pouco tempo atrás também começou a se compreender as alterações moleculares observadas nas células do paciente com câncer, de forma que elas estão relacionadas principalmente com os mecanismos que regulam a proliferação celular, a sobrevivência e a apoptose (FULDA, 2010). A proliferação celular relacionada com as neoplasias tem sido amplamente estudada por mostrar boa correlação com o comportamento biológico de tumores e adicionar informações que orientem o tratamento e o prognóstico (ALBERTS et al., 2010).

A homeostase celular é mantida pelo controle da presença de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, tais como danos ao DNA levam ao aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, induzindo apoptose (STOCKMANN et al., 2011), sendo a evasão relacionada a esse processo uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). De fato, a análise do processo de tumorigênese revela que a capacidade de resistir à morte celular pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral, envolvendo desde as células com capacidade de escapar ao controle do crescimento e da diferenciação celular, até as células lesionadas no DNA (Figura 1) (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As células tumorais necessitam ainda de um microambiente que atenda suas necessidades. A habilidade dos tumores para induzir a formação de novos vasos sanguíneos, têm sido um dos maiores focus de pesquisas em câncer há algumas décadas (FERRARA, 2002). A angiogênese é um processo complexo que envolve recrutamento de células endoteliais a partir de vasos sanguíneos preexistentes, proliferação celular, migração direcionada de células endoteliais pela matriz extracelular (MEC) e maturação e diferenciação do broto capilar (KUSEWITT, 2013), contribuindo não apenas para a viabilidade e o crescimento tumoral, mas também com a disseminação da doença, apresentando estreita relação com o prognóstico da neoplasia (FOLKMAN, 2002). Assim, a ativação de vias que favorecem a sobrevivência das células, ao invés da apoptose, sob condições estressantes, podem contribuir para a carcinogênese (FULDA, 2010).

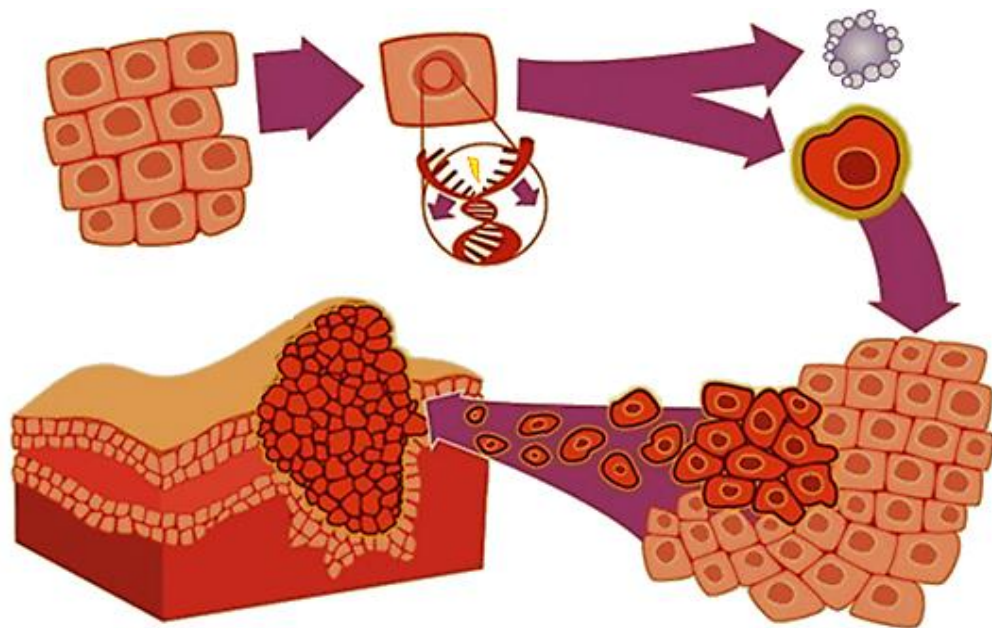


Figura 1. Carcinogênese: transformação de uma célula normal em células cancerosas. O câncer caracteriza-se como uma doença de múltiplos estágios que transforma uma célula normal em cancerosa. Células de tecidos normais crescem, se reproduzem e morrem. No entanto, durante a divisão celular o DNA pode sofrer modificações e, caso as células defeituosas não sejam devidamente reparadas ou conduzidas a apoptose, se reproduzirão desordenadamente, originando uma massa – o tumor. Essas células podem ainda se desprender do tumor e atingir outros órgãos, onde passam a crescer e substituir o tecido sadio, no processo de metástase (Adaptado de QUEIROZ, 2016).

2.1.1 Proto-oncogenes e Genes supressores tumorais

A ativação de proto-oncogenes celulares, juntamente com a inativação dos genes supressores do tumor, são as principais alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento tumoral (COSTA; MENCK, 2004; KUSEWITT, 2013).

Um proto-oncogene normalmente codifica proteínas que regulam o crescimento e a diferenciação celular (GAO; LIN; ZHANG, 2012), sendo que esses produtos se encontram envolvidos em diversas vias e incluem moléculas como os fatores de crescimento e seus receptores, reguladores do ciclo celular, proteínas de ligação do DNA, fatores de transcrição, entre outros (KUSEWITT, 2013). Devido a mutações, o proto-oncogene pode tornar-se um oncogene, o qual é capaz de induzir o crescimento tumoral (GAO; LIN; ZHANG, 2012). Os oncogenes foram inicialmente descritos como proteínas tumorais de RNA vírus, descobrindo-se mais tarde que as células normais possuíam produtos genéticos equivalentes (KUSEWITT, 2013).

Já os genes supressores do tumor foram designados, originalmente, aos genes que inibiam o crescimento celular. Hoje, a classe inclui muitos outros tipos de genes que, quando inativados, permitem a proliferação descontrolada ou o crescimento do tumor. Isso inclui genes que controlam o ciclo celular, reparos no DNA e a apoptose. Assim, mutações deletérias na função desses genes levam a progressão desregulada do ciclo celular, contribuindo para o desenvolvimento e agressão da neoplasia (FRANKS, 1990; COSTA; MENCK, 2004; KUSEWITT, 2013).

2.1.1.1 RASSF1

As proteínas da família RAS (do inglês, *Rat sarcoma*) são componentes essenciais para transmissão de sinais estimuladores de crescimento de fora da célula ao núcleo, ativando a transcrição dos genes para a progressão do ciclo celular (PYLAYEVA-GUPTA; GRABOCKA; BAR-SAGI, 2011; KUSEWITT, 2013). A ativação da RAS normalmente é de curta duração, pois possui uma GTPase intrínseca que hidrolisa GTP em GDP e a converte em sua forma inativa (KUSEWITT, 2013). Os dois melhores efetores Ras são Raf – uma serina-treonina quinase – que controla a via de MEK-ERK responsável pela ativação da proliferação celular, e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K), cuja atividade é necessária para a ativação da proteína-quinase B/Akt, que inibe a

apoptose induzida por membros da família Bcl (WEYDEN; ADAMS, 2007; LITO; ROSEN; SOLIT, 2013).

Os oncogenes *Ras* isolados de tumores humanos contêm mutações pontuais que criam uma hiperatividade nas proteínas *Ras* que não pode ser desativada até mesmo pela hidrólise do GTP ligado em GDP. Devido ao gene *Ras* ser mutado em uma ampla variedade de cânceres em humanos, permanece sendo um dos mais importantes exemplos de genes críticos para o desenvolvimento neoplásico (ALBERTS et al., 2010), além dos membros da família *RAS* e outros componentes da via de transdução serem moléculas-alvo atrativas para a intervenção terapêutica (KUSEWITT, 2013).

O gene *RASSF1* (Família do domínio de associação a *Ras* isoforma 1) foi inicialmente identificado pela interação com a proteína XPA, que atua no reparo de danos no DNA. A perda ou a expressão alterada de *RASSF1* tem sido relacionada com a patogênese de uma variedade de cânceres, sugerindo uma ação supressora para esse gene (NEGRAES, 2007; RAM et al., 2014).

RASSF1 pode ser inativado tanto por mecanismos genéticos quanto epigenéticos. A inativação transcricional desse gene foi relacionada principalmente a hipermetilação da ilha CpG de sua região promotora (NEGRAES, 2007), fato esse já descrito em pelo menos 37 tipos tumorais (BECKEDORFF, 2012), o que lhe confere papel importante na tumorigênese, no prognóstico e na detecção precoce da neoplasia.

O locus do gene *RASSF1* abrange 11.151 pb do genoma humano e é composto por oito exons, que combinados entre si, geram sete transcritos diferentes *RASSF1A-G* (BECKEDORFF, 2012). *RASSF1A* e *RASSF1C* são as isoformas mais predominantes expressas em tecidos normais, sendo *RASSF1A* a mais estudada. A isoforma *RASSF1B* se encontra expressa principalmente em células do sistema hematopoiético, enquanto *RASSF1D* e *RASSF1E* são expressas em coração e pâncreas, respectivamente (WEYDEN; ADAMS, 2007). *RASSF1F* possui sua expressão intimamente relacionada à *RASSF1A*, pois compartilham a mesma região promotora. Embora ainda não existam relatos, a expressão de *RASSF1G*, assim como *RASSF1D* e *RASSF1E*, também são susceptíveis de estarem relacionadas à expressão de *RASSF1A*, já que essas isoformas também partilham a mesma região promotora do gene (AGATHANGGELOU; COOPER; LATIF, 2005).

Com exceção das isoformas A e C, o papel biológico das outras isoformas de *RASSF1* ainda é desconhecido. A função de supressão tumoral da isoforma de *RASSF1A* ficou evidenciada em estudos mostrando que a superexpressão em linhagens tumorais

resulta em células menos invasivas, com maiores taxas apoptóticas, menores taxas proliferativas e reduzida independência quanto ao ancoramento ao substrato (DAMMANN et al., 2000; HESSON et al., 2004; DONNINGER; VOS; CLARK, 2007).

RASSF1A exerce diversas funções na célula, regulando vários processos biológicos. A proteína *RASSF1A* possui importante papel no controle do ciclo celular por meio de sua interação com Cdc 20, um regulador do ciclo celular necessário para a conclusão da mitose. Quando há a associação entre *RASSF1A* e Cdc 20, este complexo impede a ativação do complexo promotor de anáfase (CPA) e, consequentemente a progressão da mitose, resultando em menores taxas de proliferação celular (SONG et al., 2004). Por essa característica, a *RASSF1A* tem sido considerada uma nova guardiã da mitose (MATHE, 2004).

RASSF1A localiza-se também nos microtúbulos e promove estabilização dos mesmos durante as mudanças dinâmicas sofridas pelo citoesqueleto ao longo das fases do ciclo celular (BECKEDORFF, 2012). Essa estabilização ocorre por meio de interações com proteínas associadas à microtúbulos (MAPs) ou com o homólogo dessas proteínas (DALLOL et al., 2004). Superexpressão de *RASSF1A* induz a parada da mitose na metáfase com células mitóticas aberrantes, incluindo fusos monopolares ou completa falta de um fuso mitótico (LIU et al., 2003), podendo influenciar inclusive na adesão e motilidade celular (WEYDEN; ADAMS, 2007). *RASSF1A* modula ainda a apoptose, através de diversos mecanismos, dentre eles a via de morte celular extrínseca, por meio da estimulação dos receptores FAS ou TNF- α (BECKEDORFF, 2012).

Adicionalmente, *RASSF1A* regula a progressão do ciclo celular na fase G₁-S através da auto-ubiquitinação de MDM2, a qual previne a degradação da p53 numa fase precoce. Sob condições normais, os efeitos antiproliferativos de p53 são inibidos por MDM2, uma ubiquitina ligase que promove a ubiquitinação e degradação de p53 (SONG et al., 2008). A p53 possui a função de manter a integridade genômica e controlar o crescimento celular. A sua ativação ocorre em resposta ao estresse e a agentes que danificam o DNA celular, ocasionando a interrupção do ciclo celular, indução de senescência e apoptose (STOCKMANN et al., 2011).

A ativação oncogênica destas proteínas devido a mutações é ainda frequentemente detectada em vários tipos de cânceres humanos, ocorrendo em ~ 30% dos tumores (WEYDEN; ADAMS, 2007). Já a *RASSF1C* parece não ser afetada na tumorigênese, desempenhando papel apenas na ausência de *RASSF1A* (ESTRABAUD et al., 2007).

2.1.1.2 p21

Eucariotos superiores desenvolveram múltiplas formas de controle para monitorar os mecanismos celulares e responder a possíveis distúrbios ocorridos no microambiente celular. A interrupção da progressão do ciclo celular até que os erros sejam reparados e o ambiente torne-se admissível para a transmissão fiel do material genético, é uma delas (ABBAS; DUTTA, 2009).

A proteína p21, pertencente à família Cip (proteínas inibidoras de cinase), atua na regulação da transição da fase G₁-S, promovendo a interrupção da síntese de DNA e levando à parada do crescimento em fases específicas do ciclo celular (SCHNEIDER, 2007). Essa transição é particularmente importante no estudo de células cancerígenas, pois é na fase S que se dá a replicação do DNA, uma das fases onde existe maior probabilidade de ocorrer mutações genéticas provocadas por perda da integridade do genoma (TOKUMOTO et al., 2003; ABBAS; DUTTA, 2009).

A expressão da p21 pode ser regulada positivamente por um mecanismo dependente de p53, a qual induz a expressão de genes de reparo perante um DNA lesado e possui papel ativo na parada do ciclo celular; ou mecanismos independentes de p53, como a estimulação por fatores de crescimento E2F1 e MAPK (BENADIBA, 2008).

A progressão através do ciclo celular é controlada por quinases específicas – CDKs, que são ativadas pela ligação a proteínas ciclinas (ALBERTS et al., 2010). A proteína p21 apresenta importante atividade supressora por antagonizar a atividade dos complexos formados com CDK2 ou CDK4, funcionando assim como um regulador da progressão do ciclo celular (SCHNEIDER, 2007). Adicionalmente, a p21 é capaz de sequestrar o PCNA, inibindo a replicação do DNA e modulando, consequentemente, vários processos de reparo dependentes desse antígeno (ABBAS; DUTTA, 2009; CHEN et al., 2012).

Estudos sugerem ainda que sob certas condições, a p21 pode atuar de maneira contrária, promovendo proliferação celular e oncogenicidade (RONINSON, 2002). Assim, diante de tantas funções exercidas por essa proteína, não seria incomum a mesma se encontrar muitas vezes desregulada em diversos tipos de cânceres. A sua expressão, dependendo das condições e do contexto celular, sugere-se que possa atuar tanto como supressor de tumor como oncogene (ABBAS; DUTTA, 2009).

2.1.1.3 p53

Muitos genes supressores de tumor são componentes-chave do ciclo celular. Um dos genes supressores de tumor mais amplamente estudado é o *TP53*, que se encontra inativado, mais comumente por mutação, em mais da metade dos cânceres no homem (KUSEWITT, 2013). Primeiramente descrito como oncogene no final da década de 70, foi apenas referido como supressor tumoral de fato, quando Wolf e Rotter relataram, em 1984, que *Trp53* (que codifica a p53 em camundongos) foi inativado pela inserção retroviral em uma linhagem de células transformadas na leucemia murina de Abelson. Assim, a interpretação mais simples destas observações foi que a perda da p53 promove o desenvolvimento do câncer, o que implica, portanto, que sua função preservada é necessária para evitar essa enfermidade (Figura 2) (LEVINE; OREN, 2009).

TP53 codifica a proteína nuclear p53 com 393 aminoácidos e 53 kDa, capaz de se ligar a sequências específicas do DNA regulando, dessa forma, a transcrição de numerosos genes e possuindo função na manutenção da integridade genômica e no controle do crescimento celular (STOCKMANN et al., 2011). A proteína p53 tem sua função supressora de tumor regulada de forma negativa, ou seja, inativada pelo gene *Mdm2* (*Murine double minute 2*), um produto de um proto-oncogene expresso na maioria dos tumores em humanos. Alterações genéticas das células tumorais, como a superexpressão de *Mdm2*, afetam o estado funcional da p53 (BROOKS; GU, 2006).

A expressão celular e a atividade da p53 estão estritamente relacionadas. Os níveis de expressão do *TP53* em tecidos normais, em regra são extremamente baixos, embora, em resposta a múltiplos fatores que possam afetar a célula, esse quadro possa se modificar. Alguns desses fatores são: a ativação de oncogenes, hipóxia tecidual, desregulação de nucleotídeos e danos oxidativos (OZAKI; NAKAGAWARA, 2011).

Assim, a p53 é rapidamente acumulada no núcleo por modificações químicas, como fosforilação e acetilação (OZAKI; NAKAGAWARA, 2011), fato esse que leva ao aumento da transcrição de genes-alvo do p53, como p21 e o GADD45, que trabalham na interrupção do ciclo celular e no reparo do DNA, respectivamente. A meia-vida da p53 é curta (cerca de 20 minutos), sendo assim rapidamente degradada após o término do reparo no DNA. Se o reparo no DNA for insatisfatório, a p53 conduz a morte celular através da ativação da via da apoptose (KUSEWITT, 2013).

Nesse caso, a p53 estimula alvos pró-apoptóticos, como a BAX (*Bcl-2 associated X protein*), PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) e NOXA (gene pró-apoptótico) que, em conjunto, contribuem para a desestabilização do potencial de membrana mitocondrial (CZABOTAR et al., 2014). Além dessa estimulação de genes pró-apoptóticos, a proteína p53 pode ainda induzir apoptose se ligando e inativando Bcl-2 (proteína antiapoptótica) na superfície da mitocôndria (ALBERTS et al., 2010).

No entanto, a p53 não só induz apoptose, mas também participa das fases do ciclo celular, como por exemplo na fase G₁-S através da transativação da p21, e na fase G₂-M bloqueando a entrada da célula na fase de mitose (BASU; HALDAR, 1998). Esse mecanismo duplo da p53, tanto de proteção quanto de indução da apoptose, indicam que o gene, quando alterado pode atuar como promotor do tumor, pois o *TP53* pode levar a maior sobrevivência de células com alguma lesão e incrementar a possibilidade de transformação maligna (SUZUKI; MATSUBARA, 2011).

Mutações no gene *TP53* já foram descritas em diferentes neoplasias caninas (STOCKMANN et al., 2011). Em 2002, Choi e Kim descreveram os primeiros relatos de mutação do gene em tumores venéreos transmissíveis (TVTs). Sánchez-Servín et al. (2009) corroboraram posteriormente com esses achados, porém, apesar das evidências de mutação do gene no tumor, se desconhece se tal particularidade provoca alguma mudança na função da proteína. Moro et al. (2010) identificaram maior quantidade de células que expressavam p53 em TVTs transplantados em fase de regressão, quando comparado com TVT de ocorrência natural, sugerindo a existência de anormalidades funcionais no gene *TP53* e seus transcritos.

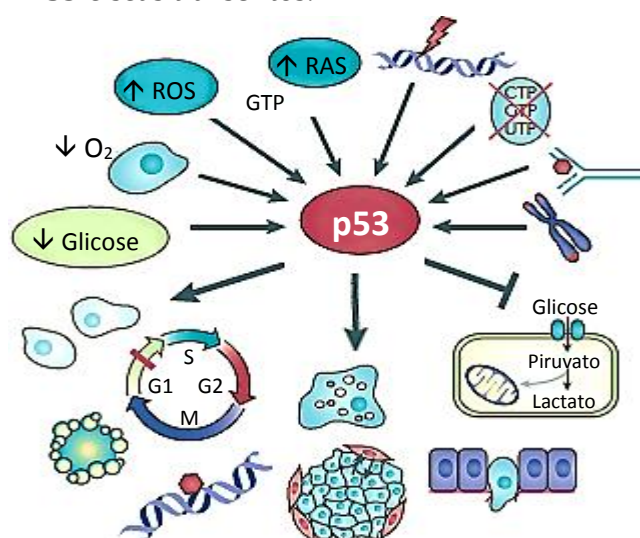


Figura 2. Mecanismos envolvendo a p53 na supressão tumoral. Diversos eventos podem ativar a p53 e promover respostas que resultam na supressão tumoral, tais como: sinais hiperproliferativos (↑RAS), danos no DNA, esgotamento de ribonucleotídeos, estresse oxidativo (↑ROS) e replicativo, disfunção telomérica, hipóxia e privação de nutrientes (↓Glicose). Após sua ativação, a p53 pode conduzir ainda a célula para os processos de senescência, parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose, além da reprogramação metabólica através da transformação de glicose em lactato, autofagia, comunicação com o microambiente tumoral, invasão e metástase (Adaptado de BIEGING; MELLO; ATTARDI, 2014).

2.1.2 Apoptose

Os processos de proliferação, diferenciação e morte-celular por apoptose são fundamentais para o desenvolvimento de doenças de caráter neoplásico (KUSEWITT, 2013). A apoptose é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Uma das marcas de cânceres humanos é a resistência intrínseca ou adquirida a apoptose. Evasão da apoptose pode ser parte de uma resposta celular para assegurar a sobrevivência da célula após exposição a estímulos de estresse (FULDA, 2010).

A resistência a apoptose pode contribuir para carcinogênese, progressão do tumor, e também resistência ao tratamento, uma vez que a maioria das terapias anticâncer atuais, incluindo a quimioterapia – bem como radioterapia e imunoterapia – atuam principalmente por ativação de processos de morte celular, envolvendo a apoptose em células cancerosas (FULDA; DEBATIN, 2006; FULDA, 2010).

A apoptose é consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados. Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, as proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-xL e pró-apoptóticas, tais como Bax, Bid e Bak, além das caspases. Estímulos, como danos ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz a apoptose (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é desencadeada pela interação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana, denominados receptores de morte celular; enquanto que a via intrínseca se inicia por estresse intracelular ou extracelular como, por exemplo, a ativação de oncogenes. Ambas as vias promovem recrutamento e ativação de caspases, desencadeando consequentemente, a apoptose (MATHIASSEN; JÄÄTTELÄ, 2002; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

2.1.2.1 Família Bcl-2

A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e inibidoras da morte celular por apoptose, participando ativamente da sua regulação. Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-xL inibem a apoptose, pois impedem a liberação de citocromo c, sendo denominados de reguladores antiapoptóticos (CORY; ADAMS, 2002; STOCKMANN et al., 2011). A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas (STOCKMANN et al., 2011). Estímulos, como danos ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas, sendo que esse desequilíbrio induz a apoptose. Após um estímulo de morte, a Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria pelo sequestro de Bax, ou por competir por sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial (MURPHY et al., 2000).

As proteínas antiapoptóticas representam alvos atraentes para o tratamento do câncer. Bcl-2 está presente em abundância em diversos tipos de cânceres humanos, dentre eles carcinomas de pulmão (HIGASHIYAMA et al., 1995), leucemias linfóides crônicas (SCHENA et al., 1992), mieloma múltiplo (HARADA et al., 1998), melanoma (LEITER et al., 2000), cânceres de próstata (KESHGEGIAN; JOHNSTON; CNAAN, 1998), de ovário (MANO et al., 1999), cervical (RAJKUMAR et al., 1998), de bexiga (YE et al., 1998), pancreático (FRIESS et al., 1998), entre outros.

Para a maioria dos cânceres, a superexpressão de *BCL-2* ou *BCL-xL* correlaciona-se tanto com baixa sobrevida, como com a progressão da doença. A superexpressão de *BCL-2* e *BCL-xL* está associada à resistência a vários agentes citotóxicos, assim como com a radioterapia, fazendo das proteínas antiapoptóticas alvos óbvios de drogas anticancerígenas. Quando comparada com um painel de 122 agentes quimioterápicos, a resistência de células cancerígenas está fortemente correlacionada com os níveis de expressão de *BCL-xL* (FESIK, 2005), no entanto, a perda de alguns dos membros pró-apoptóticos, como o Bax, também acelera o desenvolvimento do tumor (CZABOTAR et al., 2014).

Na atualidade, os pesquisadores baseiam-se nesses e outros achados para propor estratégias terapêuticas em diversos tipos de tumores. No caso de proteínas

pró-apoptóticas, recentes progressos na compreensão da forma de ativação ou inibição de Bax/Bak, podem facilitar o desenvolvimento de compostos que regulem a sua atividade, promovendo a sua ativação para o tratamento de câncer ou inibindo em caso de aumento na taxa de apoptose (CZABOTAR et al., 2014).

Por outro lado, superexpressão também se tem relacionado com fenótipos de baixa malignidade e prognóstico favorável (STOCKMANN et al., 2011). Em camundongos transgênicos, a superexpressão de *BCL-2* promoveu baixa incidência de linfomas, no entanto, a perda de alguns membros pró-apoptóticos como o Bax, também acelera o desenvolvimento do tumor (CZABOTAR et al., 2014). De fato, mutações em *BAX* desempenham papel importante em cânceres de estômago, endométrio e colorretal (OUYANG et al., 1998).

2.1.3 Angiogênese

O crescimento contínuo de tumores sólidos é absolutamente dependente de suprimento sanguíneo adequado para fornecer oxigênio e nutrientes às células tumorais. Sem o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos – *angiogênese* – os tumores se limitariam ao diâmetro máximo de 1-2 mm (KUSEWITT, 2013).

A neovascularização envolve uma série de eventos que se iniciam com o recrutamento de células progenitoras – inclusive células endoteliais – da medula óssea para sítios de revascularização, além de plaquetas, neutrófilos, monócitos e fibroblastos (DIAS, 2012). A principal consequência dessa neoformação vascular é o aumento do ritmo proliferativo, significando uma importante etapa no crescimento do tumor (PINHO, 2005).

Em algum momento do desenvolvimento do tumor, ocorre estimulação angiogênica que confere às células tumorais habilidade de induzir e sustentar uma nova vasculatura tumoral. A angiogênese é controlada pelo equilíbrio entre uma variedade de fatores estimulantes e inibidores da angiogênese. Os tumores induzem a angiogênese através da produção e liberação de fatores angiogênicos, como o VEGF. O VEGF está entre os fatores pró-angiogênicos mais potentes produzidos pelos tumores. Como os tumores sólidos são absolutamente dependentes de adequado suprimento sanguíneo, estão sendo desenvolvidas estratégias terapêuticas para inibir o processo de angiogênese (KUSEWITT, 2013).

2.1.3.1 VEGF

Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína de sinalização, cuja função é estimular a angiogênese (PINHO, 2005). Dentre as células capazes de produzir VEGF estão os macrófagos, linfócitos T, células da musculatura lisa, esplenócitos, queratinócitos, astrócitos, osteoclastos, além das células tumorais (ROMAGNOLI, 2007). O VEGF atua como mitógeno, estimulando quando necessário a entrada de uma célula no ciclo celular, enquanto que sua ausência ou inibição, promoverá diminuição na atividade proliferativa (PINHO, 2005).

Além do processo de angiogênese, o VEGF contribui para a sinalização de aspectos fundamentais na tumorigênese, incluindo o papel das células-tronco no câncer e a iniciação do tumor. O VEGF pode influenciar ainda, na função de células do sistema imune que se encontram presentes no microambiente do tumor, comprometendo consequentemente, a resposta do hospedeiro aos tumores. Um exemplo disso são os linfócitos Treg, através do fator de transcrição FOXP3⁺, que suprimem a resposta imune antitumoral e são mediados por VEGF. A remoção do receptor nesta população de células T aumenta a ativação de linfócitos T citotóxicos (LTC), reduzindo o crescimento do tumor. Além disso, receptores de VEGF podem regular a função de fibroblastos no estroma do tumor (GOEL; MERCURIO, 2013).

O VEGF medeia numerosas vias de sobrevivência nas células endoteliais, incluindo indução de ativação de Bcl-2, survivina e proteínas inibidoras da apoptose (IAPs). Propõe-se que perda da sinalização de VEGF induz as células endoteliais a promoverem apoptose (ELLIS; HICKLIN, 2008). Usando uma expressão induzida de VEGF em células de glioma, Benjamin e Keshet (1997) demonstraram que o VEGF é exigido para a sobrevivência de células endoteliais em tumores xenográficos.

Sinais autócrinos de VEGF têm sido importantes ainda na homeostase de células endoteliais. Vários trabalhos utilizando terapias direcionadas à VEGF em modelos murinos demonstraram que a inibição da sinalização de VEGF pode levar a célula tumoral endotelial a apoptose, no entanto raramente tais terapias levaram a regressão de tumores já estabelecidos (BRUNS et al., 2000; LAIRD et al., 2002; MENDEL et al., 2003).

Evidências sugerem também que o VEGF pode induzir a secreção da quimiocina CXCL12 e do seu receptor CXCR4 em torno do endotélio e dos vasos sanguíneos, agindo em conjunto com esta molécula (GRUNEWALD et al., 2006). CXCL12

desempenha importante função na angiogênese através do recrutamento de células progenitoras endoteliais (EPCs) a partir da medula óssea (ZHENG et al., 2007). Do ponto de vista terapêutico, Sun et al. (2013) evidenciaram que a inibição da sinalização de CXCR4 diminui a produção de VEGFA e, conseqüentemente, o processo de angiogênese.

O processo de angiogênese também pode ser estimulado por meio da sinalização através do fator de crescimento tumoral (TGF- β), o qual pode induzir o VEGF tanto em células epiteliais como em fibroblastos. Em adição, o TGF- β pode induzir a expressão, secreção e ativação de MMPs (metaloproteinases de matriz), assim como diminuir a regulação de TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases) tanto no tumor como nas células endoteliais, estimulando migração e invasão dessas células, resultando em angiogênese tumoral (IKUSHIMA; MIYAZONO, 2010).

De fato, o aumento da expressão do VEGF está associado com a progressão tumoral e um pior prognóstico em diversos tumores, tais como carcinomas colorretal (KABBINAVAR et al., 2003), gastrointestinal (BROWN et al., 1993), de mama (SCHNEIDER; MILLER, 2005), de próstata, de cabeça e pescoço (EISMA; SPIRO; KREUTZER, 1997; BERKMAN et al., 1993), renal (RINI; SMALL, 2005), de pulmão (STEFANOU et al., 2004; ERIKSSON et al., 2006), de ovários (DUNCAN et al., 2008) e melanoma (UGUREL et al., 2001) (CAPP et al., 2009).

Estudos sugerem que a chave final para a super-regulação de VEGF no câncer é o fator 1α induzido por hipóxia (HIF1- α), um fator de transcrição que controla a homeostase de oxigênio no ambiente celular (FERRARA, 2002; YU; JOVE, 2004), pois sua superexpressão induz diretamente a expressão de VEGF (BOUDREAU; MYERS, 2003). Sabe-se que a hipóxia intratumoral, assim como a ativação da via transdutora de sinais STAT3 podem ativar HIF1 (YU; JOVE, 2004), permitindo que as células se adaptem em condições de baixa oxigenação. Assim, um bloqueio na transcrição de VEGF conseqüentemente promoveria diminuição de HIF1, gerando um efeito antiangiogênico importante.

2.1.3.2 CXCR4 e CXCL12

As quimiocinas integram uma família de pequenas proteínas (8 a 10 kDa) que controlam a migração celular, podendo regular inclusive o tráfego de células imunes. Essas moléculas são classificadas de acordo com o espaçamento de seus resíduos de cisteína, de forma que as quimiocinas CXC têm dois resíduos de cisteína separados por outro aminoácido (TIZARD, 2009). Embora por vezes produzidas por células epiteliais – particularmente na resposta inflamatória ou transformando estímulos – quimiocinas são mais frequentemente secretadas por leucócitos, ou então por células provenientes de linhagens estromais, tais como as células endoteliais, fibroblastos, osteoblastos e condrócitos (EPSTEIN, 2004).

Sob circunstâncias normais, as quimiocinas são importantes na função de células do sistema imune, no entanto no processo cancerígeno, regulam a invasão, angiogênese, migração celular e metástases. A quimiocina CXCL12, também conhecida como SDF-1 α (fator 1 α derivado de célula estromal) e seu receptor, CXCR4, juntos medeiam a proliferação e a migração de células tumorais, aumentando assim a angiogênese associada ao tumor.

CXCR4 é um receptor transmembrana acoplado à proteína G e sua ativação conduz cascatas de sinalização intracelular, cujos alvos incluem VEGFA (fator de crescimento endotelial vascular A) e MMP1 (metaloproteinase de matriz 1) (SUN et al., 2013). É amplamente expresso em membranas de neutrófilos, linfócitos e monócitos, e menos frequentemente em células epiteliais; é também conhecido como o co-receptor de células T para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (EPSTEIN, 2004). O aumento da expressão de receptores de quimiocinas tem sido investigado em diversos tipos de cânceres, principalmente nos carcinomas (GELMINI et al., 2009; PAN et al., 2006; DUNN et al., 2009), sendo que o CXCR4 é o receptor mais comumente expresso em tumores (MÜLLER et al., 2001). Adicionalmente, CXCR4 e CXCL12 têm sido implicados em processos de metástases em diversos tipos cancerígenos (CHEN et al., 2007).

A hipóxia é conhecida por ser um potente estímulo para a angiogênese em tumores (HITCHON et al., 2002). A habilidade da hipóxia tecidual de estimular CXCR4 e CXCL12 proporciona explicação para a resistência dos tumores isquêmicos a apoptose, fato talvez ligado a neovascularização.

Consistente com isto, a citocina angiogênica VEGF estimula CXCR4 nas células tumorais, promovendo invasão (EPSTEIN, 2004), enquanto que o gene antiangiogênico VHL (supressor tumoral de von Hippel-Lindau) suprime a expressão de CXCR4 (STALLER et al., 2003). Hitchon et al. (2002) afirmaram que condições de hipóxia no microambiente induz a produção de VEGF e CXCL12, sendo que ambos são importantes mediadores da angiogênese, além de CXCL12 também ser importante no recrutamento de linfócitos (Figura 3).

Assim, as quimiocinas representam uma grande família de moléculas que controlam a migração celular e participam no tráfego de células imunes. CXCL12 além de ser essencial na organização do sistema imune, possui também função como co-receptor para a entrada do HIV no interior dos linfócitos T auxiliares (Th) (TSUCHIDA; KAGI; TAKAHASHI, 2007). Da mesma forma que CXCL12, CXCL7 possui papel tanto na modulação da resposta imunológica como na migração de células cancerígenas, sendo que sua superexpressão parece estar associada com a fase de progressão do TVT (CHIANG et al., 2012).

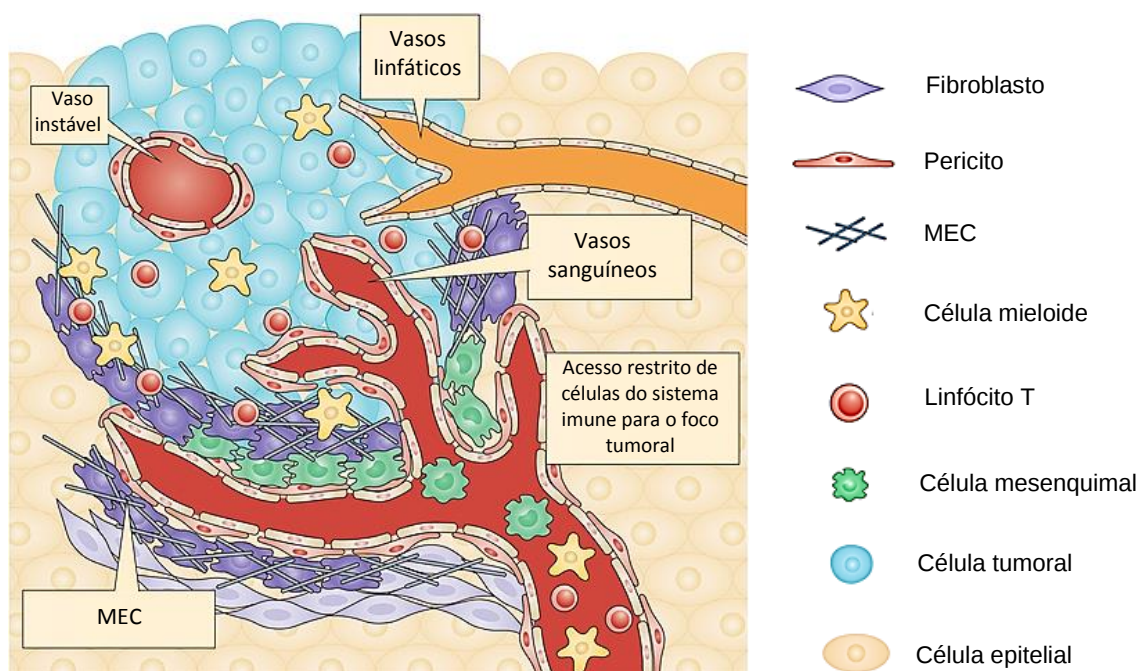


Figura 3. Microambiente tumoral. As células tumorais são imprescindíveis para a iniciação e progressão neoplásica, mas são incapazes de fazê-la isoladamente havendo, portanto, expressiva interação com o ambiente com a qual essa neoplasia convive. No microambiente tumoral observa-se presença de fibroblastos, leucócitos inflamatórios, células endoteliais do sangue e dos vasos linfáticos e matriz extracelular (MEC). Estas células, juntamente com a matriz extracelular, são capazes de prover as principais características para o desenvolvimento do câncer, como escape da vigilância imunológica, ativação da angiogênese, invasão e metástase, além de dar suporte à resistência terapêutica (Adaptado de TURLEY; CREMASCO; ASTARITA, 2015).

2.2 Tumor Venéreo Transmissível

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma neoplasia contagiosa e sexualmente transmissível. Em condições naturais, acomete somente caninos (*Canis familiaris*) (ROGERS, 1997), entretanto já foi relatado seu transplante experimental em espécies filogeneticamente relacionadas, tais como raposas, chacais e coiotes (COCKRILL; BEASLEY, 1979).

Em 1820 o TVT foi reportado pela primeira vez por Hüzzard e posteriormente, nos primeiros anos do século XX, Sticker se dedicou a investigar extensivamente o tumor, descrevendo-o detalhadamente e designando-o como sarcoma de Sticker (STOCKMANN et al., 2011). O TVT também já foi chamado de sarcoma infeccioso, linfossarcoma infeccioso, granuloma venéreo e condiloma canino, o que reflete a incerteza quanto à sua origem histológica (COHEN, 1985).

O tumor vem estimulando o interesse de cientistas desde que Novinsky conseguiu em 1876, sucesso no transplante experimental, tornando-se um ponto de partida para o estudo da oncologia (COHEN, 1985). Essa neoplasia corresponde a mais antiga linhagem de células malignas reconhecida, acreditando-se que evoluíram em lobos há 11.000 anos e desde então têm sido transmitidas entre as espécies caninas durante o coito, lambeduras, mordeduras e pelo hábito de farejar áreas já afetadas pelo tumor (STRAKOVA; MURCHISON, 2015).

O TVT é transmitido pela implantação de células tumorais viáveis nas mucosas, especialmente se existem abrasões ou perda da integridade da superfície (COHEN, 1985). O mecanismo de transplantação ocorre quando células tumorais intactas do hospedeiro perdem a capacidade de expressar moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, permitindo a transposição da barreira tecidual em um animal saudável por meio do contato entre a pele e/ou mucosa lesionadas (LIU et al., 2008a; STOCKMANN et al., 2011).

As características do coito dos cães permitem contato prolongado e formação de escoriações na mucosa genital, tornando a cópula um eficiente modo de transmissão (COHEN, 1985). Além do contato genital, o TVT também pode ser transmitido por hábitos sociais, como farejar e lamber, o que explica os casos primários extragenitais nas mucosas nasal, oral e conjuntival (PARK et al., 2006; STRAKOVA; MURCHISON, 2014).

A infectividade do TVT sugere causa viral, porém a inoculação de filtrados livres de células não produz crescimento tumoral, o que torna essa metodologia questionável (COHEN, 1985), sendo que nenhuma evidência reproduzível de oncogene viral foi demonstrada (ROGERS, 1997). De acordo com Albanese et al. (2002) e Catone et al. (2003), há células de TVT parasitadas por formas amastigotas de *Leishmania*, do mesmo modo que ocorre com macrófagos, considerando esta ocorrência altamente sugestiva de uma origem histiocítica para a neoplasia.

Estudos citogenéticos sustentam a teoria da transmissão por meio de transplante de células, sendo que o cariótipo do cão é de 78 cromossomos, dos quais 76 são acrocêntricos e um par sexual metacêntrico; já as células de TVT isoladas de animais de diferentes regiões geográficas possuem número de cromossomos ao redor de 58-59, sendo 13-17 metacêntricos e 42-46 acrocêntricos (LORIMIER; FAN, 2007). No entanto, a quantidade de DNA e o número de braços cromossômicos das células de TVT são equivalentes aos das células caninas normais (COHEN, 1978).

Aberrações cromossômicas constantes e muito específicas, como a identificação da inserção do elemento LINE-1 no oncogene *c-myc* no genoma do TVT, estão presentes em tumores de vários locais geográficos (CHOI; KIM, 2002; LIAO et al., 2003), de forma que esse rearranjo no genoma não foi identificado em nenhum outro tecido canino, podendo assim ser utilizado como evidência para o diagnóstico do TVT (LIAO et al., 2003; MURGIA et al., 2006).

Diversidades genéticas em algumas regiões do seu genoma também já foram constatadas (MURGIA et al., 2006; MURCHISON et al., 2014), como a identificação de uma linhagem haplóide e uma diplóide no locus DQA1 (MURGIA et al., 2006), além de mutações no gene *TP53*, resultando na mudança de aminoácidos (Phe-Ser) (CHOI; KIM, 2002). Vázquez-Mota et al. (2008) concluíram que esta mutação não participou da origem do tumor, sendo portanto, adquirida em uma fase posterior. Murchison et al. (2014) identificaram ainda aproximadamente 1,7 milhões de variantes somáticas compartilhadas entre tumores da Austrália e do Brasil, presumindo-se que essas variantes surgiram durante a transformação maligna inicial, ou durante os anos de transmissão do tumor (PARKER; OSTRANDER, 2014).

2.2.1 Características Morfológicas

O TVT tem sido definido como um tumor indiferenciado de células redondas, possivelmente de origem reticuloendotelial (COHEN, 1985). Entretanto o tipo celular exato de origem do TVT permanece ainda desconhecido. Estudos com técnicas de imunohistoquímica têm apontado para origem mesenquimal e/ou histiocítica (MOZOS et al., 1996; TINUCCI-COSTA, 1999).

Na avaliação citológica do tumor observou-se presença de células redondas ou ovóides com núcleo redondo de tamanho variável e cromatina granular apresentando um ou dois nucléolos proeminentes, além de anisocariose, hipercromasia nuclear e macrocariose (ERÜNAL-MARAL; FINDIK; ASLAN, 2000). No citoplasma há vacúolos claros distintos circundados por uma membrana celular evidente (ROGERS, 1997). Considerando a ausência ou presença de vacúolos citoplasmáticos, o tamanho, a forma celular e a razão núcleo:citoplasma, os TVTs podem ser classificados citologicamente em três grupos denominados plasmocitóide, linfocitóide e misto (AMARAL et al., 2007; GASPAR et al., 2010).

As células do grupo linfocitóide são pequenas e apresentam contorno regular com núcleo redondo, o qual possui cromatina grosseira e presença de um ou dois nucléolos. O citoplasma é escasso e finamente granular, com vacúolos localizados na periferia celular. As células do grupo plasmocitóide são volumosas e exibem contorno irregular, com núcleo excêntrico e citoplasma abundante. A forma mista mostra-se uma mistura entre os dois tipos celulares, não ultrapassando 59% do total (AMARAL et al., 2007).

Adicionalmente, observa-se ainda figuras de mitose com certa frequência, podendo ser típicas ou atípicas, sendo estas indicativas de proliferação celular tumoral (AMARAL et al., 2004). Figuras de apoptose, também podem ser observadas e se apresentam em maior quantidade no TVT em fase de regressão (SANTOS et al., 2005). Células inflamatórias como linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos são observadas independente da fase de evolução da neoplasia (BOSCOS; TONTIS; SAMARTZI, 1999; DAS; DAS, 2000; SANTOS et al., 2005).

Varaschin et al. (2001) registraram que TVTs mais agressivos apresentam citoplasma abundante. De acordo com Amaral (2005), essa morfologia corresponde ao TVT plasmocitóide que se mostrou mais agressivo que a forma linfocitóide ou mista, estando possivelmente associada a menor quantidade de quebras de DNA e, conseqüentemente, a maior grau de malignidade.

Em análises de microscopia eletrônica de transmissão, Amaral (2005) observou ainda que as células do subtipo plasmocitóide apresentavam-se com maior quantidade de mitocôndrias (e estas eram igualmente maiores) que aquela observada nas células linfocitóides. Assim, acredita-se que esta neoplasia apresenta diferentes linhagens de células com variados padrões de agressividade, sendo que a avaliação citológica é considerada o método de escolha para o diagnóstico de suspeitas de TVT. A citologia consiste em uma técnica simples e minimamente invasiva, além de ser realizada com rapidez e baixo custo, produzindo menos distorção da morfologia celular. Sua eficácia para o diagnóstico de neoplasias ou lesões inflamatórias é de 90% (ROCHA, 1998).

2.2.2 Comportamento Biológico

A presença do TVT foi assinalada em todos os continentes, com maior prevalência em grandes cidades de clima tropical e subtropical (ROGERS et al., 1997). A doença é observada principalmente no sul dos Estados Unidos, América Central e América do Sul, Sudeste da Europa e da França entre outros (DAS; DAS, 2000), com maior incidência na primavera e no verão, correspondendo a 57,9% dos casos relatados durante o ano (GANDOTRA; CHAUHAN; SHARMA, 1993).

Embora a maioria dos estudos sobre TVT de ocorrência natural não indique predisposição sexual (PARK et al., 2006), Sousa et al. (2000) reportaram maior prevalência entre fêmeas, enquanto Varaschin et al. (2001) relataram maior prevalência entre machos. A doença acomete principalmente cães sexualmente ativos (DAS; DAS, 2000) e sem raça definida (FLORES et al., 1993). Esse fato reflete uma maior população de cães mestiços (SILVA et al., 2007), um baixo controle de cruzamentos e fácil acesso dos animais acometidos às ruas (SOBRAL; COSTA; CAMACHO, 1998), permitindo promiscuidade entre os mesmos (VARASCHIN et al., 2001; SILVA et al., 2007; STRAKOVA; MURCHISON, 2014).

O TVT envolve a genitália externa de cães de ambos os sexos e diversas raças, encontrando-se com maior frequência na vagina (53% dos casos), vulva (33%) e região extragenital (14%) nas fêmeas. Nos machos, ocorre quase que na totalidade em cães não orquiectomizados, localizando-se principalmente no prepúcio e pênis (56%) e em região extragenital (14%) (SOUSA et al., 2000).

O tumor se inicia sob a forma de um nódulo abaixo da mucosa genital, com rompimentos progressivos pela mucosa suprajacente (RIBEIRO; ZAPPA, 2008).

De acordo com o seu desenvolvimento, observa-se um tecido nodular, hemorrágico e friável, pouco demarcado, o qual frequentemente apresenta ulcerações. Essa neoplasia pode se apresentar de forma solitária ou múltipla, exibindo aspecto de “couve-flor” ou de placas (BIRCHARD; SHERDING, 1998; SANTOS et al., 2008), com presença de secreção serosanguinolenta e possível infecção bacteriana secundária (ROGERS, 1997), de forma que seu tamanho pode variar de três a doze centímetros de diâmetro (PARK et al., 2006).

Segundo MacEwen (2001), TVTs de ocorrência natural promovem metástases em até 17% dos casos apresentando, dessa forma, potencial metastático baixo, apesar de se caracterizar como uma neoplasia maligna (FLORENTINO et al. 2007). Podem ocorrer principalmente em filhotes e em cães com supressão do sistema imunológico, sendo capazes de atingir praticamente todos os órgãos, incluindo os gânglios linfáticos superficiais e profundos das cavidades abdominal e torácica, subcutâneo, fígado, baço, rins, pulmões e mediastino (FERREIRA et al., 2000; PARK et al., 2006; GASPAR et al., 2010). Miller, Albert e Boosinger (1990) descreveram ainda metástases de TVT no cérebro, meninges e pálpebras, sendo que neoplasias extragenitais são bem circunscritas e podem medir de dois a cinco centímetros (DAS; DAS, 2000).

A regressão espontânea é bem documentada em casos de TVT experimental, mas o mesmo não é observado como rotina nos atendimentos clínicos reportados (ROGERS, 1997). O tumor regride espontaneamente em animais saudáveis, sendo que a regressão está associada a infiltração de linfócitos e plasmócitos, assim como à necrose (PÉREZ; DAY; MOZOS, 1998) e apoptose (SANTOS et al., 2005). Embora Higgins (1966), tenha reportado regressão espontânea do tumor, numerosos estudos clínicos não têm registrado o mesmo fato (ROGERS, 1997). Adicionalmente, a presença crônica de tumores por até quatro anos, se opõe a essa teoria (BOSCOS; TONTIS; SAMARTZI, 1999).

2.2.3 Tratamento

Dentre as várias modalidades de tratamento, como radioterapia, cirurgia e/ou criocirurgia, a quimioterapia é aceita como a mais efetiva para o TVT (DABUS et al., 2008; ÖZALP et al., 2012). O tratamento com o quimioterápico sulfato de vincristina (inibidor da mitose) é eficaz e o de eleição, porém, em alguns casos o tumor não responde como esperado e, nesses casos, outros quimioterápicos como doxorrubicina,

que interfere na síntese de DNA, e metotrexato (antimetabólico), são indicados (BRANDÃO et al., 2002; FLORENTINO et al., 2007)

Resistência à quimioterapia é um grande obstáculo no tratamento de pacientes com câncer, sendo este um fenômeno multifatorial conferido por mecanismos celulares relacionados principalmente com defeitos na regulação da apoptose, alterações em sistemas de reparo do DNA e ativação ou superexpressão de moléculas, como a glicoproteína-p (P-gp), capazes de exportar os quimioterápicos para fora da célula ou outros compartimentos celulares. Muitos tumores expressam grandes quantidades de P-gp, o que explicaria sua resistência intrínseca a quimioterápicos (GASPAR et al., 2010). De fato, expressão aumentada de *MDR-1* – gene que codifica a P-gp – já foi observado em células do TVT *in vitro*, após tratamento com vincristina (FLÓREZ et al., 2016).

A quimioterapia com sulfato de vincristina como agente único, em aplicações semanais, é o protocolo mais efetivo para obtenção da completa recidiva do TVT, necessitando de quatro a oito aplicações intravenosas (DABUS et al., 2008). O tratamento pode apresentar efeitos colaterais como alopecia, atraso no crescimento dos pêlos, úlcera cutânea, vômitos, diarreia, constipação, insuficiência renal, reações de hipersensibilidade, toxicidade cardíaca e neurotoxicidade, porém quando o mesmo é realizado corretamente, o prognóstico é bom em 90% dos casos (FLORENTINO et al., 2007).

2.3 Sistema imune e o TVT

O sistema imune tem um importante papel na prevenção, controle e combate do desenvolvimento tumoral, sendo capaz de identificar ameaças à homeostase orgânica, reagindo de forma a eliminar, neutralizar ou tolerar ações danosas. A complexidade das interações entre as células tumorais e o sistema imune do hospedeiro envolve diversas linhagens celulares e mediadores. Ademais, respostas imunológicas podem se comportar de maneiras diferentes em cada indivíduo (MATIAS, 2010).

Acredita-se que o processo de eliminação do tumor compreende tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida, formando um sistema integrado de defesas do hospedeiro contra tumores (MATIAS, 2010). O desenvolvimento do TVT representa o êxito da neoplasia em se sobrepôr ao sistema imune do hospedeiro.

A transferência tumoral só é possível entre animais que compartilham o mesmo MHC ou quando há comprometimento da imunidade, pois as células de TVT induzem resposta imune protetora em receptores saudáveis (MURGIA et al., 2006). A transplantação ocorre quando células tumorais intactas perdem a capacidade de expressar moléculas MHC de classe I e II, permitindo a transposição da barreira tecidual em um animal saudável por meio do contato entre a pele e/ou mucosa lesionadas (LIU et al., 2008a; STOCKMANN et al., 2011).

Filhotes nascidos de cadelas que foram expostas ao TVT são menos susceptíveis a contrair a neoplasia. Em animais imunocomprometidos e que foram infectados experimentalmente por células viáveis de TVT, houve progressão da doença e metástases, porém aqueles que se recuperaram rapidamente adquiriram imunidade contra implantações subsequentes (MUKARATIRWA; GRUYS, 2003; STOCKMANN et al., 2011). Em animais saudáveis o TVT regride espontaneamente, sendo que a regressão está associada à infiltração de linfócitos e plasmócitos, assim como a necrose (PÉREZ; DAY; MOZOS, 1998) e apoptose (SANTOS et al., 2005).

Na fase de regressão inicial, ocorre a infiltração do tumor por linfócitos (TILs), que estão difusamente distribuídos ou associados ao estroma conjuntivo (LIAO et al., 2003; MUKARATIRWA et al., 2006), enquanto que a fase final de regressão apresenta colapso do tecido neoplásico e presença frequente de figuras apoptóticas (MUKARATIRWA et al., 2006).

A infiltração de leucócitos no TVT foi assinalada pela primeira vez por Wade em 1908 e desde então muitos relatos se seguiram. Sugere-se que a infiltração leucocitária no TVT seja uma reação de rejeição do hospedeiro ao tumor (TINUCCI-COSTA, 2009). Segundo Pérez, Day e Mozos (1998), tanto os linfócitos T, como macrófagos e plasmócitos produtores de anticorpos IgG, IgG2 e IgG4, participam na resposta imune eficaz contra o TVT, confirmando que a modulação do crescimento do tumor está relacionada com a resposta imune do hospedeiro.

Anticorpos direcionados contra os antígenos tumorais do TVT já foram detectados no soro de animais portadores (POWERS, 1968; COHEN, 1972; EPSTEIN; BENNETT, 1974). Adicionalmente, esses anticorpos já foram detectados circulando em complexos com os antígenos tumorais solúveis, assim como no revestimento da superfície das células tumorais do TVT (COHEN, 1972; EPSTEIN; BENNETT, 1974; PALKER; YANG, 1985). No entanto, apesar da provável importância dos anticorpos

em controlar o curso do TVT, os seus alvos (antígenos tumorais) ainda não foram identificados em TVTs de ocorrência espontânea (CASTRO, 2015).

Liao et al. (2003) demonstraram que a proporção de linfócitos B do sangue periférico diminui com o crescimento do TVT, sendo sua destruição causada por proteínas citotóxicas liberadas por células tumorais, que provocam apoptose desses linfócitos na fase de progressão neoplásica. Da mesma maneira, o TVT produz substâncias que inibem a diferenciação de células dendríticas (DC), sendo estas substâncias citotóxicas para esse tipo celular (LIU et al., 2008a).

Hisao et al. (2008) comprovaram que as células de TVT produzem ainda fator de crescimento tumoral- β 1 (TGF β 1) que inibe a atividade das células *natural killer* (NK). O efeito supressor do TGF β 1 na atividade das células NK pode ser equilibrado pelo efeito da interleucina-6 (IL-6) secretada pelos linfócitos tumorais. A IL-6 em sinergismo com interferon- γ (IFN- γ) pode induzir a expressão de MHC *in vitro* pelas células do TVT (HSIAO et al., 2008). Já *in vivo*, a IL-6 pode induzir a expressão de MHC em TVT pela presença de IL-15 (CHOU et al., 2009).

Na fase de progressão, o TVT suprime a secreção de IL-6 impedindo, dessa forma, o reconhecimento imunológico regulado pelo MHC classe I e II e pelas células NK. Quando o nível de IL-6 secretado por linfócitos infiltrantes do tumor atinge um limiar, inicia-se sua atividade junto com IFN- γ , permitindo a infiltração de linfócitos na neoplasia, ativando a expressão do MHC classe I e II nas células de TVT, dando início a fase de regressão (STOCKMANN et al., 2011) (Figura 4).

Chiang et al. (2013) demonstraram que do total de 459 genes analisados durante a fase de regressão, 181 apresentaram baixa regulação, enquanto 278 se encontraram superexpressos, dentre os quais, três genes estavam associados a produção de IL-6. Esses fatores indicam que a regressão do tumor é dependente da resposta imune do hospedeiro, determinando inclusive o sucesso do tratamento estabelecido.

Chiang et al. (2013) afirmam ainda que genes relacionados à resposta de linfócitos de perfil Th17 estão superexpressos durante a fase de regressão, sugerindo envolvimento de respostas inflamatórias nessa fase, visto que células Th17 possuem papel essencial na patogênese de várias doenças autoimunes e autoinflamatórias (DONG, 2009; KOENDERS; VAN DEN BERG, 2010).

Deste modo, todos esses eventos são ativados ou inativados por alterações no DNA, tais como mutações ou expressões anômalas de genes normais, sendo que o

acúmulo dessas alterações leva a perda da homeostase e ao aparecimento do fenótipo celular maligno (COSTA; MENCK, 2004).

2.3.1 IL-6

As interleucinas são proteínas que regulam as atividades dos leucócitos envolvidos na defesa do organismo. A IL-6 é produzida por macrófagos, linfócitos, mastócitos, fibroblastos e células do endotélio vascular. Sua produção é estimulada, principalmente, por antígenos que atuam por meio de receptores localizados nos linfócitos T ou B. A IL-6 afeta tanto o processo relacionado à inflamação, quanto a imunidade adquirida (TIZARD, 2009).

As interleucinas atuam como ligantes para seus receptores de superfície celular, de forma que no câncer, esses receptores se tornam constantemente ativados. As vias de sinalização STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*) foram delineadas, originalmente, para receptores de IL-6 e IFN. As proteínas STAT possuem papel duplo, atuando como proteínas de sinalização citoplasmática e como fatores de transcrição nuclear, sendo responsáveis pela ativação de um conjunto diversificado de genes, incluindo alguns implicados na progressão celular maligna (YU; JOVE, 2004).

Em células normais, proteínas STAT transmitem sinais citoplasmáticos de citocinas e fatores de crescimento polipeptídicos que possuem receptores com atividade de tirosina-quinase (TK) intrínseca ou associada, como no caso das JAKs (*Janus family TKs*) e das SRC (*Src Family TKs*), sendo que as TKs estão entre as proteínas oncogênicas mais frequentemente ativadas nas células cancerosas (YU; JOVE, 2004).

A IL-6 tem sido identificada como uma causa de atividade constitutiva de STAT3 em determinados mielomas e linhagens celulares de câncer de próstata (CATLETT-FALCONE et al., 1999; LOU et al., 2000), assim como em cânceres de cabeça e pescoço (SRIURANPONG et al., 2003). O bloqueio da sinalização de STAT3 tem mostrado ainda inibir IL-6, a qual pode ser induzida pela super-regulação de VEGF (YU; JOVE, 2004).

Angelo, Talpaz e Kurzrock (2002) observaram que a expressão da IL-6 foi regulada positivamente pela mutação do *TP53* em células de carcinoma renal, uma vez que, em condições normais, o *TP53* suprime o promotor da IL-6 por interferir em vários fatores transcricionais que regulam o gene que codifica essa interleucina (ANGELO TALPAZ; KURZOROCK, 2002).

Park et al. (2003) demonstraram ainda que a expressão de IL-6 é ativada pelo TGF- β 1 em células de câncer de próstata, sendo que o aumento dessa interleucina participa da conversão oncogênica de TGF- β 1 na tumorigênese prostática, em parte antagonizando o seu efeito supressor no crescimento. Em adição, sugere-se que o TGF- β 1 é um potente regulador de IL-6 em osteoblastos e fibroblastos de pulmões humanos (FRANCHIMONT; RYDZIEL; CANALIS, 2000).

A expressão de IL-6, bem como a de TGF- β pelas células tumorais, controla a diferenciação e a proliferação de Th17 no microambiente tumoral, sendo que acúmulo desses linfócitos em tumores já foi reportado em diversos tipos de cânceres (MIYAHARA et al., 2008; SU et al., 2010). A IL-6 foi identificada ainda como fator de resistência para alguns agentes quimioterápicos em carcinomas prostáticos (BORSELLINO; BELLDERGRUN; BONAVIDA, 1995), indicando que essa interleucina influencia inclusive no sucesso do tratamento estabelecido.

2.3.2 TGF- β

TGF- β ou fator de crescimento tumoral pertence a uma família de glicoproteínas de sinalização produzida por plaquetas, macrófagos ativados, neutrófilos e linfócitos T e B, secretadas de forma inativa ou latente. Essas glicoproteínas regulam o crescimento, a diferenciação e a função de todas as classes de linfócitos, além de aumentar a deposição de proteínas da MEC (TIZARD, 2009).

No microambiente tumoral maligno, TGF- β é capaz de alterar a regulação de microRNA (miRNA) – potentes moduladores de mRNA – os quais são extremamente expressos em vários tipos de cânceres. Em células supressoras de linhagem mieloide, por exemplo, o TGF- β pode aumentar a expressão de miR-494, aumentando o receptor CXCR4 (PICKUP et al., 2013). O receptor CXCR4 juntamente com o seu ligante, a quimiocina CXCL12, medeiam a proliferação e a migração de células tumorais, aumentando assim a angiogênese associada ao tumor (SUN et al., 2013; PICKUP et al., 2013).

O TGF- β também pode estimular a progressão tumoral através do impedimento de respostas imunes antitumorais, suprimindo ou alterando a ativação, maturação e diferenciação de células de ambas respostas imunes – inata e adaptativa. Na resposta imune inata, o TGF- β possui efeito inibitório no microambiente tumoral, influenciando desde a atividade de células NK – assim como sua produção de IFN- γ , que promove a

estimulação de linfócitos T auxiliares (Th1) – até o recrutamento de macrófagos tipo 2 (M2) (FLAVELL et al., 2010). M1 e M2 parecem exercer papéis distintos na patogênese do câncer. Enquanto M1 está associado com a citotoxicidade tumoral, M2 está relacionado a atividades anti-inflamatórias, reparo tecidual e a angiogênese, favorecendo assim a progressão tumoral (AKHURST; HATA, 2012).

Na resposta imune adaptativa, o TGF- β regula a sobrevivência, diferenciação, proliferação e apoptose de subconjuntos de células T. Dentro do microambiente tumoral, pode promover crescimento do tumor pela manutenção e diferenciação de linfócitos Th em linfócitos Treg, os quais irão inibir células efectoras, dentre elas as NK e os LTC, atenuando a resposta antitumoral. TGF- β também pode inibir Th1 por meio da baixa regulação de IFN- γ e LTC, através da indução da apoptose (FLAVELL et al., 2010).

Outra via importante na transformação de células cancerígenas – também induzida pelo TGF- β – é a MDM-p53, cuja função é crucial na transição epitélio-mesenquimal (MET) (IKUSHIMA; MIYAZONO, 2010). A MET é essencial no processo de invasão e metástase, onde células malignas perdem suas propriedades epiteliais – dentre elas sua polaridade e seu contato com outras células – para adquirir características de fibroblastos (THIERY, 2002). Em células mamárias de ratos, TGF- β induz a expressão de *Mdm2* aumentando os níveis da proteína MDM2, o que leva a desestabilização da p53, que é uma componente chave na MET. Em adição, análises histológicas de amostras de cânceres de mama demonstraram forte correlação entre a indução de MDM2 mediada por TGF β 1 e estados tardios de progressão tumoral (IKUSHIMA; MIYAZONO, 2010).

2.3.3 IFN- γ

Os interferons são citocinas produzidas em resposta a infecções virais ou à estimulação imunológica. O IFN- γ , pertencente à classe tipo II, é produzido pelo perfil de linfócitos Th1, LTC e por células NK (TIZARD, 2009). O IFN- γ possui primariamente papel imunomodulador, pois além de regular a expressão de MHC classe I, também induz a expressão de MHC classe II em uma variedade de leucócitos e células epiteliais (TING; BALDWIN, 1993). Já os interferons tipo I (IFN- α e IFN- β) possuem principalmente ação antiviral (TIZARD, 2009).

Em células de melanoma humano *in vitro*, o IFN- γ ocasionou potente indução de moléculas de MHC classe I. A expressão de MHC classe II em cultura de melanomas, que normalmente não expressa esse antígeno, também foi induzida após administração de IFN- γ (GIACOMINI et al., 1986). O aumento da expressão de MHC classe I, ocasionado pelo IFN- γ , pode diminuir a suscetibilidade das células tumorais à lise por células NK. Por outro lado, o potencial de lise dos TILs é aumentado após incubação com essa citocina (WIEBKE et al., 1990).

No TVT, Hsiao et al. em 2008, evidenciaram que IFN- γ , TGF- β e IL-6, além de interagirem entre si, ainda modulam a expressão de MHC. TGF- β 1 inibe a atividade das NK, suprimindo-as. Esse fato pode ser equilibrado pelo efeito da IL-6 secretada pelos linfócitos tumorais, que em sinergismo com IFN- γ , pode também induzir a expressão de MHC *in vitro* pelas células do TVT (HSIAO et al., 2008). Laouar et al. (2005) corroboram com esse fato, afirmando que o TGF- β suprime diretamente a produção de IFN- γ , o qual é produzido por células NK. A fase de regressão do TVT está relacionada com a atividade do IFN- γ . Quando o nível de IL-6 secretado por TILs atinge um limiar, inicia-se sua atividade junto com IFN- γ , permitindo a infiltração de linfócitos na neoplasia e ativando a expressão do MHC classe I e II nas células de TVT (STOCKMANN et al., 2011).

Sidky e Borden (1987) afirmam ainda que o IFN- γ possui também ação antiangiogênica. Gresser e Tovey (1978) observaram que além do interferon agir no hospedeiro, provavelmente age também em células tumorais, uma vez que ratos tratados com interferon e que possuíam células sensíveis a essa citocina, apresentaram melhor nível de proteção que ratos inoculados com células resistentes ao interferon. Segundo Romagnoli (2007), a interação do tumor com o sistema imune do hospedeiro desencadeia a produção de uma variedade de citocinas, incluindo IL-12 e IL-18, que possuem capacidade de induzir aumento na expressão de IFN- γ que, por sua vez, desempenha ação angiostática.

Atualmente, imunoterapias que visam melhorar a capacidade do sistema imune para bloquear a angiogênese tumoral, denominada como “vigilância antiangiogênica”, têm evidenciado cada vez mais resultados eficazes (PORTER et al., 2011; ROSENBERG, 2012; SCHADLER et al., 2014). Vigilância antiangiogênica resulta da regulação negativa do endotélio pelo sistema imune durante o crescimento tumoral. Sabe-se que subpopulações de linfócitos produzem reguladores angiogênicos específicos, como por exemplo o VEGF, que é altamente expresso por células Treg e o

IFN- γ , como já mencionado anteriormente, secretado por células Th, LTC e NK. Assim, as células T secretam tanto VEGF como IFN- γ , desempenhando papéis opostos e regulando a angiogênese e o crescimento tumoral (SCHADLER et al., 2014).

A vigilância antiangiogênica começou a ser entendida como uma única faceta antitumoral de imunovigilância tradicional. No entanto, os mecanismos pelo qual o sistema imunitário regula a vasculatura tumoral ainda não são totalmente compreendidos. Durante o crescimento tumoral, não se sabe ao certo se o efeito global de um sistema imune ativado é pró- ou antiangiogênico, sendo provavelmente contexto dependente (SCHADLER et al., 2014).

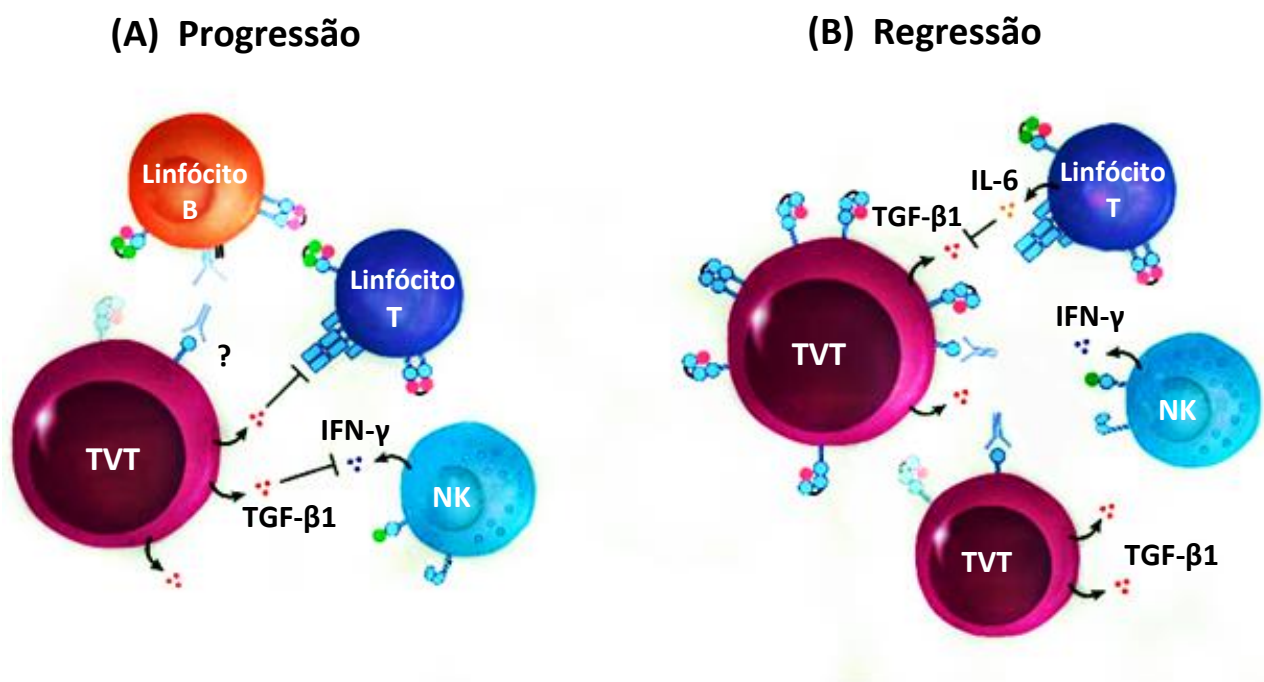


Figura 4. Tumor venéreo transmissível: fases de progressão (A) e regressão (B). Na primeira situação, células do TVT produzem TGF β 1 que inibe a atividade das células T e NK. O efeito supressor do TGF β 1 na atividade de NK pode ser equilibrado pelo efeito da IL-6, secretada pelos linfócitos tumorais. IgG recobre as células TVT e podem contribuir para a capacidade das células B e células NK de reconhecer as células do TVT MHC - negativos (A). No segundo caso, quando o nível de IL-6 secretado por linfócitos infiltrantes do tumor atinge um limiar, inicia-se sua atividade junto com IFN- γ permitindo a infiltração de linfócitos e plasmócitos na neoplasia, ativando a expressão de MHC classe I e II nas células do TVT, dando início à fase de regressão (B) (Adaptado de SIDDLE; KAUFMAN, 2014).

Objetivo

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Analisar o fenótipo de células do TVT correlacionando-o com a resposta clínica dos animais ao tratamento quimioterápico.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de comportamento epidemiológico e clínico do TVT em cães portadores do tumor de ocorrência natural, tratados com vincristina;
- Analisar a expressão dos genes *IL-6*, *IFN- γ* , *TGF- β* (citocinas); *TP53*, *P21*, *RASSF1* (supressores tumorais); *BAX*, *BCL-2*, *BCL-xL* (pró e antiapoptóticos); *VEGF* e *CXCR4* (fatores angiogênicos) em células de TVT *in vivo* e *in vitro* (cultura primária);
- Relacionar a expressão dos genes *IL-6*, *IFN- γ* , *TGF- β* , *TP53*, *P21*, *RASSF1*, *BAX*, *BCL-2*, *BCL-xL*, *VEGF* e *CXCR4* com a resposta clínica do animal ao tratamento com a vincristina.

Material e

Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

O presente estudo foi conduzido segundo preceitos éticos em pesquisa e sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – UNESP (Protocolo nº 81/2014) (Anexos 1 e 2).

4.2 Avaliação clínica dos cães com TVT

O protocolo experimental incluiu estudo epidemiológico com base em informações obtidas dos proprietários sobre a história clínica do animal, hábitos de criação, histórico reprodutivo, contato com outros cães e densidade populacional na residência. O tempo de evolução do processo neoplásico foi estimado pela data de início da apresentação dos sinais clínicos até o momento do diagnóstico. Adicionalmente, foi realizada avaliação física geral e exame específico da área afetada pela neoplasia, com a medição do tumor em seu ponto de maior diâmetro e a avaliação de linfonodos regionais (TNM clínico) (Anexo 3).

Da mesma forma, foram obtidas informações sobre tratamentos prévios para a neoplasia, incluindo doses e datas de aplicação. O proprietário respondeu a um questionário (Anexo 4) e assinou um termo de livre consentimento, facultando-lhe a opção de aceitar ou não participar do estudo (Anexo 5).

4.3 Coleta do tumor e classificação citopatológica

As preparações citológicas foram fixadas com álcool metílico (5 minutos) e posteriormente coradas pela técnica de Giemsa (May Grünwald Giemsa a 2%) por 20 minutos. Um mínimo de 100 células por lâminas (duas) foram analisadas por microscopia óptica de luz, em aumento de 400x, para o diagnóstico e classificação do tumor de acordo com o tipo celular predominante em plasmocitóide, linfocitóide ou misto, segundo Amaral et al. (2007).

Foram incluídos no grupo linfocitóide os tumores com predomínio de 60% ou mais de células pequenas, com contorno regular e núcleo redondo, cromatina grosseira e presença de um ou dois nucléolos, além de citoplasma escasso e finamente granular, com vacúolos localizados na periferia celular. No grupo plasmocitóide, consideraram-se células volumosas, de contorno irregular, com um núcleo excêntrico e citoplasma abundante. O grupo misto foi composto por tumores com os dois tipos celulares, não ultrapassando 59% do total (Amaral, 2005).

Uma vez confirmado o diagnóstico do TVT, e após anestesia do animal com total assepsia do local, foi conduzida a coleta da amostra tumoral por biópsia incisional de fragmentos de aproximadamente 1 cm³. Todas as coletas foram realizadas antes que os animais recebessem quimioterapia. As amostras foram mantidas em solução salina fosfatada (PBS) pH 7.4, e em RNA Later (Qiagen) para posterior processamento e avaliação da expressão gênica e análise cromossômica (Figura 5).

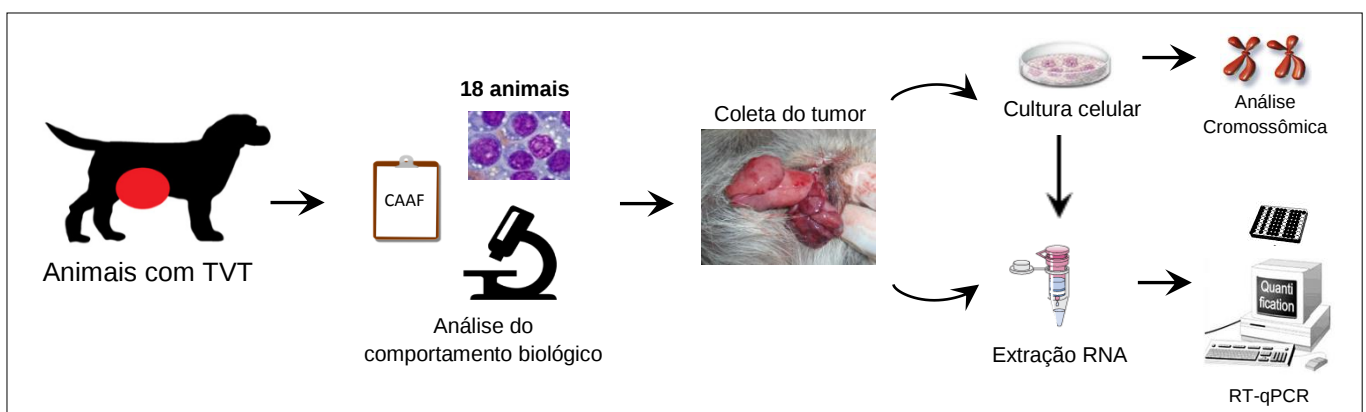


Figura 5. Metodologia esquematizando amostras coletadas e armazenadas para análises de citogenética e RT-qPCR dos animais portadores de TVT.

4.4 Análise do comportamento biológico

O comportamento biológico foi baseado na análise da fase de progressão do tumor no momento da coleta e posteriormente na resposta clínica dos animais perante o tratamento com o quimioterápico.

A análise da fase de progressão do tumor foi realizada a partir dos cortes de tecido corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) da seguinte forma: estado progressivo (Intensa celularidade imersa em delicado estroma), estado regressivo inicial (Evidência

de tecido estromal de forma moderada) e estado regressivo final (Intenso tecido estromal formando bandas entre as células tumorais e substituindo-as); critérios esses já empregados anteriormente por Mukaratirwa e Gruys (2003) e Stockmann et al. (2011).

Para examinar tais amostras foi utilizado um microscópio óptico Carl Zeiss, LAb A1 – Germany, na objetiva 10x, e as imagens foram capturadas com o programa AxioVision 4.8, no aumento 200x, para posterior medição das áreas e classificação do estado de progressão do tumor.

Para análise da resposta clínica dos animais perante o tratamento com o quimioterápico, foram estabelecidas três categorias: resposta completa (RC), quando a duração necessária do tratamento para a regressão total da massa tumoral não ultrapassou quatro semanas; resposta parcial (RP), quando houve regressão do tamanho do tumor em 50% ou menos após as quatro semanas; e resistentes (R), no caso dos animais submetidos à alteração do tratamento. Para isso, todos os cães receberam protocolo terapêutico idêntico, ou seja, infusão semanal de sulfato de vincristina intravenosa, na dose de 0.75 mg/m² de superfície corporal. A duração da quimioterapia variou entre 4 a 8 semanas. Os animais foram acompanhados durante todo o período do tratamento.

4.5 Cultura primária de TVT

O cultivo das células do TVT foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Bassani-Silva et al. (2007), Hasio et al. (2008) e Flórez et al. (2016). Para tal, os fragmentos de TVT foram mantidos em solução salina de PBS pH 7.4 e em seguida, transferidos para solução de tripsina (TrypLE Select – Invitrogen) a 37.5°C por 40 minutos, sob homogeneização. Posteriormente, a solução foi centrifugada (820 *g*, 4°C, 25 min), descartado o sobrenadante e as células ressuspensas e cultivadas em frascos de 25 cm² (Sarstedt) com 5 mL de meio de cultivo DMEM alta glicose (Dulbecco's modifield essential medium – Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), e com a combinação de 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina (Gibco) e 3 µg/mL de anfotericina B (Gibco).

As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 5%, umidade 95% e temperatura de 37.5°C. A viabilidade e concentração celular foram determinadas pelo teste de exclusão com azul de tripan e as células ressuspensas em meio de cultivo DMEM alta glicose (*Dulbecco's modifield essential medium* – Gibco).

Para determinar a curva de crescimento do TVT, as células foram tripsinizadas e diluídas a uma concentração de 2×10^4 células/mL, semeadas em placas de 6 poços (Costar) e amostradas a cada 24 horas, contando-as em câmara de Neubauer até alcançarem a fase de *plateau*, a qual ocorreu ao final de dez dias após o estabelecimento inicial.

As passagens dos cultivos em novos frascos (25 cm^2) foram semeadas com 1×10^6 células. Para tanto, inicialmente foi realizada a tripsinização das células contidas nos frascos, com remoção do meio de cultivo, lavagem com solução de PBS pH 7.2 e, em seguida, adição de 1 mL de tripsina TrypLE Select (Invitrogen), aquecida a 37.5°C .

Posteriormente, os frascos foram mantidos em estufa a 37.5°C , por no máximo cinco minutos, até que houvesse desprendimento das células por ação enzimática. Realizou-se então a neutralização com meio DMEM alta glicose acrescido de 20% de SFB (Gibco), Penicilina, Estreptomicina (Gibco) e Anfotericina-B (Gibco) e as células foram transferidas a novos frascos. Após a tripsinização das células, estas foram colocadas em Câmara de NeuBauer, e com auxílio do microscópio Leica DM IRB realizou-se a individualização das células viáveis e as contagens. Nos controles celulares provenientes de tecidos tumorais e amostrados para a expressão gênica, as células em cultura se encontravam na 3ª passagem.

Para criopreservação das amostras obtidas via cultura, 1×10^6 células/mL foram imersas em solução com 10% de dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma), 20% SFB e 70% de DMEM alta glicose com Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina-B. O material foi distribuído homogeneamente e acondicionado em criotubos (Sarstedt), por 24 h em freezer à -80°C e, em seguida, mantidos em botijão criogênico (-196°C).

4.5.1 Contagem cromossômica dos cultivos primários

Culturas de células do TVT foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Bassani-Silva et al. (2007), Hsiao et al. (2008) e Flórez et al. (2016), como mencionado anteriormente. Posteriormente ao estabelecimento da cultura celular com confluência de 50%, esta foi submetida à análise cromossômica no Laboratório de Genética Animal do Instituto de Biociências UNESP – Botucatu. Para tanto, desprezou-se o sobrenadante, as células foram descoladas, acrescidas de 5 mL de solução hipotônica de KCl (0.075 M), incubadas por 40 minutos a 38°C , e em seguida centrifugadas a 1500 rpm por cinco minutos. Posteriormente, as células foram lavadas

diversas vezes em solução fixadora 3:1 de metanol e ácido acético, até que o sobrenadante se apresentasse límpido. Em seguida, as células foram ressuspensas em 0.5 mL de solução fixadora para preparo das lâminas. Três a quatro gotas da suspensão obtida foram dispostas sobre lâmina histológica limpa e mantida em água destilada gelada. As lâminas confeccionadas foram secas a temperatura ambiente e mantidas em geladeira até o momento da análise cromossômica. As lâminas foram analisadas individualmente em cada amostra obtida e as metáfases encontradas foram contadas.

4.6 Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR)

A extração de RNA foi realizada utilizando-se o kit RNeasy Mini (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Posterior a purificação do RNA, o mesmo foi tratado com RQ1 RNase-free DNase (Promega) por 30 min a 37°C para evitar resultados falso-positivos oriundos da amplificação de DNA genômico. A qualidade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e a quantidade foi analisada em equipamento NanoVue (GE Healthcare). As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit High Capacity (Applied Biosystems) e confeccionado a partir de 1 µg de RNA. A reação foi realizada com 6 µL de Random Primer (10x), 6 µL de RT Buffer (10x), 2.5 µL dNTPs (25x), 3 µL do Multiscribe (50 U/µL) e H₂O RNase-free, de acordo com o protocolo do fabricante. Posteriormente a incubação foi efetuada a 25°C durante 10 min e a 37°C por 120 min, utilizando o termociclador automático (ABI Prism 7500 FAST Sequence Detection System – Applied Biosystems). As amostras permaneceram então a 4°C até realização da amplificação por meio de RT-qPCR.

Para a amplificação das sequências dos *primers* detalhados na tabela 1, o SYBR Green e o PCR Master Mix universal (Promega) foram utilizados segundo instruções do fabricante. A reação da qPCR consistiu de 4 µL de cDNA da amostra, 200 nM de cada *primer*, 10 µL de GoTaq qPCR Master Mix (Promega) e água nuclease-free, perfazendo um volume final de 20 µL.

As condições da reação para todos os genes foram: uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação (95°C por 15s para desnaturação, 60°C por 1 min para anelamento e extensão) e a curva de

dissociação (95°C por 15s, 60°C por 30s e 95°C por 15s). Como controle negativo utilizou-se água nuclease-free no lugar da amostra. A curva standard relativa para cada gene foi gerada utilizando diluições seriadas do cDNA de uma amostra considerada referência. A menor diluição do padrão foi considerada valor relativo de 100, seguindo de diluições seriadas 1/10. Os 3 pontos analisados foram 10, 1, 0.1.

A concentração relativa dos genes estudados foi normalizada conforme Larionov et al. (2005), através do controle endógeno mais estável dentre os três endógenos testados (RPS5, RPS19 e ACTB). Todas as reações foram feitas em duplicata. Considerou-se como diminuição da expressão o valor de $QR < 0.5$ e como aumento de expressão o valor de $QR > 2.0$.

Tabela 1. Sequências de *primers* dos genes utilizados na RT-qPCR.

Gene	Sense	Antisense
RPS5 ¹	GAGGCGTCAGGCTGTCGAT	AGCCAAATGGCCTGATTCAC
RPS19 ¹	GGGTCCTCCAAGCCCTAGAG	CGGCCCCCATCTTGGT
ACTB ¹	GGCATCCTGACCCTCAAGTA	CTTCTCCATGTCGTCCTCAGT
IL-6 ²	CCACAAGCGCCTTCTCCCTGG	TCACGCACTCATCCTGCGACTG
TGF- β ³	GTATATGGCCCCCGAAGTTCTAG	CCCAGAATACTAAGCCCATTGC
IFN- γ ³	GCTTTGCGTGATTTTGTGTTCTT	CACCGTCCGATACATCTGGATTA
P21 ⁴	ACCTCTCAGGGCCGAAAAC	TAGGGCTTCCTCTTGAGAA
TP53 ⁵	CGCAAAAGAAGAAGCCACTA	TCCACTCTGGGCATCCTT
BAX ⁶	GGTTGTTGCCCTCCTCTACT	GTAAGCACTCCAGCCACAAA
BCL-2 ⁶	TGGATGACTGAGTAGCTGAA	GGCCTACTGACTTCACTTAT
BCL-xL ⁶	GGCCTTTTTCTCCTTCGGTG	CTCTCGGCTGCTGCATTGTT
VEGF ⁷	CTTTCTGCTCTCCTGGGTGC	GGTTTGTGCTCTCCTCCTGC
CXCR4 ⁸	GACTCCATGAAGGAACCCTG	GCCAGTCAAGAAGATGATGG
RASSF1	TGTCGGATGATGAACAGCCC	CCTGCCCAATGACAACCAAG

¹ BRINKHOF et al., 2006

² RIDYARD et al., 2002

³ STEHLE et al., 2010

⁴ KLOPFLEISCH et al., 2010

⁵ KLOPFLEISCH et al., 2009

⁶ SANO et al., 2005

⁷ KOOL et al., 2014

⁸ CHUNG et al., 2014

4.6.1 Desenho do primer para *RASSF1*

Especificamente para o gene *RASSF1* (*Ras association* (RalGDS/AF-6) *domain family member 1*), foi necessário realizar o desenho dos iniciadores (*primers*) com

auxílio do programa *primer blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) a partir da sequência, número de acesso: NC_006602.3; intervalo 39014609 – 39023393. O produto amplificado deste *primer* (RASSF1) foi sequenciado e analisado com ajuda de *softwares* de bioinformática para a confirmação do gene.

Para o desenho dos *primers*, sequências de genes *RASSF1* foram pesquisadas no banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI por sua sigla em Inglês; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para o gene *RASSF1*, duas sequências foram encontradas e, para selecionar a sequência final do gene, considerou-se as informações bibliográficas completas (*RASSF1*, NC_006602.3; intervalo 39014609 – 39023393). Os *primers* foram desenhados no programa on-line Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Sequências do gene foram inseridas separadamente no formato FASTA. Uma vez desenhadas, a especificidade dos *primers* foi confirmada utilizando o algoritmo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os *primers* foram sintetizados pela Molecular Brasil.

4.7 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados foram utilizados testes não paramétricos de Wilcoxon (duas amostras independentes) ou teste de Kruskal-Wallis (três amostras independentes) para verificar quanto a diferenças entre as variáveis estudadas. Devido ao tamanho amostral, algumas variáveis com muitas categorias necessitaram ser agrupadas segundo critérios de similaridade. Dessa forma, os resultados das expressões gênicas foram comparados frente às categorias apresentadas pelos animais. As categorias avaliadas levaram em consideração sexo (machos e fêmeas), idade (+8 anos e ≤ 8 anos), raça (SRD e demais raças), localização do tumor (genital e extragenital), fase tumoral (progressão ou regressão) e tamanho do tumor ($< 5\text{cm}$ ou $\geq 5\text{cm}$). Para a análise da resposta dos animais ao tratamento com vincristina foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, em que foram consideradas três variáveis (RC, RP e R).

Os resultados referentes às expressões gênicas obtidos dos tecidos foram ainda comparados com as expressões dos mesmos genes dos ensaios *in vitro*. As medianas de cada grupo foram comparadas e consideradas significativas ao nível de significância de 0.05 ($P < 0.05$). As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SAS.

Resultados e

Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dados clínicos e epidemiológicos dos animais

O material utilizado neste estudo foi obtido de 18 cães portadores de TVT de ocorrência natural e provenientes da região de Botucatu, atendidos no ambulatório de cirurgia do Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP – Botucatu. Os dados clínicos dos animais encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes portadores de TVT atendidos no Hospital Veterinário (FMVZ/UNESP – Botucatu).

Animal	Sexo	Idade (anos)	Raça	Localização	Subtipo	Fase	Tamanho (cm)	Resposta Tratam.
1	M	9	SRD	pênis	P	Reg. Inicial	8.0 x 4.0	R
2	F	9	Dachshund	vagina	P	Progressão	6.0 x 5.0	RC
3	M	7	SRD	pênis	P	Reg. Completa	5.0 x 3.0	RC
4	M	9	SRD	pênis	P	Reg. Completa	0.5 x 0.7	RC
5	M	–	SRD	pele/ pênis	P	Progressão	1.0 x 2.0/ 3.0	RC
6	M	10	SRD	pênis	P	Progressão	3.0	RC
7	M	–	SRD	pênis	P	Progressão	4.0	RC
8	F	10	SRD	vagina	P	Progressão	3.5	RP
9	M	5	SRD	pênis	P	Reg. Inicial	6.0	RP
10	M	6	SRD	pênis	P	Progressão	5.0	RC
11	M	–	SRD	pênis	P	Progressão	7.0	R
12	M	8	Poodle	gengiva	P	Progressão	3.0	RC
13	M	10	SRD	pênis	P	Progressão	4.0	RC
14	M	10	SRD	pênis	P	Progressão	2.5	RC
15	M	16	SRD	pele/ pênis	P	Progressão	5.0 x 5.0/ 1.0 x 1.5	RC
16	M	–	Bull Terrier	pênis	P	Progressão	3.0 x 2.5	RC
17	M	–	SRD	pênis	P	Progressão	3.0 x 2.5	RC
18	M	–	SRD	pênis	P	Progressão	3.0	RC

M = macho; F = fêmea; – = dado não especificado pelo proprietário; SRD = sem raça definida; P = plasmocitóide; Reg. Inicial = Regressão Inicial; Reg. Completa = Regressão Completa; R = resistente; RP = resposta parcial; RC = resposta completa até 14 semanas.

A incidência do TVT está relacionada à idade de maior atividade sexual (COHEN, 1978) e, dessa forma, atinge principalmente animais adultos (FONSECA et al., 2012). Os pacientes do presente estudo apresentaram faixa etária entre 5 e 10 anos, com maior frequência de acometimento em animais idosos, com idade superior a oito anos. De acordo com trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, bem como de outros grupos, o TVT também foi diagnosticado em animais com idades semelhantes (BRANDÃO et al., 2002; AMARAL et al., 2004; LEFEBVRE et al., 2007; FONSECA et al., 2012; FLÓREZ et al., 2013; JAVANBAKHT et al., 2014). Apesar de serem dados que necessitam de investigações mais profundas, o TVT pode estar acometendo animais mais velhos. Isso provavelmente se deve ao fato de os animais possuírem uma taxa de sobrevivência cada vez maior, adicionado ao fato de o TVT não ser um tumor com características que provocam o óbito.

Adicionalmente, há a influência da condição imunológica apresentada pelo animal, pois filhotes nascidos de cadelas que foram expostas experimentalmente ao TVT, apresentam menos susceptibilidade de contrair a neoplasia. Da mesma forma, em animais imunocomprometidos, houve progressão do tumor e metástases. Entretanto, aqueles que se recuperaram rapidamente, adquiriram imunidade contra implantações subsequentes (MUKARATIRWA; GRUYS, 2003; STOCKMANN et al., 2011).

Em relação às raças dos pacientes, 84% (15/18) eram cães sem raça definida (SRD), sendo os demais Bull Terrier (1), Dachshund (1) e Poodle (1). Esse fato reflete uma maior população de cães mestiços, um baixo controle de cruzamentos e fácil acesso dos animais acometidos às ruas, permitindo promiscuidade entre eles (SILVA et al., 2007) e se tornando assim, mais predispostos a tal afecção.

Entretanto, o TVT pode se desenvolver em qualquer raça de cães (COHEN, 1985). Segundo Sorensen (2003), a predisposição racial pode variar de acordo com a região geográfica. Além disso, a amostragem foi pequena e baseou-se na casuística do atendimento do Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP – Botucatu, no período de coleta das amostras, onde de fato, os cães SRD representam a maior parte da população.

Quanto ao gênero, 89% (16/18) eram machos (Figura 6) e 11% (2/18) eram fêmeas (Figura 7). Varaschin et al. (2001) reportaram maior prevalência entre machos, assim como Amaral et al. (2004), enquanto Sousa et al. (2000) relataram maior prevalência entre fêmeas. A maioria dos estudos sobre TVT de ocorrência natural não apresenta predisposição quanto ao sexo dos animais (PARK et al., 2006). No entanto, a grande ocorrência do TVT em machos, na região genital, possivelmente está relacionada com as características de coito dos cães, que permite contato prolongado e formação de escoriações na mucosa genital, tornando a cópula um eficiente modo de transmissão (COHEN, 1985), sendo que um macho possui capacidade de copular com várias fêmeas, aumentando assim a probabilidade de transmissão.

Em relação à localização, 94% dos animais apresentaram somente envolvimento genital, sendo 83% peniano e 11% vaginal. Dois animais com comprometimento peniano também apresentaram acometimento de pele, e em um animal foi observado, envolvimento exclusivo, de gengiva. O maior número de cães com acometimento genital identificado neste estudo, está de acordo com estudos prévios, que sugerem que o TVT acomete principalmente a genitália externa de animais de ambos os sexos, embora também haja relatos de ocorrência extragenital (COHEN, 1985; STRAKOVA; MURCHISON, 2014).

Brandão et al. (2002), em estudo realizado com animais também da região de Botucatu, observaram nódulos em cavidade oral, além do globo ocular e terceira pálpebra. O tropismo extragenital é atribuído ao TVT quando localizado em qualquer região do corpo do animal, sem que a genitália esteja envolvida (NIELSEN; KENNEDY, 1990). No entanto, da mesma forma que descrevem Amaral et al. (2004), em dois dos casos de localização extragenital, a genitália também estava acometida. Adicionalmente, no caso exclusivo do comprometimento da gengiva, deve-se considerar que os animais possuem hábitos sociais diversos, como farejar e lambe, o que promove maior predisposição do TVT em áreas extragenitais.

Macroscopicamente, os tumores se apresentaram como lesões tradicionais, únicas ou múltiplas, por vezes multilobuladas, com aspecto de “couve-flor”, aderidas ou pedunculadas. Os tumores exibiram tamanhos variados e consistência relativamente firme, além de intenso sangramento. A coloração variou desde róseo-claro ao vermelho intenso (Figura 7).



Figura 6. Tumor venéreo transmissível canino em um animal macho, com multilobulações e aspecto de “couve-flor”, em região de glândula e pênis distal.



Figura 7. TVT em um animal fêmea. Lesão múltipla, multilobulada, com aspecto de “couve-flor”, aderida. Coloração róseo-claro a vermelho intenso, com áreas de hemorragia e necrose.

O exame citológico aspirativo por agulha fina (CAAF) dos tumores permitiu diagnosticar e classificá-los quanto à morfologia (Figura 8). Entretanto, o predomínio foi exclusivamente do subtipo plasmocitóide, o qual foi observado em 100% dos animais deste estudo. Essa morfologia vem prevalecendo ao longo dos estudos, principalmente em TVTs com maior tempo de evolução, predominando entre 74% a 95% (AMARAL et al., 2004; AMARAL, 2005, FONSECA et al., 2012, FLÓREZ et al., 2013). De fato, o padrão citológico parece ter papel importante no comportamento biológico do tumor, em relação ao ponto de vista da agressividade. Portanto, investigações a respeito devem ser realizadas (ROCHA, 1998).

O exame histopatológico, por outro lado, permitiu classificá-los em diferentes estágios de evolução. Para tanto, foi utilizada a relação entre a celularidade e a quantidade de estroma (Figura 9). No presente estudo, a fase em que os animais se encontravam foi na sua maioria a fase de progressão (14/18), com exceção de quatro animais, dos quais dois se encontravam na fase de regressão inicial e dois em fase de regressão completa.

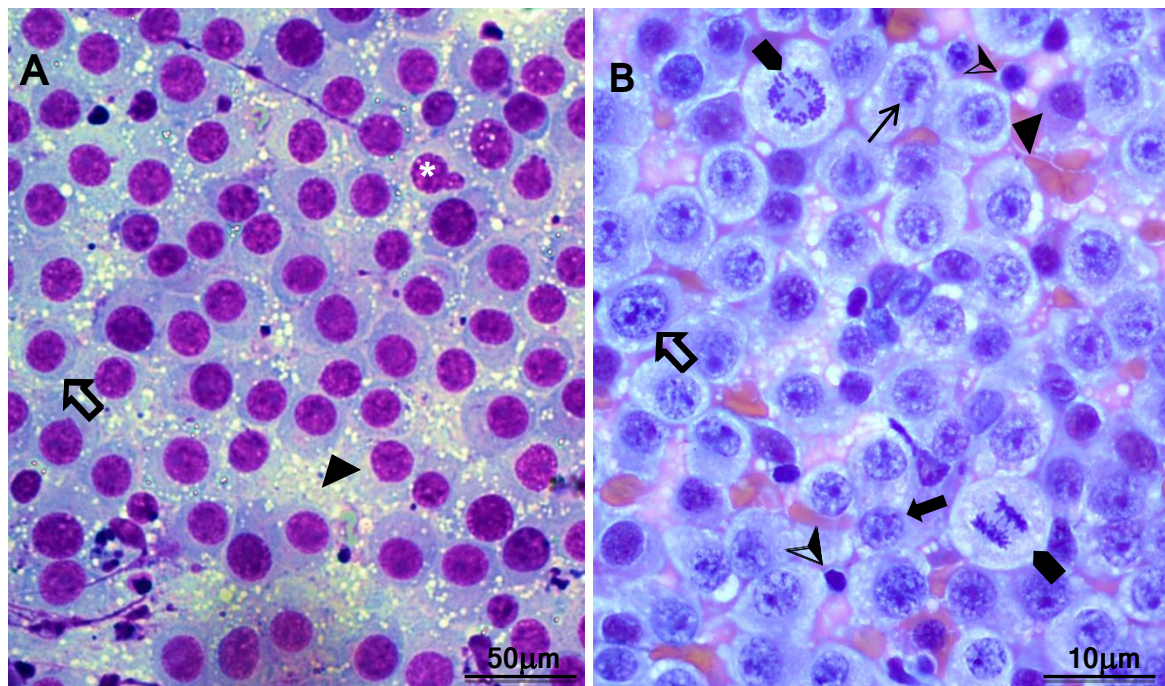


Figura 8. Fotomicrografia do TVT de um cão, macho, SRD com localização genital. Células linfocitóides: células redondas, citoplasma escasso e alta relação núcleo:citoplasma (⇨). Células plasmocitóides: células ovoides, citoplasma amplo e núcleo excêntrico (►). Presença de projeção nuclear (“Blebe”) (*), nucléolo evidente, vezes com o formato angular (→) por vezes múltiplos (⇨). A cromatina varia de frouxa a organizada. Observe ainda figuras de mitose (►) e infiltrado linfocitário (➤). Coloração: Giemsa, Obj 40x, bar 50 µm (A) e Papanicolaou, Obj 63x, bar 10 µm (B).

Esses resultados estão de acordo com Rogers (1997), que relata que embora a regressão espontânea seja bem documentada na literatura em casos de TVT experimental, o mesmo fato não é observado como rotina nos atendimentos clínicos reportados. Além disso, a presença crônica de tumores por até quatro anos opõe-se a essa teoria (BOSCOS; TONTIS; SAMARTZI, 1999).

A avaliação clínica do tumor pelo método TNM refletiu em diferentes respostas dos animais em relação ao protocolo terapêutico tradicional. Houve lesões que apresentaram desde redução parcial até redução completa. No entanto, em dois casos existiu a necessidade de alteração do protocolo de tratamento devido à resistência tumoral à vincristina. Assim, no primeiro caso (animal 1) foi realizada ressecção cirúrgica, enquanto no segundo caso (animal 11) necessitou-se de associação com a doxorrubicina, em duas aplicações, com intervalo de 21 dias (Tabela 2). Não houve comprometimento de linfonodos e/ou metástases nos animais avaliados.

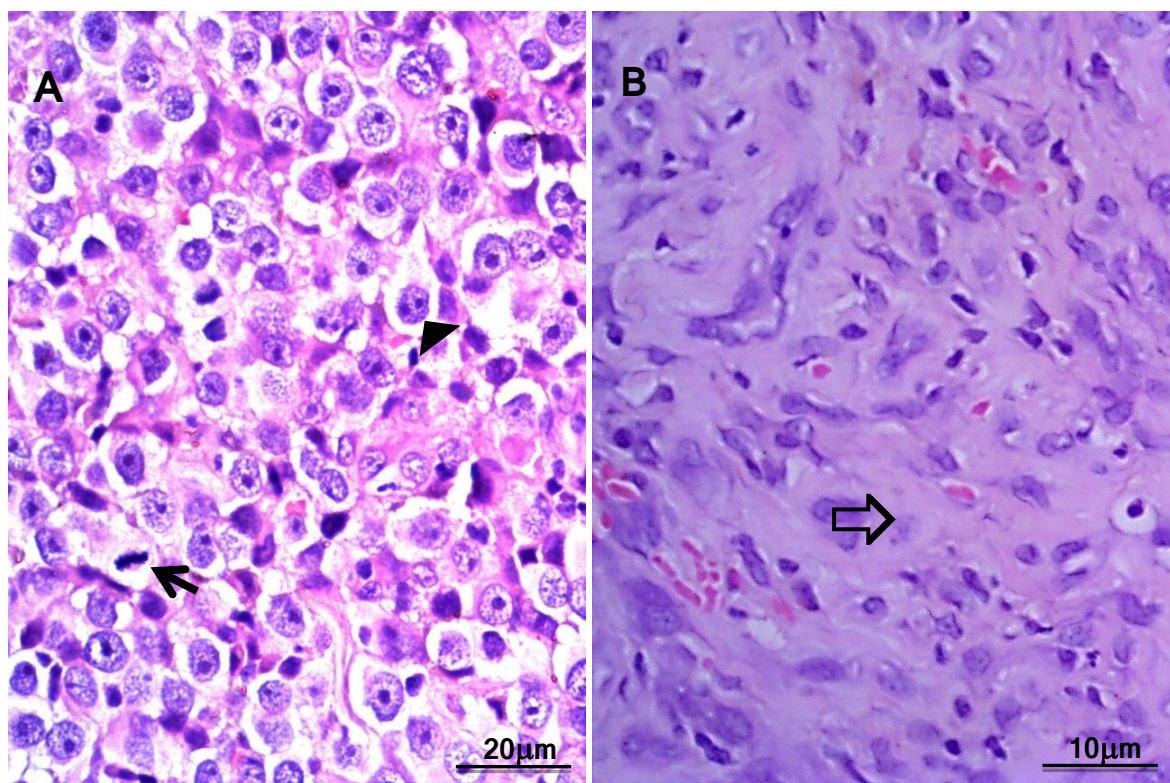


Figura 9. Fotomicrografia do TVT. Fase de progressão: células volumosas, de citoplasma amplo e claro. Núcleo excêntrico, com cromatina grosseira e nucléolo por vezes único, por vezes múltiplo (►), bem como figura de mitose (→) Coloração: HE, Obj 40x, bar 20 μm (A). Fase de regressão: presença de intenso tecido estromal (⇒), formando bandas entre as células tumorais e substituindo-as. Coloração: HE, Obj 40x, bar 10 μm (B).

5.2 Contagem cromossômica dos cultivos primários

A citogenética foi realizada a partir dos cultivos primários (Figura 10) para a contagem do número de cromossomos. As células apresentaram número variável, de 56 a 70 cromossomos, sendo que nenhuma amostra exibiu número semelhante às células somáticas do cão (Figura 11). Acerca disso, estudos citogenéticos sustentam a teoria da transmissão do TVT por transplante de células, sendo que o cariótipo do cão é de 78 cromossomos. Já as células de TVT isoladas de animais de diferentes regiões geográficas possuem número de cromossomos variante entre 46 e 67 (ADAMS; CARTER; SAPP, 1968; OSHIMURA; SASAKI; MAKINO, 1973; MUKARATIRWA; GRUYS, 2003; MURCHISON et al., 2014; FLÓREZ, 2014). O mesmo foi verificado no presente estudo, onde foram observados em média, 59 cromossomos no cariótipo da cultura de células do TVT.

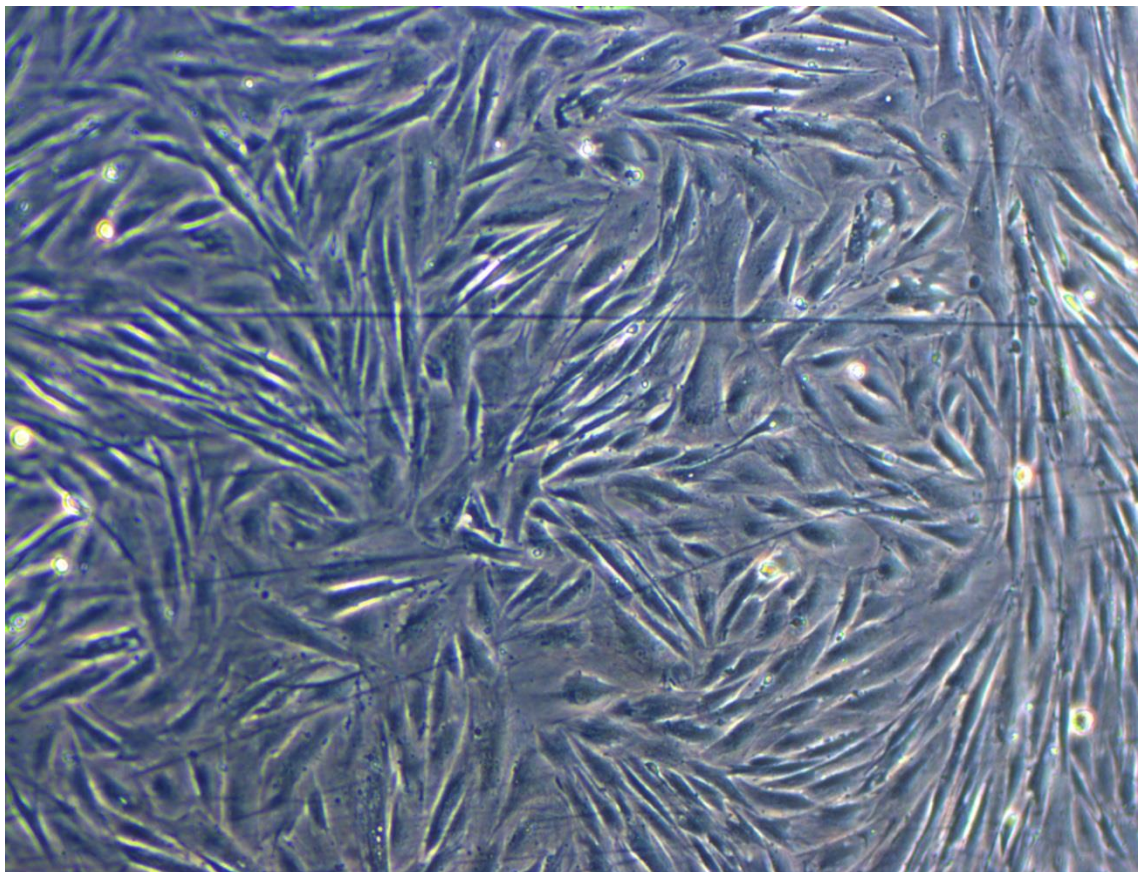


Figura 10. Cultura celular de TVT – terceira passagem. Células com formatos que variam de fusiforme a oval. Bar 200 μ m.

Uma hipótese que poderia explicar essa diferença de cariótipo entre o tumor e seu hospedeiro, é que o genoma nuclear do TVT pode ter se degenerado ao longo dos anos, já que muitos genes do cão já não são necessários para a independência que estas colônias de células apresentam (REBBECK; LEROI; BURT, 2011).

Adicionalmente, Rebbeck, Leroi e Burt (2011), em estudo com sequenciamento de regiões do genoma mitocondrial de cães e dos haplótipos tumorais, observaram distinção entre o tumor e seu hospedeiro. Esse acentuado polimorfismo pode ocorrer, principalmente, devido à transferência de mitocôndrias dos cães hospedeiros para o TVT. Além do mais, os autores referem que a filogenia mitocondrial das amostras de TVT se mostrou significativamente diferente da filogenia do microssatélite nuclear das mesmas amostras.

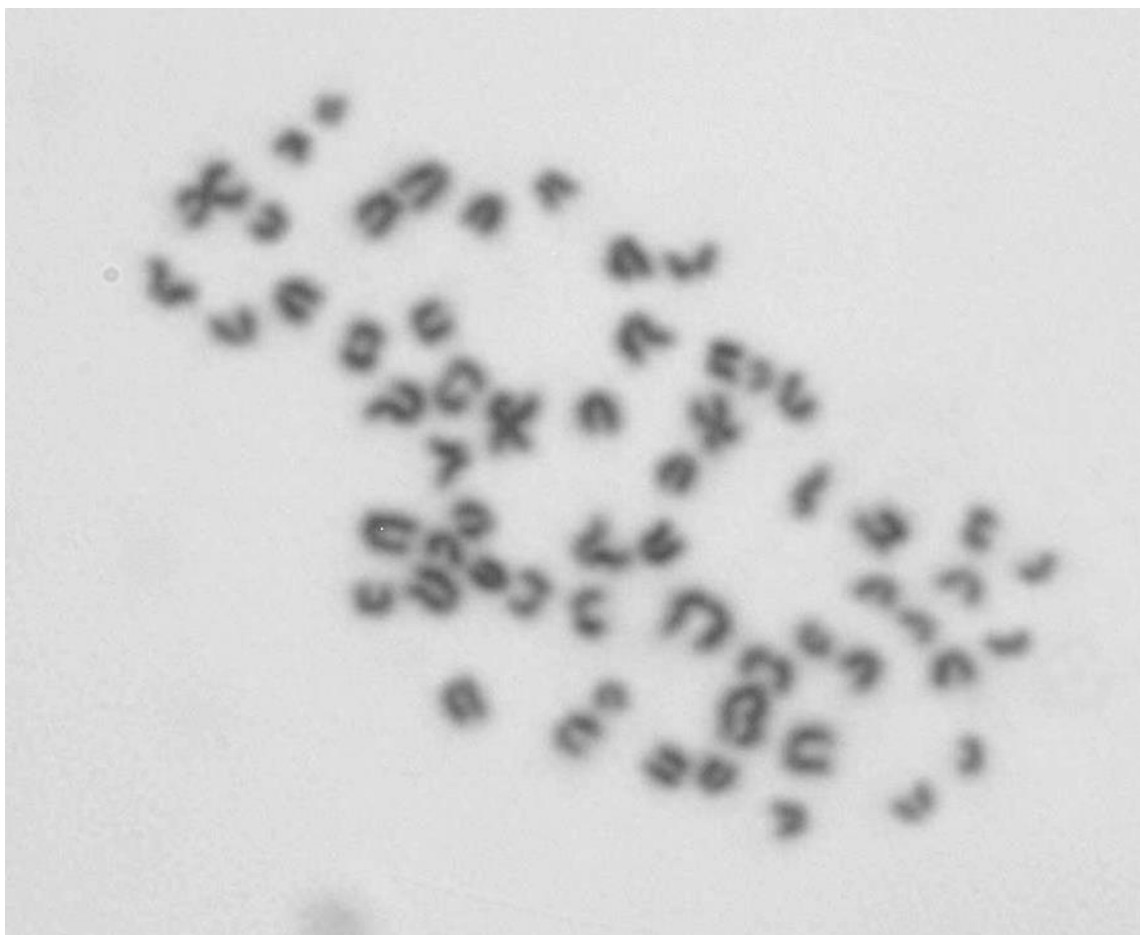


Figura 11. Cariótipo da célula em cultura de TVT. Contagem de 59 cromossomos, número inferior a 78 das células somáticas do cão.

5.3 Expressão gênica

Do total de 18 tecidos tumorais, obteve-se expressão gênica a partir de RNAm em um número variável de amostras, dependendo do gene analisado. Todas as amostras apresentaram boa integridade do RNA ribossômico 18s e 28s, com exceção de um tecido (animal 18), o qual se fez necessária remoção das análises.

Realizou-se também cultura celular (cultura primária) de três amostras provenientes de tecidos tumorais, e expressões gênicas dos mesmos genes descritos e avaliados em tecidos, com o objetivo de minimizar e/ou remover a presença de constituintes provenientes do microambiente tumoral. Ademais, as amostras provenientes de células de TVT em cultura se apresentaram como um controle para este tumor que, até então, não possui nenhum tecido e/ou célula cientificamente aceita para tal função. Os valores numéricos referentes à análise pela RT-qPCR dos genes estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Valores numéricos (QR) referentes à análise de RT-qPCR para os genes *IL-6*, *IFN- γ* , *TGF- β* , *TP53*, *P21*, *RASSF1*, *BAX*, *BCL-2*, *BCL-xL*, *CXCR4* e *VEGF* em amostras de tecidos e de culturas de TVT.

Amostra	IL-6	IFN- γ	TGF- β	TP53	P21	RASSF1	BAX	BCL-2	BCL-xL	CXCR4	VEGF
A1	0	0.128	0.310	0	0.273	0.008	1.03	0	0.909	0.418	11.44
A2	0.002	0.095	0.431	0.215	0.353	0.001	0	0	0.012	0.409	5.60
A3	0	0.497	0.934	5.247	1.426	0.002	2.38	1.840	0	0.564	5.10
A4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.60
A5	0	0.041	0.702	3.860	0.427	0	1.65	0.440	0.034	0.454	7.10
A6	0.022	0.162	0.806	0	0.586	0	0	0	0.029	0.184	3.80
A7	0.001	0.040	0.545	0	0.861	0	0	0	0.018	0.268	2.20
A8	0.041	0.018	0.919	2.940	0.901	0.002	1.29	0.440	0.026	0.324	7.80
A9	0.015	0.004	0.924	7.690	1.018	0.005	2.84	1.910	0.017	0.653	1.60
A10	0	0.072	0.483	3.250	0.511	0.001	2.00	0.460	0.021	0.146	2.80
A11	0	0.016	0.258	4.110	0.753	0	0.93	0.533	0.010	0.066	4.80
A12	0.104	0.027	0.671	0	0.748	0.029	0	0	0.005	0.620	6.80
A13	0.001	0.021	0.541	3.230	0.772	0.011	1.67	0.820	0.009	0.621	2.20
A14	0.329	0.043	0.580	6.630	0.594	0.002	2.59	1.040	0.318	0.187	5.20
A15	0	0.518	0.503	7.480	0.311	0.001	3.79	1.120	0.051	0.390	0
A16	0	0.064	0.527	4.720	0.837	0	3.11	2.320	0.003	0.358	0
A17	0.713	0.713	0.713	2.750	0.713	0.027	2.85	0.880	0.713	0.713	5.70
C1	0.095	0	0.410	3.500	0.560	0.098	0.80	0.890	0.780	0.066	11.53
C2	0	0.048	0.510	2.840	1.690	12.360	1.20	2.580	0.540	0.016	7.18
C3	0.110	0	0.430	2.690	0.460	0.038	0.89	0.770	0.180	0.016	6.20

A = animal; C = célula.

As análises do gene *TP53* revelaram expressão elevada na maioria dos tecidos (11/17) (QR = 2.7 a 7.6), com exceção de cinco amostras que apresentaram ausência de expressão e uma amostra que se apresentou com baixa expressão (QR = 0.2). As células cultivadas também apresentaram alta expressão para esse gene (3/3) (QR = 2.6 a 3.5). Para o gene que codifica a proteína p21, a maior parte se apresentou com expressão normal (12/17) (QR = 0.5 a 1.4), com exceção de cinco amostras, onde uma amostra se mostrou ausente e quatro apresentaram-se subexpressas (QR = 0.2 a 0.4). As células também apresentaram expressão normal (2/3) (QR = 0.5 e 1.6) e subexpressão (1/3) (QR = 0.4). As análises estatísticas dos genes *TP53* e *P21* não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos dos animais quando comparados com as culturas de células, assim como com as diversas subcategorias clínicas ($P > 0.05$).

A expressão de *TP53* têm sido relacionada com prognóstico desfavorável em linfomas (VELDHOEN et al., 1998) e em tumores de mama (LEE et al., 2004). No entanto, em outros tipos de tumores, descreve-se comportamento variável devido principalmente as funções que esse gene exerce no microambiente celular. O *TP53* induz a ativação da proteína p53, responsável em conduzir a célula pela via da apoptose (SUI et al., 2011), além de participar em diferentes fases do ciclo celular, como na fase G_1 -S através da transativação da p21, e na fase G_2 -M bloqueando a entrada da célula à mitose (SUZUKI; MATSUBARA, 2011). Dessa forma, a p53, quando funcional, exibe comportamento celular de proteção, evitando que anormalidades sejam transmitidas adiante.

Em nosso trabalho, cinco tecidos apresentaram-se com ausência e um tecido com subexpressão do *TP53*, respectivamente. Como descrito anteriormente, Wolf e Rotter já relataram, ainda em 1984, que o gene que codifica a p53 em camundongos foi inativado pela inserção retroviral em uma linhagem de células transformadas na leucemia murina de Abelson. Da mesma maneira, em 2010, Collavin, Lunardi e Del Sal também relataram que a perda funcional ou expressão desregulada da p53 é frequente em tumores primários, e que estas alterações podem ter grande impacto no efeito regulatório comum às proteínas da família p53.

Por outro lado, nossos dados diferem de Moro et al. (2010) que identificaram maior quantidade de expressão da proteína p53 em TVTs em fase de regressão, descrevendo relação direta entre *TP53* e o índice apoptótico em TVTs que se encontram

nessa fase. A superexpressão de *TP53* tem sido considerada como marcador de presença de mutações em diversos tipos de cânceres (MORO et al., 2010).

Adicionalmente, Choi e Kim (2002), Sánchez-Servín et al. (2009) e Decker et al. (2015) já descreveram presença de mutações desse gene no TVT. Desta forma a expressão elevada do *TP53* observada em nosso estudo, pode estar relacionada a possíveis mutações presentes nesse gene.

O mesmo animal em que a expressão de *TP53* se apresentou baixa, também foi observada subexpressão de *P21*. Como mencionado anteriormente, o *TP53* participa na fase G₁-S através da transativação da p21, de forma que a expressão de p21 pode ser regulada positivamente por um mecanismo dependente de p53, a qual induz a expressão de genes de reparo perante um DNA lesado (BENADIBA, 2008). Do mesmo modo, as outras três amostras que igualmente apresentaram diminuição da expressão de *P21*, com superexpressão de *TP53* ou com ausência, também podem estar relacionadas com possíveis mutações presentes nesse gene.

Segundo Klumb e Júnior (2002), a mutação do *TP53* tem como resultado a falha de indução da expressão do gene *P21*. Møller et al. (1999) demonstraram que a expressão da p53 associada a ausência da p21, tem 100% de especificidade e sensibilidade como preditiva de mutação em linfomas não Hodgkin. Villuendras et al. (1997) observaram que esses mesmos linfomas, na presença de mutações do gene *TP53*, apresentavam ausência ou subexpressão da p21 e MDM2, sugerindo que essas mutações estão relacionadas a incapacidade de transativar a p21 e MDM2. Esses pesquisadores propõem que há provável alteração na expressão desse gene, fato esse que resultaria na perda de função da proteína.

Alguns tecidos apresentaram ainda expressão normalizada de *P21* relacionadas tanto com ausência (3/17) como com superexpressão (9/17) de *TP53*. Segundo Schneider (2007), mecanismos que regulam a expressão do *P21* envolvem vias de sinalização tanto dependentes, como independentes de *TP53*. Em células de câncer de ovário humano, foi demonstrado que a indução da expressão do *P21* pode ocorrer por ativação da proteína cinase C em células que não apresentam p53 (AKASHI et al., 1999), sendo essa cinase implicada tanto na regulação positiva como negativa da progressão do ciclo celular, justamente nas fases G₁-S e G₂-M (KAZANIETZ, 2010), ocorrendo principalmente em níveis pós-transcricionais (SCHNEIDER, 2007).

Já em células prostáticas, a expressão do *P21* pode ser aumentada tanto pela ação direta do *TP53* (MACLEOD et al., 1995), como pela ação de androgênios (LING et al., 2001) ou de fatores de crescimento (ROBSON et al., 1999). Assim questionamos se essa expressão normalizada do *P21* no TVT, encontra-se de fato associada com o *TP53*, ou está relacionada com algum outro mecanismo de sinalização independente desse gene, como uma resposta precoce imediata a indutores de diferenciação celular, ou pela presença desregulada de *c-myc*, que leva ao desacoplamento da p21 em G1 (STEINMAN et al., 1994) e cuja alteração já foi demonstrada em TVTs (CHOI; KIM, 2002; LIAO et al., 2003).

Os genes *BAX*, *BCL-2* e *BCL-xL* pertencem à mesma família, que compreende aproximadamente 25 genes. Desde a sua identificação em neoplasias de células B, a superexpressão de *BCL-2* vem sendo observada em diferentes tipos de tumores e linhagens celulares, tanto no homem quanto em animais (DELFINO, 1997; FETT-CONTE; SALLES, 2002; ZHOU et al., 2012; FLÓREZ et al., 2016). Assim, o envolvimento dos membros da família *BCL-2* no câncer tem sido amplamente estabelecido, sendo que tanto a superexpressão como a ausência de regulação foram observadas em diferentes tipos de tumores (MENDELSON et al., 2008).

Para *BCL-2*, apenas uma amostra se mostrou com expressão elevada (QR = 2.3), em seis amostras não houve expressão e em três, subexpressão (QR = 0.44 a 0.46), sendo as demais consideradas com expressão normal (7/17) (QR = 0.5 a 1.9). No cultivo das células, uma amostra apresentou-se com superexpressão (QR = 2.5) e as demais células apresentaram-se normais (2/3) (QR = 0.7 e 0.8).

Da mesma forma, *BCL-xL* apresentou-se normal em duas amostras (QR = 0.7 e 0.9), subexpresso em treze (QR = 0.005 a 0.3) e ausente em outras duas amostras. As células equivalentes a esse gene apresentaram-se subexpressas (1/3) (QR = 0.1) e normais (2/3) (QR = 0.5 e 0.7), respectivamente. As análises estatísticas não evidenciaram diferenças significativas entre os genes *BCL-2* e *BCL-xL* em comparações com as diferentes subcategorias clínicas, e nem entre tecidos e culturas de células no que se diz respeito à *BCL-2* ($P > 0.05$). Contudo, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de *BCL-xL* em amostras teciduais em relação às amostras provenientes de cultivos celulares ($P < 0.05$) (Figura 12).

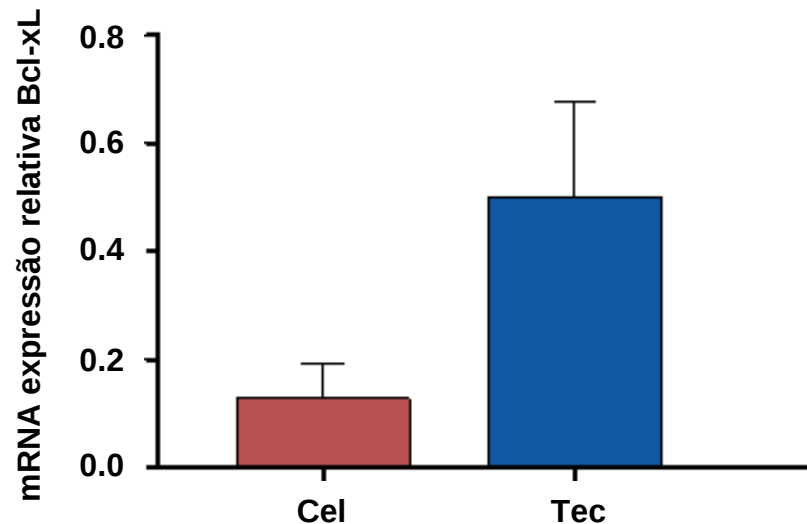


Figura 12. Gráfico da expressão relativa de RNAm de *BCL-xL*, evidenciando diferença estatisticamente significativa entre seus níveis de expressão em amostras teciduais em relação às amostras provenientes de cultivos celulares ($P < 0.05$).

Em TVT, não há relatos até o momento sobre a expressão de *BCL-xL*, entretanto, a expressão da proteína Bcl-2 foi identificada. De acordo com Stockmann et al. (2011), a superexpressão de Bcl-2 ocorre independentemente do estágio de desenvolvimento do tumor. Frenzel et al. (2009) sugeriram que a superexpressão da mesma promoveria a aquisição de funções no tumor, associadas à progressão e a sobrevida. Da mesma forma, Amaral et al. (2011) destacaram que TVTs com menor grau de agressividade possuem alto índice apoptótico, podendo até mesmo apresentar melhor prognóstico.

A diminuição da expressão de *BCL-2*, assim como de *BCL-xL* foi observada em três e treze amostras, respectivamente. Assim, os resultados diferem de Stockmann et al. (2011), que reportaram aumento dessa proteína em TVT. Esses autores afirmam que esse aumento pode estar associado com a sobrevivência de células tumorais, ocasionando seleção celular para adquirir funções associadas à progressão tumoral. No entanto, podem ocorrer ainda interações entre as proteínas da família Bcl-2 e p53 (COLLAVIN et al., 2010).

Em cânceres de mama, *TP53* possui habilidade de sub-regular *BCL-2*. Da mesma maneira, em cânceres de ovário, a expressão de *BCL-2* está inversamente relacionada com a expressão de *TP53* (BASU; HALDAR, 1998). Kumaraguruparan et al. (2006), por outro lado, observaram aumento de *BCL-2*

relacionado com aumento do *TP53* em tumores mamários. No presente estudo, houve aumento do *TP53*, porém sem significância de *BCL-2*. Divergências na expressão de *BCL-2* e *TP53* têm sido descritas ainda em outras pesquisas (BASU; HALDAR, 1998).

No que diz respeito ao *BCL-xL*, aumento da expressão do mesmo já foi relatado em alguns tipos de cânceres (FRIESS et al., 1998; LEITER et al., 2000; GOBÉ et al., 2002; FESIK, 2005). Leiter et al. (2000) observaram expressão aumentada desse gene em metástases de melanoma, indicando que a expressão de *BCL-xL*, assim como de *BCL-2*, aumenta com a progressão da neoplasia. Dessa forma, *BCL-xL* poderia refletir em aumento do potencial de malignidade, causado pela inibição da apoptose, resultando em vantagens de crescimento para as células do melanoma. Da mesma forma, em cânceres pancreáticos, sua expressão aumentada foi associada a menor sobrevida dos pacientes (FRIESS et al., 1998).

No entanto, a mesma situação não foi observada no presente estudo, onde a expressão de *BCL-xL*, assim como de *BCL-2* apresentou-se diminuída, sugerindo que não está havendo apoptose intrínseca no microambiente tumoral. Esse fato pode estar ocorrendo devido a um possível aumento não funcional de p53, pois apesar da alta expressão de *TP53*, isto não indica, necessariamente, que essa proteína está sendo traduzida. Já os níveis de expressão de *BCL-xL* em amostras teciduais apresentou, em sua maioria, valores menores (QR = 0 a 0.05) do que em amostras provenientes de cultivos celulares (QR = 0.1 a 0.7), enfatizando que o microambiente tumoral e seus componentes presentes nas amostras tissulares possivelmente estão influenciando nos níveis de regulação pró e antiapoptóticos.

Outra via apoptótica estimulada por *TP53* é a do *BAX* (LACROIX et al., 2006; CZABOTAR et al., 2014). Sete tecidos manifestaram-se com expressão elevada (QR = 2.3 a 3.7), sendo que os demais apresentaram expressão normal (5/17) (QR = 0.9 a 1.6) e cinco amostras não expressaram o gene, enquanto as expressões das células em cultura se revelaram todas normais (3/3) (QR = 0.8 a 1.2). A análise estatística do gene *BAX* não demonstrou diferença entre os tecidos dos animais quando comparados com as culturas de células e com as diversas subcategorias clínicas ($P > 0.05$).

Na pesquisa, esperava-se elevada expressão deste gene em todos os tecidos que apresentaram elevada expressão do *TP53*, pois este último promove apoptose através da regulação positiva do *BAX*, assim como, regulação negativa de *BCL-2* e *BCL-xL* (HAUPT et al., 2003). Entretanto, esta condição só foi encontrada em sete tecidos.

Dessa forma, as evidências sobre a possibilidade de mutações do *TP53* em TVT se justificam e se intensificam, pois a perda da atividade de *TP53* em células cancerígenas tem sido associada com limitação da produção do *BAX*, e na consequente ativação da apoptose pela via mitocondrial (LIU et al., 2008b).

Segundo Czabotar et al. (2014) a perda de membros pró-apoptóticos, como o Bax, acelera o desenvolvimento tumoral, assim como o bloqueio da apoptose presumidamente promove tumorigênese através da manutenção da sobrevivência celular. Além disso, superexpressão de *BAX* não necessariamente indica que essa molécula esteja sendo traduzida e funcionando corretamente. Assim, precisa-se indagar a respeito dos mecanismos responsáveis pela sobrevivência desse tumor no hospedeiro, dentre eles a apoptose, devido principalmente ao fato de o TVT normalmente não ser a *causa mortis* do animal e apresentar natureza estável diante de outros tipos de cânceres.

No caso do *TGF-β*, foi observada diminuição da sua expressão em quatro amostras tumorais (QR = 0.2 a 0.4), sendo que no restante, houve prevalência da expressão normal (12/17) (QR = 0.5 a 0.9), a exceção de uma amostra que não expressou o gene. As células se apresentaram subexpressas (2/3) (QR = 0.4) e normal (1/3) (QR = 0.5). Com relação às análises estatísticas, não houve diferenças entre os tecidos dos animais quando comparados com as culturas de células ($P > 0.05$). No entanto, houve diferença entre o gene *TGF-β* quando comparado à subcategoria clínica da resposta dos animais ao tratamento com vincristina ($P < 0.05$) (Figura 13).

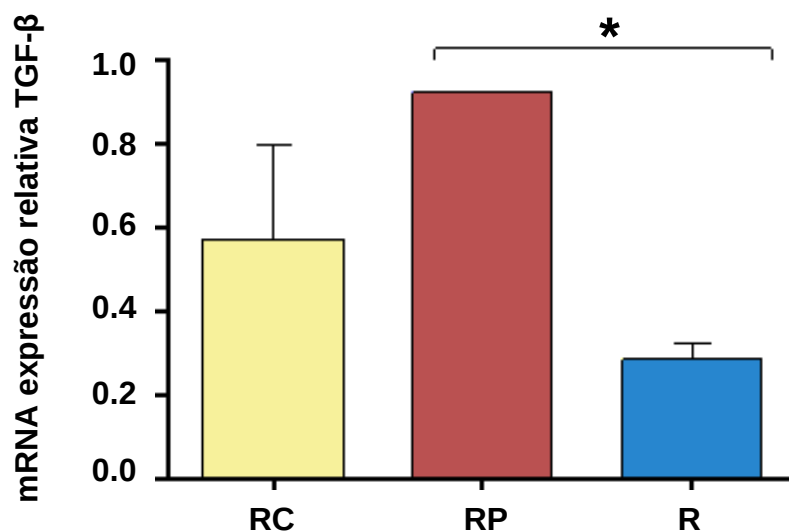


Figura 13. Gráfico da expressão relativa de RNAm de *TGF-β* evidenciando diferença estatisticamente significativa entre os níveis de expressão desse gene quando comparado com a subcategoria clínica da resposta dos animais ao tratamento com vincristina ($P < 0.05$).

Nos estágios iniciais, o TGF- β apresenta habilidade supressora da tumorigênese através da inibição da progressão do ciclo celular e indução da apoptose (BIERIE; MOSES, 2009). A perda da função de inibição de crescimento mediada pelo TGF- β , contribui para o desenvolvimento e a progressão de uma variedade de tumores humanos. O retinoblastoma, o câncer gástrico, o câncer do cólon, o hepatoma e alguns processos malignos das células T e B não respondem à inibição de crescimento comandada pelo TGF- β . Muitos desses tumores contêm mutações inativadoras seja nos receptores do TGF- β , seja nas proteínas Smad e, portanto, são resistentes a inibição do crescimento por TGF- β (LODISH et al., 2002).

O impacto citostático e apoptótico do TGF- β como supressor tumoral, no entanto, foi equilibrado por observações demonstradas de que o TGF- β poderia promover a progressão tumoral através da supressão da vigilância imunológica (BIERIE; MOSES, 2009). Assim, a expressão normal de TGF- β na maioria dos tecidos, inclusive nos animais que exibiram resposta completa (QR = 0.4 a 0.9) ou parcial (QR = 0.9) ao tratamento com o quimioterápico indica, portanto, que esse gene permanece até então, funcional na sua atividade de imunorregulação.

Entretanto, os animais resistentes ao tratamento com vincristina apresentaram expressões diminuídas para o TGF- β (2/17) (QR = 0.2 e 0.3), fato esse que se explicaria pela fisiopatologia do TVT. Hsiao et al. (2008), mostraram que o TGF- β 1 (análogo derivado do tumor) suprime IFN- γ proveniente de TILs, promovendo baixa expressão de MHC classe I e II, e impedindo desta forma, o reconhecimento tumoral pelo sistema imune. Assim, hipotetiza-se que as altas concentrações de TGF- β 1 derivado do tumor estejam suprimindo a expressão de TGF- β real, favorecendo a proliferação e a progressão tumoral nesses casos.

Adicionalmente, por não haver na literatura fatos comparativos para o TVT, outros tipos de câncer foram considerados, de tal forma que os dados desta pesquisa são semelhantes aos descritos por Oda et al. (2012). Esses autores, em estudo envolvendo câncer de mama em mulheres, verificaram associação entre menor expressão de TGF- β com maior tamanho de tumor, assim como associação entre menor expressão dessa citocina com maior número de linfonodos comprometidos, de forma que, o risco de os linfonodos regionais estarem comprometidos é diretamente proporcional ao tamanho do tumor.

Desse modo, as observações sugerem que o TGF- β possui papel ambíguo dentro do microambiente tumoral, funcionando tanto como um supressor quanto como promotor do tumor, dependendo do contexto da sua estimulação (ODA et al., 2012). Portanto, embora o impacto do TGF- β na célula tumoral seja significativo, aceita-se cada vez mais, que a progressão tumoral primária seja regulada por uma complexa rede de interações entre células do tumor e do hospedeiro (ODA et al., 2012).

Já em relação ao *IFN- γ* , quatorze amostras (QR = 0.004 a 0.49) estavam subexpressas, duas normais (QR = 0.5 e 0.7) e um tecido não expressou o gene. Schreiber, Old e Smyth (2011) demonstraram que camundongos deficientes para via de sinalização de *IFN- γ* são mais susceptíveis à formação de tumor quando tratados com agentes carcinogênicos, evidenciando papel direto para o *IFN- γ* na ativação de células específicas que atuam durante a eliminação do tumor. Camundongos deficientes para *IL-12*, linfócitos T citotóxicos ou células NK, além do *IFN- γ* , também desenvolvem tumores em modelos semelhantes, indicando função crucial para o *IFN- γ* na imunidade tumoral (VIOLA; TEIXEIRA; WERNECK, 2004).

Na expressão gênica para a *IL-6*, nove amostras (QR = 0.001 a 0.3) apresentaram-se com expressões diminuídas, sete ausentes e uma normal (QR = 0.7). No TVT a *IL-6* e o *IFN- γ* em sinergismo, podem induzir a expressão de MHC *in vitro* (HSIAO et al., 2008). Quando o nível de *IL-6* secretado por TILs atinge um limiar, inicia-se sua atividade junto com *IFN- γ* permitindo a infiltração de linfócitos na neoplasia, ativando a expressão do MHC classe I e II nas células de TVT e dando início à fase de regressão (STOCKMANN et al., 2011).

No entanto, embora existam suspeitas de que o TVT de ocorrência natural possa regredir após sua instalação no hospedeiro, são escassos os relatos nesse sentido na literatura e, o mesmo dificilmente é observado na clínica médica. Assim, o fato das expressões de *IFN- γ* e de *IL-6* se encontrarem baixas ou ausentes no microambiente tumoral, nessas circunstâncias se justifica, já que não haverá expressão de MHC e nem ativação de células imunes para eliminação do tumor. As análises estatísticas dos genes *IFN- γ* e *IL-6* não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos dos animais quando comparados com as culturas de células, assim como com as diversas subcategorias clínicas ($P > 0.05$).

O receptor CXCR4, juntamente com seu ligante a quimiocina CXCL12, tem mostrado mediar a proliferação e a migração de células tumorais, aumentando assim a angiogênese associada ao tumor (SUN et al., 2013), além da promoção de metástases em diversos tipos cancerígenos (CHEN et al., 2007).

Em tumores de ovário, próstata, esôfago, entre outros, tem-se visto aumento de CXCR4 (DOMANSKA et al., 2013), relacionando-o com maior grau de malignidade. Esse receptor, no entanto, se mostrou diminuído na maior parte dos tecidos (QR = 0.06 a 0.4), com exceção de cinco amostras que apresentaram expressão normal (QR = 0.5 a 0.7) e um tecido ausente.

Nas células em cultura observou-se apenas subexpressão (3/3) (QR = 0.01 a 0.06) e houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de *CXCR4* em amostras teciduais em relação às amostras provenientes de culturas celulares ($P < 0.05$) (Figura 14), sendo que as células apresentaram menores níveis de expressão gênica (QR = 0.01 a 0.06) em relação aos tecidos (QR = 0.06 a 0.7). Isso pode estar relacionado com o fato de que a célula não necessita expressar altos níveis de fatores angiogênicos em um local teoricamente desprovido de concorrência celular, além de não estarem presentes fatores solúveis pró e antiangiogênicos produzidos por várias células do microambiente tumoral, como células hematopoiéticas e fibroblastos.

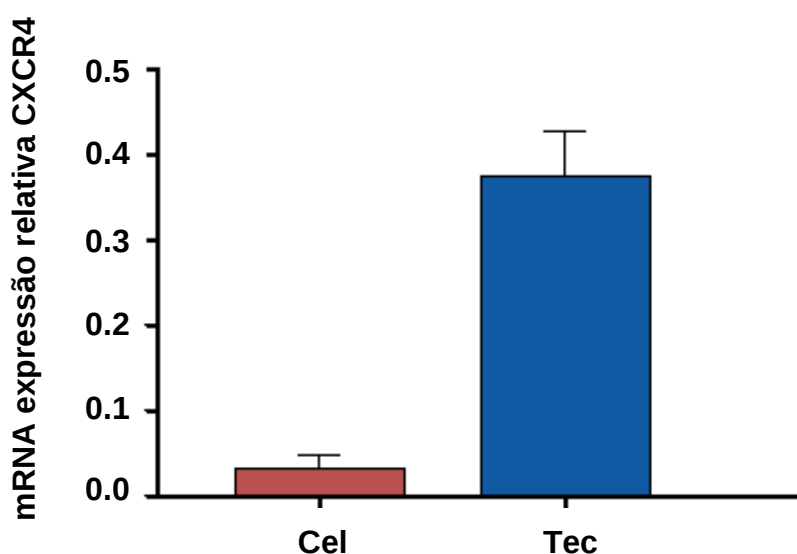


Figura 14. Gráfico da expressão relativa de RNAm de *CXCR4* evidenciando diferença estatisticamente significativa entre seus níveis de expressão em amostras teciduais em relação às amostras provenientes de cultivos celulares ($P < 0.05$).

Embora haja relatos de metástases em TVT e o mesmo seja considerado maligno do ponto de vista citohistológico, devido as características de anisocariose, macrocariose, assim como a presença de mitoses anormais, binucleação, lobulações nucleares, anisocitose, entre outras (AMARAL, 2005), sabe-se que o seu potencial metastático é relativamente baixo – em torno de 1% (TINUCCI-COSTA, 2009) a 17% (MACEWEN, 2001) em tumores de ocorrência natural e 1,5 a 6,0% em transplantações experimentais – fato este que esclareceria a baixa expressão do receptor CXCR4.

Ainda em relação ao processo de angiogênese, este também pode ser estimulado através da regulação da expressão de *VEGF* tanto em células epiteliais, como em fibroblastos, além do fator de transcrição HIF1- α , que controla a homeostase do oxigênio no microambiente celular (FERRARA, 2002; YU; JOVE, 2004) e induz diretamente a expressão de *VEGF* (BOUDREAU; MYERS, 2003).

A expressão de *VEGF* apresentou-se elevada tanto nas amostras teciduais (14/17) (QR = 2.2 a 11.4) como nas células provenientes de cultivo celular (3/3) (QR = 6.2 a 11.5). De acordo com Kabbinavar et al. (2003), Schneider e Miller (2005), Duncan et al. (2008), Rini e Small (2005), Stefanou et al. (2004) e Ugurel et al. (2001), o aumento da expressão de *VEGF* foi associada tanto com a progressão tumoral, como com pior prognóstico em cânceres colorretal, de mama, ovários, renal, pulmonar e melanoma, respectivamente (CAPP et al., 2009).

No entanto, no TVT, acreditamos que a alta expressão de *VEGF* se encontra mais relacionada com as características morfológicas do tumor em si – como alta vascularização, inflamação e friabilidade, necessitando de um grande aporte nutricional para o seu crescimento primário – do que com um estado de prognóstico do paciente, pois os animais convivem com esse tumor durante longos períodos, sem que este normalmente seja a causa do óbito desses animais.

As análises estatísticas, embora não tenham evidenciado diferença estatisticamente significativa entre o gene *VEGF* e as diferentes subcategorias clínicas, mostraram que houve evidência de diferença estatisticamente significativa em comparações entre tecidos e culturas de células ($P < 0.05$), indicando que o microambiente tumoral possivelmente altera o perfil angiogênico nesse tumor.

O gene *RASSF1* se apresentou ausente em seis casos e com subexpressão (QR = 0.001 a 0.029) nos onze demais tecidos. As células isoladas de culturas também exibiram duas amostras com expressões diminuídas (QR = 0.038 e 0.098) e uma amostra com expressão elevada (QR = 12.3), sendo que, de acordo com

Liu et al. (2003), superexpressão de RASSF1A pode induzir a parada da mitose na metáfase com células mitóticas aberrantes, incluindo fusos monopolares ou completa falta de um fuso mitótico em diferentes linhagens celulares – COS-7, 293T, HeLa, A549, LNCaP, NIH/3T3 – podendo influenciar inclusive na adesão e motilidade celular (WEYDEN; ADAMS, 2007).

A análise estatística não demonstrou diferença quanto a *RASSF1* entre os tecidos dos animais quando comparados com as diversas subcategorias clínicas ($P > 0.05$), mas apresentou diferença entre os níveis de expressão gênica em amostras teciduais quando comparadas àquelas de cultivos celulares ($P < 0.01$) (Figura 15), sendo que os tecidos apresentaram menores níveis de expressão gênica (QR = 0 a 0.02) em relação às células (QR = 0.03 a 12.3).

Esse fato pode estar ocorrendo devido à presença de moléculas, como fatores de crescimento no microambiente tumoral, os quais possivelmente se encontram ausentes na cultura celular. Deste modo, pressupõe-se principalmente progressão do estado tumoral nessas amostras, já que RASSF1A regula vários processos biológicos essenciais na célula como controle do ciclo celular, estabilização dos microtúbulos e modulação da apoptose (LIU et al., 2003; SONG et al., 2004; BECKEDORFF, 2012), de forma que esses processos provavelmente encontram-se alterados nesses casos.

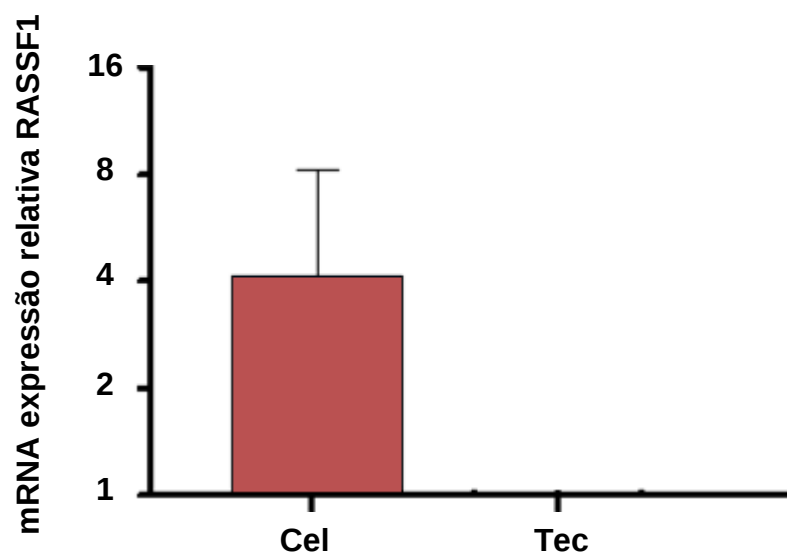


Figura 15. Gráfico da expressão relativa de RNAm de *RASSF1* evidenciando diferença estatisticamente significativa entre seus níveis de expressão em amostras teciduais em relação às amostras provenientes de cultivos celulares ($P < 0.01$).

O gene *RASSF1* pode ser inativado tanto por mecanismos genéticos quanto epigenéticos, e *RASSF1A* é a isoforma mais estudada e a mais comumente inativada epigeneticamente no câncer (NEGRAES, 2007; WEYDEN; ADAMS, 2007; BECKEDORFF, 2012).

A inativação de *RASSF1A* tem sido relacionada principalmente com aumento na metilação específica do gene de agrupamentos de sítios CpG (hipermetilação da ilha CpG) da sua região promotora, silenciando desta forma, a expressão do gene *RASSF1* (HESSON; COOPER; LATIF, 2007). A metilação do DNA envolve a adição de um grupo metila ao carbono 5 da citosina, nas citosinas localizadas imediatamente 5' à guanina (dinucleotídeo de CpG). Apesar de já existirem trabalhos relacionados ao estudo de *RASSF1A*, ainda se faz necessário identificar os fatores regulatórios, bem como as vias regulatórias e os mecanismos subjacentes ao silenciamento epigenético desse gene (BECKEDORFF, 2012).

Strunnikova et al. (2005) sugeriram que a deacetilação da histona H3 e a trimetilação da histona H3K9 antecedem a metilação do DNA durante a progressão da inativação de *RASSF1A* em células do epitélio mamário humano. De maneira similar, Kawamoto et al. (2007) encontraram que as linhagens celulares tumorais de próstata – LNCaP e PC3 – apresentaram silenciamento de *RASSF1A* mediado pela hipermetilação e pelo enriquecimento da marca de histona H3K9me2 ao longo do seu promotor. Um outro trabalho evidenciou ainda, que a repressão transcricional do gene *RASSF1A* em glândulas mamárias durante as fases iniciais da carcinogênese de mama, estava associada com um aumento na trimetilação das histonas H3K9 e H3K27 e metilação do promotor de *RASSF1A* (STARLARD-DAVENPORT et al., 2010; BECKEDORFF, 2012). Assim, esses trabalhos sustentam a ideia de que o silenciamento gênico causado pela metilação do DNA, está intimamente ligado com modificações repressivas de histonas no promotor do gene em células tumorais (BECKEDORFF, 2012).

Análises revelaram ainda que uma grande quantidade de metilação do DNA ocorre seletivamente em alguns genes durante a progressão tumoral (ALBERTS et al., 2010). Segundo Baylin e Ohm (2006), alterações epigenéticas podem iniciar a expansão de células pré-malignas durante as fases iniciais da tumorigênese. Durante as primeiras etapas do desenvolvimento dos cânceres de cólon, de pulmão e de próstata, um subconjunto de células pré-malignas sofrem alterações que lhes permitem mediar o crescimento e a progressão tumoral. Assim, as primeiras mudanças epigenéticas que

ocorrem nestas células, podem determinar as alterações genéticas seguintes, para então promover a progressão destes clones (BAYLIN; OHM, 2006).

Alterações epigenéticas impulsionam ainda a desregulação da expressão de miRNA. As ilhas CpG nos promotores de genes de miRNAs supressores tumorais são frequentemente hipermetilados no câncer, levando assim ao silenciamento epigenético destes miRNAs. O tratamento de células cancerígenas com agentes de desmetilação de DNA, pode reativar a expressão de miRNAs supressores tumorais, como miR-148a, miR-34b, miR-34c e miR-9, que inibem o crescimento de tumores e metástases (LIN; GREGORY, 2015). Sendo assim, é provável que o silenciamento epigenético anormal de genes seja tão importante no desenvolvimento da maioria dos cânceres quanto às mutações nas sequências de DNA (ALBERTS et al., 2010).

Entretanto, além das alterações epigenéticas têm-se descrito também diversas alterações genéticas relacionadas ao *RASSF1A* em células cancerosas. Segundo Kashuba et al. (2009), do total de 144 clones de *RASSF1A* que foram sequenciados, 129 mutações foram detectadas nos exons 1-2. Já nos exons 3-5 onde foram analisados 98 clones, encontraram-se 146 mutações, evidenciando que polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP) ocorrem nesse gene em diferentes neoplasias malignas epiteliais (KASHUBA et al., 2009). Em carcinomas nasofaríngeos, Pan et al. (2005) observaram 35 mutações identificadas em 74% dos casos, incluindo 30 substituições, 3 mutações *nonsense* (*stop codon*) e 2 deleções de pares de bases (*frameshift*), sendo que a maioria dessas mutações resultaram em alterações de aminoácidos.

Dessa forma, considerando nossos resultados, onde se observou tanto ausências como subexpressões relacionados com esse gene, assim como com os demais genes, questiona-se a possibilidade de presença de alterações genéticas e/ou epigenéticas no TVT, principalmente em amostras teciduais, onde foi visualizado uma maior quantidade de inexistência de expressões em relação as células. Assim, considerando-se que não existe conhecimento na literatura a respeito da expressão dos genes selecionados no TVT no presente estudo, mais investigações necessitariam ser realizadas para elucidar tais processos.

Relatos sobre mutações gênicas no TVT vêm se ampliando cada vez mais. Murchison et al. (2014) identificaram uma marca genética no seu ciclo de transmissão de que aproximadamente 40% de todas as mutações foram ocasionadas por exposição à luz ultravioleta do sol. Estudos adicionais, descreveram a presença do rearranjo específico LINE-1/*c-myc* em TVTs de diferentes países (AMARIGLIO et al., 1991;

MURGIA et al., 2006; FONSECA et al., 2012), considerando inclusive essa alteração como sendo marcadora do diagnóstico molecular do TVT.

Adicionalmente, o TVT compartilha uma série de supostas mutações genéticas com alguns cânceres em seres humanos, algumas das quais possivelmente ocorreram no tumor original e, incluem deleção homozigótica do loco *CDKN2A*, perda de homozigose de *SETD2* e um rearranjo envolvendo *ERG* com fusão gênica *NEK1-ERG* (MURCHINSON et al. 2014). Decker et al. (2015), em estudo feito comparando o genoma canino existente com sequências do genoma do TVT, observaram que o TVT compartilha 910.376 substituições somáticas, mais do que até mesmo os mais mutantes cânceres humanos, afetando 2247 genes.

No entanto, esse grupo analisou apenas 2 genomas de TVT, o que dificulta a criação de modelos em relação a taxa de mutação. Dessa forma, mais abordagens a respeito dos diferentes tipos de mutações existentes no TVT necessitam ser investigadas em estudos futuros, a fim de tentar compreender cada vez mais o comportamento biológico desse tumor e das adaptações que o mesmo adquiriu ao longo dos anos; e para elucidar tais processos que ocorrem no presente estudo.

Questiona-se ainda a possibilidade do TVT possuir uma origem policlonal. De acordo com Parsons (2008), a origem do câncer como sendo monoclonal é comumente aceita como um fato pela comunidade científica. No entanto, dados que levaram a aceitação da origem monoclonal, foram reinterpretados de forma que esse fato limita as conclusões originais. A origem do tumor policlonal é consistente com a alta frequência de mutações e lesões genéticas associadas a tumores. A origem do tumor policlonal é consistente com a alta frequência de mutações e lesões genéticas associadas a tumores. Assim, a evolução clonal de células mutantes ocorre durante o desenvolvimento do tumor, sendo que esta evolução pode ser conduzida através da aquisição de fenótipos mutantes (PARSONS, 2008).

Estudos sobre a gênese de tumores exigirá, num futuro próximo, análise simultânea de mutações e alterações epigenéticas, assim como os efeitos sobre as expressões gênicas, além das sinalizações e os papéis de interações entre as células. Assim, estudos sobre esses mecanismos são necessários para identificar quais tipos de células mutantes se complementam, e para determinar como o microambiente tumoral participa da lesão policlonal (PARSONS, 2008).

Parsons (2008) indaga ainda se as células do microambiente tumoral conduzem alguma lesão genética e/ou epigenética contribuindo para o desenvolvimento tumoral,

ou se essas células são do "tipo selvagem". Dessa forma, mais abordagens a respeito do microambiente e da sua influência no desenvolvimento tumoral necessitam ser avaliados, assim como os diferentes fatores que parecem envolver a origem desse tumor. De fato, o TVT conservar uma origem policlonal esclareceria a grande diversidade de expressões gênicas obtidas a partir de tumores provenientes de diferentes animais. Ademais, estudos tem evidenciado cada vez mais origem policlonal em diferentes tipos de cânceres.

Já em relação ao comportamento clínico do tumor, os resultados deste estudo estão de acordo com a literatura, que também descreve maior prevalência do TVT em animais machos, com predominância do subtipo plasmocitóide. Embora o TVT apresente resposta favorável diante do tratamento com a vincristina na maioria dos animais, resistências vêm sendo documentadas ao longo dos anos e, os fatores responsáveis por tal fato permanecem até então desconhecidos, indicando que mais estudos a respeito necessitam ser realizados para elucidar tais processos. No presente estudo, devido à restrita amostragem de animais resistentes e parcialmente resistentes ao tratamento, é possível que a ausência de diferenças estatisticamente significativas dos níveis de expressões gênicas analisadas seja devido a isso, e não a outro aspecto. Portanto, condutas que maximizem a utilização de tais casos, devem ser levadas em consideração.

Por outro lado, estudos a respeito de expressões gênicas, mutações e alterações epigenéticas estão revolucionando a maneira como a biologia e a medicina serão exploradas nos próximos anos e além, assim como a compreensão e a caracterização de diferentes tipos cancerígenos tem o potencial de abrir novas áreas de pesquisa para ampliar o conhecimento sobre a biologia dessas células. No caso do TVT, além do cão ser uma espécie muito mais próxima do homem, também pode proporcionar oportunidades para o desenvolvimento de modelos de estudo para outros cânceres, além de fornecer informações sobre a resposta imune e mecanismos de evasão em diferentes áreas da pesquisa.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Mediante os resultados deste estudo, permite-se concluir que:

- ✓ O cariótipo da cultura de células do TVT apresenta 59 cromossomos, que difere do número conhecido em cães (78);
- ✓ A superexpressão de *TP53* ocorre na maioria dos tecidos e células, o que provavelmente decorre de mutações neste gene;
- ✓ A expressão dos genes *P21*, *BCL-2*, *BCL-xL*, *BAX* e *RASSF1* é variável, fato que pode ocorrer devido a alterações genéticas e/ou epigenéticas no TVT e/ou de eventual origem policlonal;
- ✓ O microambiente tumoral, assim como o sistema imune do hospedeiro, parecem influenciar a tumorigênese e a fase em que o TVT se encontra, assim como a expressão de *IL-6*, *IFN-γ*, *TGF-β*, *CXCR4* e *VEGF*;
- ✓ O TVT possui comportamento evolutivo estável e isso possivelmente se deve às adaptações que o mesmo sofreu ao longo do tempo, fato este que provavelmente depende de suas interações com o microambiente tumoral.

Referências

Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nat. Rev. Cancer**, v.9, n.6, p.400-414, 2009.

ADAMS, E.W.; CARTER L.P.; SAPP, W.J. Growth and maintenance of the canine venereal tumor in continuous culture. **Cancer Res.**, v.28, n.4, p.753-757, 1968.

AGATHANGGELOU, A.; COOPER, W.N.; LATIF, F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. **Cancer Res.**, v.65, n.9, p.3497-3508, 2005.

AKASHI, M.; OSAWA, Y.; KOEFFLER, H.P.; HACHIYA, M. p21^{WAF1} expression by an activator of protein kinase C is regulated mainly at the post-transcriptional level in cells lacking p53: important role of RNA stabilization. **Biochem. J.**, v.337, p.607-616, 1999.

AKHURST, R.J.; HATA, A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.11, n.10, p.790-811, 2012.

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

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010. 1054p.

AMARAL, A.S.; GASPAR, L.F.J.; BASSANI-SILVA, S.; ROCHA, N.S. Cytological diagnostic of transmissible venereal tumor in the Botucatu region, Brazil (descriptive study: 1994-2003). **RPCV**, v. 99, n.551, p.167-171, 2004.

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

AMARAL, A.S.; BASSANI-SILVA, S.; FERREIRA, I.; FONSECA, L.S.; ANDRADE, F.H.E.; GASPAR, L.F.J.; ROCHA, N.S. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. **RPCV**, v.102, p.253-260, 2007.

AMARAL, A.S.; FERREIRA, I.; COLODEL, M.M.; SALVADORE, D.M.F.; ROCHA, N.S. DNA damage in canine transmissible venereal tumor cells. **RLCMV**, v.4, p.1-5, 2011.

* Referências bibliográficas de acordo com os padrões ABNT.

AMARIGLIO, E.N.; HAKIM, I.; BROK-SIMONI, F.; GROSSMAN, Z.; KATZIR, N.; HARMELIN, A.; RAMOT, B.; RECHAVI, G. Identity of rearranged LINE/c-MYC junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.8136-8139, 1991.

ANGELO, L.S.; TALPAZ, M.; KURZOROCK, R. Autocrine interleukin-6 production in renal cell carcinoma: evidence for the involvement of p53. **Cancer Res.**, v.62, n.3, p.932-940, 2002.

BASSANI-SILVA, S.; SFORCIN, J.M.; AMARAL, A.S.; GASPAR, L.F.J.; ROCHA, N.S. Efeito *in vitro* da própolis sobre células do tumor venéreo transmissível canino. **RPCV**, v.102, n.563-564, p.261-265, 2007.

BASU, A.; HALDAR, S. The relationship between Bcl-2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. **Mol. Hum. Repr.**, v.4, n.12, p.1099-1109, 1998.

BAYLIN, S.B.; OHM, J.B. Epigenetic gene silencing in cancer — a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat. Rev. Cancer**, v.6, n.2, p.107-116, 2006.

BECKEDORFF, F.C.F. **Recrutamento do complexo repressivo *polycomb 2* pelo RNA não codificador longo antissenso *ANRASSF1* modula a expressão do gene *RASSF1A* e a proliferação celular.** 2012. 93f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BELOV, K. Contagious cancer: lessons from the devil and the dog. **Bioessays**, v.34, n.4, p.285-292, 2012.

BENADIBA, M. **Análise da expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração de células C6 *in vitro* e *in vivo*, após o tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA) e com um novo complexo dirutênico contendo ibuprofeno (Ru-Ibp).** 2008. 166f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BENJAMIN, L.E.; KESHET, E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, n.16, p.8761-8766, 1997.

BERKMAN, R.A.; MERRILL, M.J.; REINHOLD, W.C.; MONACCI, W.T.; SAXENA, A.; CLARK, W.C.; ROBERTSON, J.T.; ALI, I.U.; OLDFIELD, E.H. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. **J. Clin. Invest.**, v.91, p.153-159, 1993.

BIEGING, K.T.; MELLO, S.S.; ATTARDI, L.D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nat. Rev. Cancer**, v.14, n.5, p.359-370, 2014.

BIERIE, B.; MOSES, H.L. Gain or loss of TGF β signaling in mammary carcinoma cells can promote metastasis. **Cell Cycl.**, v.8, n.20, p.3319-3327, 2009.

BIRCHARD, J.; SHERDING, R. **Clínica de Pequenos Animais – Manual Saunders**. São Paulo: Rocca, 1998. 1029p.

BORSELLINO, N.; BELLDERGRUN, A.; BONAVIDA, B. Endogenous interleukin 6 is a resistance factor for cis-diamminedichloroplatinum and etoposide-mediated cytotoxicity of human prostate carcinoma cell lines. **Cancer Res.**, v.55, n.20, p.4633-4639, 1995.

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

BOUDREAU, N.; MYERS, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. **Breast Cancer Res.**, v.5, n.3, p.140-146, 2003.

BRANDÃO, C.V.S; BORGES, A.G.; RANZANI, J.J.T.; RAHAL, S.C.; TEIXEIRA, C.R.; ROCHA, N.S. Tumor venéreo transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, v.5, p.25-31, 2002.

BRINKHOF, B.; SPEE, B.; ROTHUIZEN, J.; PENNING, L.C. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. **Anal. Biochem.**, v.356, p.36-43, 2006.

BROOKS, C.L.; GU, W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. **Mol. Cell**, v.21, n.3, p.307-315, 2006.

BROWN, L.F.; BERSE, B.; JACKMAN, R.W.; TOGNAZZI, K.; MANSEAU, E.J.; SENGHER, D.R.; DVORAK, H.F. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. **Cancer Res.**, v.53, n.19, p.4727-4735, 1993.

BRUNS, C.J.; LIU, W.; DAVIS, D.W.; SHAHEEN, R.M.; MCCONKEY, D.J.; WILSON, M.R.; BUCANA, C.D.; HICKLIN, D.J.; ELLIS, L.M. Vascular endothelial growth factor is an *in vivo* survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases. **Cancer**, v.89, n.3, p.488-499, 2000.

CAPP, C.; ZENNIG, N.; WAJNER, S.; MAIA, A.L. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **Rev. HCPA**, v.29, p.1-9, 2009.

CASTRO, K.F. **Tumor venéreo transmissível canino – I. Expressão gênica e proteica e caracterização genotípica de DLADQA-1 (MHC-II); II. Estudo imunohistoquímico da resposta imune local**. 2015. 113f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

- CATLETT-FALCONE, R.; LANDOWSKI, T.H.; OSHIRO, M.M.; TURKSON, J.; LEVITZKI, A.; SAVINO, R.; CILIBERTO, G.; MOSCINSKI, L.; FERNÁNDEZ-LUNA, J.L.; NUÑEZ, G.; DALTON, W.S.; JOVE, R. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. **Immunity**, v.10, p.105-115, 1999.
- CATONE, G.; MARINO, G.; POGLAYEN, G.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; ZANGHÌ, A. Canine transmissible venereal tumour parasitized by *Leishmania infantum*. **Vet. Res. Commun.**, v.27, n.7, p.549-553, 2003.
- CHEN, H.; TAN, Y.; CAI, S.; MA, W.; GUO, Z.; DU, J.; CAI, S. The role of SDF-1 and its receptor CXCR4 in tumor metastasis [article in chinese]. **Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi**, v. 24, n.5, p.1180-1183, 2007.
- CHEN, X.; ZHANG, J.; ZHANG, M.; LIU, S.; YAN, W.; JUNG, J.; CHEN, X. Serine 123 phosphorylation modulates p21 protein stability and activity by supressing ubiquitin-independent proteasomal degradation. **J. Biol. Chem.**, v.287, n.41, p.34410-34418, 2012.
- CHIANG, H.; WANG, Y.; CHOU, C.; LIAO, A.T.; CHU, R.; LIN, C. Overexpression of chemokine ligand 7 is associated with the progression of canine transmissible venereal tumor. **BMC Vet. Res.**, v.8, p.216, 2012.
- CHIANG, H.; LIAO, A.T.; JAN, T.; WANG, Y.; LEI, H.; TSAI, M.; CHEN, N.; LEE, C.; LIN, Y.; CHU, R.; LIN, C. Gene-expression profiling to identify genes related to spontaneous tumor regression in a canine cancer model. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.151, p.207-216, 2013.
- CHOI, Y.K.; KIM, C.J. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 gene in canine transmissible venereal tumor. **J. Vet. Sci.**, v.3, n.4, p.285-292, 2002.
- CHOU, P.; CHUANG, T.; JAN, T.; GION, H.; HUANG, Y.; LEI, H.; CHEN, W.; CHU, R. Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.130, p.25-34, 2009.
- CHUNG, D.J.; WONG, A.; HAYASHI, K.; YELLOWLEY, C.E. Effect of hypoxia on generation of neurospheres from adipose tissue-derived canine mesenchymal stromal cells. **Vet. J.**, v.199, p.123-130, 2014.
- COCKRILL, J.M.; BEASLEY, J.N. Transmission of transmissible venereal tumor of the dog to the coyote. **Am. J. Vet. Res.**, v.40, n.3, p.409-410, 1979.
- COHEN, D. Detection of humoral antibody to the transmissible venereal tumour of the dog. **Int. J. Cancer**, v.10, p.207-212, 1972.
- COHEN, D. The transmissible venereal tumor of the dog — a naturally occurring allograft? A review. **Isr. J. Med. Sci.**, v.14, p.14-19, 1978.

- COHEN, D. The canine transmissible venereal tumour: a unique result of tumour progression. **Adv. Cancer Res.**, v.43, p.75-112, 1985.
- COLLAVIN, L.; LUNARDI, A.; DEL SAL, G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. **Cell Death Differ.**, v.17, n.6, p.901-911, 2010.
- COMERTPAY, S.; PASTORINO, S.; TANJI, M.; MEZZAPELLE, R.; STRIANESE, O.; NAPOLITANO, A.; BAUMANN, F.; WEIGEL, T.; FRIEDBERG, J.; SUGARBAKER, P.; KRAUSZ, T.; WANG, E.; POWERS, A.; GAUDINO, G.; KANODIA, S.; PASS, H.I.; PARSONS, B.L.; YANG, H.; CARBONE, M. Evaluation of clonal origin of malignant mesothelioma. **J. Transl. Med.**, v.12, p.301, 2014.
- CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat. Rev. Cancer**, v.2, n.9, p.647-656, 2002.
- COSTA, R.M.A.; MENCK, C.F.M. Genes de reparo de DNA. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. (Eds). **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.43-55.
- CZABOTAR, P.E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.15, p.49-63, 2014.
- DABUS, D.M.M.; TENTRIN, T.C.; BOCARDO, M.; LIMA, G.S.; LOT, R.F.E.; BARIANI, M.H.; ROCHA, N.S. Estudo epidemiológico do tumor venéreo transmissível baseado nos padrões plasmocitóide e linfocitóide em cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça. **Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.**, v.6, n.11, p.1-7, 2008.
- DALLOL, A.; AGATHANGGELOU, A.; FENTON, S.L.; AHMED-CHOUDHURY, J.; HESSON, L.; VOS, M.D.; CLARK, G.J.; DOWNWARD, J.; MAHER, E.R.; LATIF, F. RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics. **Cancer Res.**, v.64, n.12, p.4112-4116, 2004.
- DAMMANN, R.; LI, C.; YOON, J.H.; CHIN, P.L.; BATES, S.; PFEIFER, G.P. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. **Nat. Genet.**, v.25, n.3, p.315-319, 2000.
- DAS, U.; DAS, A.K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Vet. Res. Commun.**, v.24, p.545-556, 2000.
- DECKER, B.; DAVIS, B.W.; RIMBAULT, M.; LONG, A.H.; KARLINS, E.; JAGANNATHAN, V.; REIMAN, R.; PARKER, H.G.; DRÖGEMÜLLER, C.; CORNEVEAUX, J.J.; DECKER, B.; DAVIS, B.W.; RIMBAULT, M.; LONG, A.H.; KARLINS, E.; JAGANNATHAN, V.; REIMAN, R.; PARKER, H.G.; DRÖGEMÜLLER, C.; CORNEVEAUX, J.J.; CHAPMAN, E.S.; TRENT, J.M.; LEEB, T.; HUENTELMAN, M.J.; WAYNE, R.K.; KARYADI, D.M.; OSTRANDER, E.A. Comparison against 186 canid whole-genome sequences reveals survival strategies of an ancient clonally transmissible canine tumor. **Genome Res.**, v.25, n.11, p.1646-1655, 2015.

DELFINO, A.B. O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose — carcinogênese. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 43, n.3, p.173-186, 1997.

DIAS, J.V. **Effet d'un peptide mimant le domaine N-terminal de la thrombospondine-1 sur les propriétés fonctionnelles des progéniteurs endothéliaux in vitro et in vivo: proposition d'un produit de thérapie cellulaire.** 2012. 254f. Tese (Doutorado) – Université Descartes, Paris.

DOMANSKA, U.M.; KRUIZINGA, R.C.; NAGENGAST, W.B.; TIMMER-BOSSCHA, H.; HULS, G.; DE VRIES, E.G.; WALENKAMP, A.M. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. **Eur. J. Cancer**, v.49, p.219-230, 2013.

DONG, C. Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells. **Microbes Infect.**, v.11, n.5, p. 584-588, 2009.

DONNINGER, H.; VOS, M.D.; CLARK, G.J. The RASSF1A tumor supressor. **J. Cell Sci.**, v.120 (Pt 18), p.3163-3172, 2007.

DUNCAN, T.J.; AL-ATTAR, A.; ROLLAND, P.; SCOTT, I.V.; DEEN, S.; LIU, D.T.; SPENDLOVE, I.; DURRANT, L.G. Vascular endothelial growth fator expression in ovarian cancer: a model for targeted use of novel therapies? **Clin. Cancer Res.**, v.14, n.10, p.3030-3035, 2008.

DUNN, L.K.; MOHAMMAD, K.S.; FOURNIER, P.G.; MCKENNA, C.R.; DAVIS, H.W.; NIEWOLNA, M.; PENG, X.H.; CHIRGWIN, J.M.; GUISE, T.A. Hypoxia and TGF-beta drive breast cancer bone metastases through parallel signaling pathways in tumor cells and the bone microenvironment. **PLoS One**, 4:e6896, 2009.

EISMA, R.J.; SPIRO, J.D.; KREUTZER, D.L. Vascular endothelial growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma. **Am. J. Surg.**, v.174, n.5, p.513-517, 1997.

ELLIS, L.M.; HICKLIN, D.J. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. **Nat. Rev. Cancer**, v.8, n.8, p.579-591, 2008.

EPSTEIN, R.; BENNETT, B. Histocompatibility typing and course of canine venereal tumors transplanted into unmodified random dogs. **Cancer Res.**, v.34, p.788-793, 1974.

EPSTEIN, R.J. The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. **Nat. Rev. Cancer**, v.4, n.11, p.901-909, 2004.

ERIKSSON, P.; BRATTSTRÖM, D.; HESSELIUS, P.; LARSSON, A.; BERGSTRÖM, S.; EKMAN, S.; GOIKE, H.; WAGENIUS, G.; BRODIN, O.; BERGQVIST, M. Role of circulating cytokeratin fragments and angiogenic factors in NSCLC patients stage IIIa-IIIb receiving curatively intended treatment. **Neoplasma**, v.53, n.4, p.285-290, 2006.

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

ESTRABAUD, E.; LASSOT, I.; BLOT, G.; ROUZIC, E.L.; TANCHOU, V.; QUEMENEUR, E.; DAVIET, L.; MARGOTTIN-GOGUET, F.; BENAROUS, R. RASSF1C, an isoform of the tumor suppressor RASSF1A, promotes the accumulation of β -Catenin by interacting with β TrCP. **Cancer Res.**, v.67, n.3, p.1054-1061, 2007.

FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nat. Rev. Cancer**, v.2, n.10, p.795-803, 2002.

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. **J. Small Anim. Pract.**, v.41, n.4, p.165-168, 2000.

FESIK, S.W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nat. Rev. Cancer**, v.5, n.11, p.876-885, 2005.

FETT-CONTE, A.; SALLES, A.B. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.24, n.2, p.85-89, 2002.

FLAVELL, R.A.; SANJABI, S.; WRZESINSKI, S.H.; LICONA-LIMÓN, P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . **Nat. Rev. Immunol.**, v.10, n.8, p.554-567, 2010.

FLORENTINO, K.C.; NICACIO, F.D.; BATISTA, J.C.; COSTA, J.L.O.; BISSOLI, E.D.G. Tumor venéreo transmissível cutâneo canino – Relato de caso. **Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.**, v.6, n.11, p.1-6, 2007.

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. **Chile Av. Cienc. Vet.**, v.8, p.61-65, 1993.

FLÓREZ, L.M.M.; ORDÓÑEZ, F.P.; MONTEIRO, S.; BRANDÃO, C.V.S.; ROCHA, N.S. Cytological and clinical staging of transmissible venereal tumour at the Veterinary Hospital of Botucatu. **Rev.Vet. Zoot.**, v.7, n.2, p.1-17, 2013.

FLÓREZ, L.M.M. **Expressão dos genes *MDR-1*, *TP53*, *BCL-2* e *BAX* em tumor venéreo transmissível canino e sua relação com a agressividade e resposta à terapia**. 2014. 97f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

FLÓREZ, M.M.; FÊO, H.B.; DA SILVA, G.N.; YAMATOOGI, R.S.; AGUIAR, A.J.; ARAÚJO, J.P.; ROCHA, N.S. Cell cycle kinetics, apoptosis rates and gene expressions of *MDR-1*, *TP53*, *BCL-2* and *BAX* in transmissible venereal tumour cells and their association with therapy response. **Vet. Comp. Oncol.**, doi: 10.1111/vco.12220, 2016.

- FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Semin. Oncol.**, v.29, n. 6 Suppl 16, p.15-18, 2002.
- FONSECA, L.S.; MOTA, L.S.; COLODEL, M.M.; ROCHA, N.S. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: association between different phenotypes and the insertion LINE-1/c-myc. **RCCP**, v.25, p.402-408, 2012.
- FRANCHIMONT, N.; RYDZIEL, S.; CANALIS, E. Transforming growth factor-beta increases interleukin-6 transcripts in osteoblasts. **Bone**, v.26, n.3, p.249-253, 2000.
- FRANK, S.A.; NOWAK, M.A. Problems of somatic mutation and cancer. **BioEssays**, v.26, n.3, p.291-299, 2004.
- FRANKS, L.M. O que é câncer? In: FRANKS, L.M.; TEICH, N. (Eds). **Introdução à Biologia Celular e Molecular do Câncer**. São Paulo: Roca, 1990. p.1-24.
- FRENZEL, A.; GRESPI, F.; CHMELEWSKI, W.; VILLUNGER, A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. **Apoptosis**, v.14, n.4, p.584-596, 2009.
- FRIESS, H.; LU, Z.; ANDRÉN-SANDBERG, A.; BERBERAT, P.; ZIMMERMANN, A.; ADLER, G.; SCHMID, R.; BÜCHLER, M.W. Moderate activation of the apoptosis inhibitor bcl-xL worsens the prognosis in pancreatic cancer. **Ann. Surg.**, v.228, n.6, p.780-787, 1998.
- FULDA, S.; DEBATIN, K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v.25, n.34, p.4798-4811, 2006.
- FULDA, S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. **Int. J. Cell Biol.**, doi: 10.1155/2010/370835, 2010.
- GANDOTRA, V.K., CHAUHAN, F.S., SHARMA, R.D. Occurrence of canine transmissible venereal tumor and evaluation of two treatments. **Indian Vet. J.**, v.70, n.9, p.854-857, 1993.
- GANGULY, B.; DAS, U.; DAS, A.K. Canine transmissible venereal tumour: a review. **Vet. Comp. Oncol.**, doi: 10.1111/vco.12060, 2013.
- GAO, F.; LIN, Y.; ZHANG, R.R. RNA-DNA differences are rarer in proto-oncogenes than in tumor suppressor genes. **Sci. Rep.**, v.2, p.245, 2012.
- GASPAR, L.F.J.; FERREIRA, I.; COLODEL, M.M.; BRANDÃO, C.V.S.; ROCHA, N.S. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: cell morphology and influence on P-glycoprotein expression. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v.34, n.5, p.447-454, 2010.

GELMINI, S.; MANGONI, M.; CASTIGLIONE, F.; BELTRAMI, C.; PIERALLI, A.; ANDERSSON, K.L.; FAMBRINI, M.; TADDEI, G.L.; SERIO, M.; ORLANDO, C. The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer. **Clin. Exp. Metastasis**, v.26, n.3, p.261-268, 2009.

GIACOMINI, P.; GAMBARI, R.; BARBIERI, R.; NISTICÒ, P.; TECCE, R.; PESTKA, S.; GUSTAFSSON, K.; NATALI, P.G.; FISHER, P.B. Regulation of the antigenic phenotype of human melanoma cells by recombinant interferons. **Anticancer Res.**, v.6, n.5, p.877-884, 1986.

GOBÉ, G.; RUBIN, M.; WILLIAMS, G.; SAWCZUK, I.; BUTTYAN, R. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. **Cancer Invest.**, v.20, n.3, p.324-332, 2002.

GOEL, H.L.; MERCURIO, A.M. VEGF targets the tumour cell. **Nat. Rev. Cancer**, v.13, n.12, p.871-882, 2013.

GRESSER, I.; TOVEY, M.G. Antitumor effects of interferon. **Biochim. Biophys. Acta**, v.516, n.2, p.231-247, 1978.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Apoptosis: programmed cell death. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.

GRUNEWALD, M.; AVRAHAM, I.; DOR, Y.; BACHAR-LUSTIG, E.; ITIN, A.; JUNG, S.; CHIMENTI, S.; LANDSMAN, L.; ABRAMOVITCH, R.; KESHET, E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. **Cell**, v.124, p.175-189, 2006.

GU, Y.J.; ZHU, Y.Y.; LU, X.Y.; ZHAO, Q.; CONG, W.M. Hepatic carcinosarcoma: evidence of polyclonal origin based on microsatellite analysis. **Pathol. Res. Pract.**, v.211, n.12, p.905-910, 2015.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-674, 2011.

HANSEN, M.F.; CAVENEE, W.K. Genetics of cancer predisposition. **Cancer Res.**, v.47, n.21, p.5518-5527, 1987.

HARADA, N.; HATA, H.; YOSHIDA, M.; SONIKI, T.; NAGASAKI, A.; KURIBAYASHI, N.; KIMURA, T.; MATSUZAKI, H.; MITSUYA, H. Expression of Bcl-2 family of proteins in fresh myeloma cells. **Leukemia**, v.12, n.11, p.1817-1820, 1998.

HAUPT, S.; BERGER, M.; GOLDBERG, Z.; HAUPT, Y. Apoptosis — the p53 network. **J. Cell Sci.**, v.116, p.4077-4085, 2003.

HESSON, L.; BIÈCHE, I.; KREX, D.; CRINIERE, E.; HOANG-XUAN, K.; MAHER, E.R.; LATIF, F. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. **Oncogene**, v.23, n.13, p.2408-2419, 2004.

HESSON, L.B.; COOPER, W.N.; LATIF, F. The role of RASSF1A methylation in cancer. **Dis. Markers**, v.23, n.1-2, p.73-87, 2007.

HIGASHIYAMA, M.; DOI, O.; KODAMA, K.; YOKOUCHI, H.; TATEISHI, R. High prevalence of bcl-2 oncoprotein expression in small cell lung cancer. **Anticancer Res.**, v.15, n.2, p.503-505, 1995.

HIGGINS, D.A. Observations on canine transmissible venereal tumour as seen in the Bahamas. **Vet. Rec.**, v.79, p.67-71, 1966.

HITCHON, C.; WONG, K.; MA, G.; REED, J.; LYTTLE, D.; EL-GABALAWY, H. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum.**, v.46, n.10, p.2587-297, 2002.

HSIAO, Y.; LIAO, K.; CHUNG, T.; LIU, C.; HSU, C.; CHU, R. Interactions of host IL-6 and IFN- γ and cancer-derived TGF- β 1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.57, p.1091-1104, 2008.

IKUSHIMA, H.; MIYAZONO, K. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer**, v.10, n.6, p.415-424, 2010.

JAVANBAKHT, J.; PEDRAM, B.; TAHERIYAN, M.R.; KHADIVAR, F.; HOSSEINI, S.H.; ABDI, F.S.; HOSSEINI, E.; MOLOUDIZARGARI, M.; AGHAJANSHAKERI, S.H.; JAVAHERYPOUR, S.; SHAFIEE, R.; EMRANI BIDI, R. Canine transmissible venereal tumor and seminoma: a cytohistopathology and chemotherapy study of tumors in the growth phase and during regression after chemotherapy. **Tumour Biol.**, v.35, n.6, p.5493-5500, 2014.

KABBINAVAR, F.; HURWITZ, H.I.; FEHRENBACHER, L.; MEROPOL, N.J.; NOVOTNY, W.F.; LIEBERMAN, G.; GRIFFING, S.; BERGSLAND, E. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.**, v.21, p.60-65, 2003.

KASHUBA, V.I. PAVLOVA, T.V.; GRIGORIEVA, E.V.; KUTSENKO, A.; YENAMANDRA, S.P.; LI, J.; WANG, F.; PROTOPOPOV, A.I.; ZABAROVSKA, V.I.; SENCHENKO, V.; HARALDSON, K.; ESHCHENKO, T.; KOBLIAKOVA, J.; VORONTSOVA, O.; KUZMIN, I.; BRAGA, E.; BLINOV, V.M.; KISSELEV, L.L.; ZENG, Y.X.; ERNBERG, I.; LERMAN, M.I.; KLEIN, G.; ZABAROVSKY, E.R. High mutability of the tumor suppressor genes *RASSF1* and *RBSP3 (CTDSPL)* in cancer. **PLoS One**, v.4, n.5, p.e523, 2009.

KAWAMOTO, K.; OKINO, S.T.; PLACE, R.F.; URAKAMI, S.; HIRATA, H.; KIKUNO, N.; KAWAKAMI, T.; TANAKA, Y.; POOKOT, D.; CHEN, Z.; MAJID, S.; ENOKIDA, H.; NAKAGAWA, M.; DAHIYA, R. Epigenetic modifications of *RASSF1A* gene through chromatin remodeling in prostate cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.13, n.9, p.2541-2548, 2007.

KAZANIETZ, M.G. Protein kinase C in cancer signaling and therapy. **Biomedical Sciences: Current Cancer Research**. Philadelphia: Springer, 2010. 494p.

KESHGEGIAN, A.A.; JOHNSTON, E.; CNAAN, A. Bcl-2 oncoprotein positivity and high MIB-1 (Ki-67) proliferative rate are independent predictive markers for recurrence in prostate carcinoma. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.110, n.4, p.443-449, 1998.

KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A.D. Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. **Res. Vet. Sci.**, v.87, p.91-96, 2009.

KLOPFLEISCH, R.; KLOSE, P.; GRUBER, A.D. The combined expression pattern of *BMP2*, *LTBP4*, and *DERL1* discriminates malignant from benign canine mammary tumors. **Vet. Pathol.**, v.47, n.3, p.446-454, 2010.

KLUMB, C.E.; JÚNIOR, G.B.C. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfoides. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.24, n.2, p.111-125, 2002.

KOENDERS, M.I.; VAN DEN BERG, W.B. Translational mini-review series on Th17 cells: are T helper 17 cells really pathogenic in autoimmunity? **Clin. Exp. Immunol.**, v.159, n.2, p.131-136, 2010.

KOOL, M.M.; GALAC, S.; KOOISTRA, H.S.; MOL, J.A. Expression of angiogenesis-related genes in canine cortisol-secreting adrenocortical tumors. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.47, p.73-82, 2014.

KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. **Res. Vet. Sci.**, v.81, n.2, p.218-224, 2006.

KUSEWITT, D.F. Neoplasia e Biologia tumoral. In: ZACHARY, J.F.; McGAVIN, M.D. (Eds). **Bases da Patologia em Veterinária**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p.289-321.

LACROIX, M.; TOILLON, R.A.; LECLERCQ, G. p53 and breast cancer, an update. **Endocr. Relat. Cancer**, v.13, n.2, p.293-325, 2006.

LAIRD, A.D.; CHRISTENSEN, J.G.; LI, G.; CARVER, J.; SMITH, K.; XIN, X.; MOSS, K.G.; LOUIE, S.G.; MENDEL, D.B.; CHERRINGTON, J.M. SU6668 inhibits Flk-1/KDR and PDGFR β *in vivo*, resulting in rapid apoptosis of tumor vasculature and tumor regression in mice. **FASEB J.**, v.16, n.7, p.681-690, 2002.

LAOUAR, Y.; SUTTERWALA, F.S.; GORELIK, L.; FLAVELL, R.A. Transforming growth factor- β controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon- γ . **Nat. Immunol.**, v.6, n.6, p.600-607, 2005.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, v.6, n.62, p.1-16, 2005.

LEE, C.H.; KIM, W.H.; LIM, J.H.; KANG, M.S.; KIM, D.Y.; KWEON, O.K. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **J. Vet. Sci.**, v.5, p.63-69, 2004.

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

LEITER, U.; SCHMID, R.M.; KASKEL, P.; PETER, R.U.; KRÄHN, G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. **Arch. Dermatol. Res.**, v.292, p.225-232, 2000.

LEVINE, A.J.; OREN M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nat. Rev. Cancer**, v.9, n.10, p.749-758, 2009.

LIAO, K.W.; HUNG, S.W.; HSIAO, Y.W.; BENNETT, M.; CHU, R.M. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.92, n.3-4, p.149-162, 2003.

LIN, S.; GREGORY, R.I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v.15, n.6, p.321-333, 2015.

LING, M.T.; CHAN, K.W.; CHOO, C.K. Androgen induces differentiation of a human papillomavirus 16 E6/E7 immortalized prostate epithelial cell line. **J. Endocrinol.**, v.170, p.287-296, 2001.

LITO, P.; ROSEN, N.; SOLIT, D.B. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. **Nat. Med.**, v.19, n.11, p.1401-1409, 2013.

LIU, L.; TOMMASI, S.; LEE, D.; DAMMANN, R.; PFEIFER, G.P. Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. **Oncogene**, v.22, n.50, p.8125-8136, 2003.

- LIU, C.C.; WANG, Y.S.; LIN, C.Y.; CHUANG, T.F.; CHEN, M.F.; CHIANG, H.C.; CHU, R.M. Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an *in vivo* canine model of transmissible venereal tumor. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.57, n.4, p.479-491, 2008a.
- LIU, F.S.; JAN, Y.J.; LAI, C.R.; TWU, N.F.; LU, C.H.; HUNG, M.J.; HSIEH, Y.T.; CHIOU, L.C. Expression analysis of apoptosis-related markers TP53, BCL-2, BAX and c-MYC in female genital tract sarcomas. **J. Chin. Med. Assoc.**, v.71, n.12, p. 628-634, 2008b.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DAMELL, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 1084p.
- LORIMIER, L.P.; FAN, T.M. Canine transmissible venereal tumor. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. (Eds). **Small Animal Clinical Oncology**. 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p.799-804.
- LOU, W.; NI, Z.; DYER, K.; TWEARDY, D.J.; GAO, A.C. Interleukin-6 induces prostate cancer cell growth accompanied by activation of Stat3 signaling pathway. **Prostate**, v.42, n.3, p.239-242, 2000.
- MACEWEN, E.G. Transmissible venereal tumor. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. (Eds). **Small Animal Clinical Oncology**. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p.651-656.
- MACLEOD, K.F.; SHERRY, N.; HANNON, G.; BEACH, D.; TOKINO, T.; KINZLER, K.; VOGELSTEIN, B.; JACKS, T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. **Genes Dev.**, v.9, n.8, p.935-944, 1995.
- MANO, Y.; KIKUCHI, Y.; YAMAMOTO, K.; KITA, T.; HIRATA, J.; TODE, T.; ISHII, K.; NAGATA, I. Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer. **Eur. J. Cancer**, v.35, n.8, p.1214-1219, 1999.
- MATHE, E. RASSF1A, the new guardian of mitosis. **Nat. Genet.**, v.36, n.2, p.117-118, 2004.
- MATHIASSEN, I.S.; JÄÄTTELÄ, M. Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. **Trends Mol. Med.**, v.8, n.5, p.212-220, 2002.
- MATIAS, B.F. **Avaliação da resposta imune mediada por macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos em pacientes oncológicos submetidos à imunoterapia com células dendríticas**. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2010.

MENDEL, D.B.; LAIRD, A.D.; XIN, X.; LOUIE, S.G.; CHRISTENSEN, J.G.; LI, G.; SCHRECK, R.E.; ABRAMS, T.J.; NGAI, T.J.; LEE, L.B.; MURRAY, L.J.; CARVER, J.; CHAN, E.; MOSS, K.G.; HAZNEDAR, J.O.; SUKBUNTHERNG, J.; BLAKE, R.A.; SUN, L.; TANG, C.; MILLER, T.; SHIRAZIAN, S.; MCMAHON, G.; CHERRINGTON, J.M. *In vivo* antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. **Clin. Cancer Res.**, v.9, p.327-337, 2003.

MENDELSON, J.; HOWLEY, I.; THOMPSON, G. **The Molecular Basis of Cancer**. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. 757p.

MILLER, W.W.; ALBERT, R.A.; BOOSINGER, T.R. Ocular metastasis of a transmissible venereal tumor. **Canine Practice**, v.15, n.3, p.19-21, 1990.

MIYAHARA, Y.; ODUNSI, K.; CHEN, W.; PENG, G.; MATSUZAKI, J.; WANG, R.F. Generation and regulation of human CD4⁺ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.105, n.40, p.15505-15510, 2008.

MØLLER, M.B.; GERDES, A.M.; SKJØDT, K.; MORTENSEN, L.S.; PEDERSEN, N.T. Disrupted p53 function as predictor of treatment failure and poor prognosis in B cell non-Hodgkin's lymphoma. **Clin. Cancer Res.**, v.5, n.5, p.1085-1091, 1999.

MORO, J.V.; TINUCCI-COSTA, M.; SILVEIRA, A.C.T.; GERARDI, D.G.; ALESSI, A.C. Reactivity of p53 protein in canine transmissible venereal tumor. **Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.**, v.62, n.2, p.318-323, 2010.

MOZOS, E.; MÉNDEZ, A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; MARTÍN DE LAS MULAS, J.; PÉREZ, J. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. **Vet. Pathol.**, v.33, n.3, p.257-263, 1996.

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

MUKARATIRWA, S.; CHIWOME, T.; CHITANGA, S.; BHEBHE, E. Canine transmissible venereal tumour: assessment of mast cell numbers as indicators of the growth phase. **Vet. Res. Commun.**, v.30, n.6, p.613-621, 2006.

MÜLLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N.; CATRON, D.; BUCHANAN, M.E.; MCCLANAHAN, T.; MURPHY, E.; YUAN, W.; WAGNER, S.N.; BARRERA, J.L.; MOHAR, A.; VERÁSTEGUI, E.; ZLOTNIK, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v.410, n.6824, p.50-56, 2001.

- MURCHISON, E.P.; WEDGE, D.C.; ALEXANDROV, L.B.; BEIYUAN, F.; MARTINCORENA, I.; NING, Z.; TUBIO, J.M.C.; WERNER E.I.; ALLEN, J.; NARDI, A.B.; DONELAN, E.M.; MARINO, G.; FASSATI, A.; CAMPBELL, P.J.; 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**, v.343, n.6169, p.437-440, 2014.
- MURGIA, C.; PRITCHARD, J.K.; KIM, S.Y.; FASSATI, A.; WEISS, R.A. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. **Cell**, v.126, n.3, p.477-487, 2006.
- MURPHY, K.M.; RANGANATHAN, V.; FARNSWORTH, M.L.; KAVALLARIS, M.; LOCK, R.B. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. **Cell Death Differ.**, v.7, p.102-111, 2000.
- NEGRAES, P.D. **Padrão de metilação gênica e sua relação com o prognóstico para o carcinoma de células transicionais de bexiga**. 2007. 174f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- NIELSEN, S.W; KENNEDY, P.C. Tumors of the genital systems. In: MOULTON, J.E. (Ed.). **Tumors in Domestic Animals**. 3rd ed. Berkeley: University of California Press, 1990. p.479-517.
- ODA, J.M.M.; OLIVEIRA, K.B.; GUEMBAROVSKI, R.L.; LIMA, K.L.A.; HERRERA, A.C.S.A.; GUEMBAROVSKI, A.L.; SOBRINHO, W.J.; DEROSI, D.R.; WATANABE, M.A.E. TGF- β polymorphism and its expression correlated with CXCR4 expression in human breast cancer. **Mol. Biol. Rep.**, v.39, p.10131-10137, 2012.
- OSHIMURA, M.; SASAKI, M.; MAKINO, S. Chromosomal banding patterns in primary and transplanted venereal tumors of the dog. **J. Natl. Cancer. Inst.**, v.51, n.4, p.1197-1203, 1973.
- OUYANG, H.; FURUKAWA, T.; ABE, T.; KATO, Y.; HORII, A. The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endometrium. **Clin. Cancer Res.**, v.4, n.4, p.1071-1074, 1998.
- OZAKI, T.; NAKAGAWARA, A. p53: The attractive tumor suppressor in the cancer research field. **J. Biomed. Biotechnol.**, p.1-13, 2011.
- ÖZALP, G.R.; ZIK, B.; BASTAN, A.; PEKER, S.; ÖZDEMİR-SALCI, E.S.; BASTAN, I.; DARBAZ, I.; SALAR, S.; KARAKAS, K. Vincristine modulates the expression of Ki67 and apoptosis in naturally occurring canine transmissible venereal tumor (TVT). **Biotech. Histochem.**, v.87, n.5, p.325-330, 2012.
- PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de Biostatística**. São Paulo: Thomson Learning, 2004. 506p.

PALKER, T. J.; YANG, T. J. Detection of immune complexes in sera of dogs with canine transmissible venereal sarcoma (CTVS) by a conglutinin-binding assay. **J. Comp. Pathol.**, v.95, p.247-258, 1985.

PAN, Z.G. KASHUBA, V.I.; LIU, X.Q.; SHAO, J.Y.; ZHANG, R.H.; JIANG, J.H.; GUO, C.; ZABAROVSKY, E.; ERNBERG, I.; ZENG, Y.X. High frequency somatic mutations in RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Biol. Ther.**, v.4, n.10, p.1116-1122, 2005.

PAN, J.; MESTAS, J.; BURDICK, M.D.; PHILLIPS, R.J.; THOMAS, G.V.; RECKAMP, K.; BELPERIO, J.A.; STRIETER, R.M. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. **Mol. Cancer**, v.5, p.56, 2006.

PARK, J.; LEE, M.; CHO, K.; PARL, B.; CHAE, K.; BYUN, D.; RYU, B.; PARK, Y.; CHI, S. Transforming growth factor- β 1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF- κ B, JNK, and Ras signaling pathways. **Oncogene**, v.22, n.28, p.4314-4332, 2003.

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. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.18, p.130-133, 2006.

PARKER, H.G.; OSTRANDER, E.A. Hiding in plain view — an ancient dog in the modern world. **Science**, v.343, n.6169, p.376-378, 2014.

PARSONS, B.L. Many different tumor types have polyclonal tumor origin: Evidence and implications. **Mutat. Res.**, v.659, n.3, p.232-247, 2008.

PÉREZ, J.; DAY, M.J.; MOZOS, E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.64, p.133-147, 1998.

PICKUP, M.; NOVITSKIY, S.; HAROLD, L. MOSES. The roles of TGF β in the tumour microenvironment. **Nat. Rev. Cancer**, v.13, n.11, p.788-799, 2013. Pinho 2005

PINHO, M. **Biologia Molecular do Câncer: Fundamentos para a prática médica**. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. 228p.

PORTER, D.L.; LEVINE, B.L.; KALOS, M.; BAGG, A.; JUNE, C.H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v.365, n.8, p.725-733, 2011.

POWERS, R.D. Immunologic properties of canine transmissible venereal sarcoma. **Am. J. Vet. Res.**, v.29, n.8, p.1637-1645, 1968.

PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nat. Rev. Cancer**, v.11, p.761-774, 2011.

QUEIROZ, E.F.F. **Estudo do potencial antitumoral, *in vitro*, de composto derivado de selênio**. 2016. 93f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

RAJKUMAR, T.; RAJAN, S.; BARUAH, R.K.; MAJHI, U.; SELVALUXMI, G.; VASANTHAN, A. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 protein expression in stage IIB and IIIB squamous cell carcinoma of the cervix. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, v.19, n.6, p.556-560, 1998.

RAM, R.R.; MENDIRATTA, S.; BODEMANN, B.O.; TORRES, M.J.; ESKIOCAK, U.; WHITE, M.A. RASSF1A inactivation unleashes a tumor suppressor/oncogene cascade with context-dependent consequences on cell cycle progression. **Mol. Cell Biol.**, v.34, n.12, p.2350-2358, 2014.

REBBECK, C.A.; LEROI, A.M.; BURT, A. Mitochondrial capture by a transmissible cancer. **Science**, v.331, n.6015, p.303, 2011.

RIBEIRO, I.; ZAPPA, V. Tumor venéreo transmissível em cães. **Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.**, v.6, n.11, p.1-5, 2008.

RIDYARD, A.E.; NUTTALL, T.J.; ELSE, R.W.; SIMPSON, J.W.; MILLER, H.R. Evaluation of Th1, Th2 and immunosuppressive acytokine mRNA expression within the colonic mucosa of dogs with idiopathic lymphocytic-plasmacytic colitis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.86, p.205-214, 2002.

RINI, B.I.; SMALL, E.J. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. **J. Clin. Oncol.**, v.23, p.1028-1043, 2005.

ROBSON, C.N.; GNANAPRAGASAM, V.; BYRNE, R.L.; COLLINS, A.T.; NEAL, D.E. Transforming growth factor-beta1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium. **J. Endocrinol.**, v.160, n.2, p.257-266, 1999.

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

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

ROMAGNOLI, G.G. **Fatores de crescimento e citocinas envolvidos na angiogênese de melanoma em animais selecionados pela intensidade da resposta inflamatória aguda**. 2007. 72f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

RONINSON, I.B. Oncogenic functions of tumour suppressor p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. **Cancer Lett.**, v.179, p.1-14, 2002.

ROSENBERG, S.A. Raising the bar: the curative potential of human cancer immunotherapy. **Sci. Transl. Med.**, v.4, n.127, p.127ps8, 2012.

SÁNCHEZ-SERVÍN, A.; MARTÍNEZ, S.; CÓRDOVA-ALARCON, E.; FAJARDO, R. TP53 polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor. **J. Vet. Sci.**, v.10, n.4, p.353-355, 2009.

SANO, J.; OGUMA, K.; KANO, R.; YAZAWA, M.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. High expression of Bcl-xL in delayed apoptosis of canine neutrophils induced by lipopolysaccharide. **Res. Vet. Sci.**, v.78, p.183-187, 2005.

SANTOS, F.G.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, J.E.S.; CASSALI, G.D.; PAIXAO, T.A.; MORO, L. The canine transmissible venereal tumor – General aspects and molecular approach (Review). **Biosci. J.**, v.21, p.41-53, 2005.

SANTOS, D.E.; SILVA, D.T.; TOLEDO-PINTO, E.A.; LOT, R.F.E. Tumor venéreo transmissível (TVT): Revisão de literatura. **Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.**, v.6, n.10, p. 1-5, 2008.

SCHADLER, K.L.; CROSBY, E.J.; ZHOU, A.Y.; BHANG, D.H.; BRAUNSTEIN, L.; BAEK, K.H.; CRAWFORD, D.; CRAWFORD, A.; ANGELOSANTO, J.; WHERRY, E.J.; RYEOM, S. Immunosurveillance by antiangiogenesis: tumor growth arrest by T cell-derived thrombospondin-1. **Cancer Res.**, v.74, n.8, p.2171-2178, 2014.

SCHENA, M.; LARSSON, L.G.; GOTTARDI, D.; GAIDANO, G.; CARLSSON, M.; NILSSON, K.; CALIGARIS-CAPPIO, F. Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood**, v.79, p.2981-2989, 1992.

SCHNEIDER, B.P.; MILLER, K.D. Angiogenesis of breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, v.23, n.8, p.1782-1790, 2005.

SCHNEIDER, L. **Expressão gênica e protéica de p53 e p21 em fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente.** 2007. 63f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SCHREIBER, R.D.; OLD, L.J.; SMYTH, M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v.331, n.6024, p.1565-1570, 2011.

SIDDLE, H.V.; KAUFMAN, J. Immunology of naturally transmissible tumours. **Immunology**, v.144, p.11-20, 2014.

- SIDKY, Y.A.; BORDEN, E.C. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. **Cancer Res.**, v.47, n.19, p.5155-5161, 1987.
- SILVA, R.L.A. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. (Eds.). **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.29-42.
- SILVA, M.C.V.; BARBOSA, R.R.; SANTOS, R.C.; CHAGAS, R.S.N.; COSTA, W.P. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no Hospital Veterinário da UFERSA. **Acta Vet. Brasilica**, v.1, p.28-32, 2007.
- SOBRAL, R.A.; TINUCCI-COSTA, M.; CAMACHO, A. Ocorrência do tumor venéreo transmissível em cães na região de Jaboticabal. **Ars Vet.**, v.14, p.1-10, 1998.
- SONG, M.S.; SONG, S.J.; AYAD, N.G.; CHANG, J.S.; LEE, J.H.; HONG, H.K.; LEE, H.; CHOI, N.; KIM, J.; KIM, H.; KIM, J.W.; CHOI, E.J.; KIRSCHNER, M.W.; LIM, D.S. The tumour supressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. **Nat. Cell Biol.**, v.6, n.2, p.129-137, 2004.
- SONG, M.S.; SONG, S.J.; KIM, S.Y.; OH, H.J.; LIM, D.S. The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. **EMBO J.**, v.27, n.13, p.1863-1874, 2008.
- SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.33, p.573-596, 2003.
- SOUSA, J.; SAITO, V.; NARDI, A.B.; RODASKI, S.; GUÉRIOS, S.D.; BACILA, M. A survey on the incidence and the therapeutic procedures of the canine transmissible venereal tumor, the sticker's lymphosarcoma. **Arch. Vet. Sci.**, v.5, p.41-48, 2000.
- SRIURANPONG, V.; PARK, J.I.; AMORNPHIMOLTHAM, P.; PATEL, V.; NELKIN, B.D.; GUTKIND, J.S. Epidermal growth factor receptorindependent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. **Cancer Res.**, v.63, n.11, p.2948-2956, 2003.
- STALLER, P.; SULITKOVA, J.; LISZTWAN, J.; MOCH, H.; OAKELEY, E.J.; KREK, W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. **Nature**, v.425, n.6955, p.307-311, 2003.
- STARLARD-DAVENPORT, A; TRYNDYAK, V.P.; JAMES, S.R.; KARPF, A.R.; LATENDRESSE, J.R.; BELAND, F.A.; POGRIBNY, I.P. Mechanisms of epigenetic silencing of the *Rassf1a* gene during estrogen-induced breast carcinogenesis in ACI rats. **Carcinogenesis**, v.31, n.3, p.376-381, 2010.

STEFANOU, D.; BATISTATOU, A.; ARKOUMANI, E.; NTZANI, E.; AGNANTIS, N.J. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and non-small-cell lung carcinomas. **Histol. Histopathol.**, v.19, p.37-42, 2004.

STEHLE, M.E.; HANCZARUK, M.; SCHWARZ, S.C.; GÖBEL, T.W.; MUELLER, R.S. Effects of polyunsaturated fatty acids on isolated canine peripheral blood mononuclear cells and cytokine expression (IL-4, IFN- γ , TGF- β) in healthy and atopic dogs. **Vet. Dermatol.**, v.21, p.112-117, 2010.

STEINMAN, R.A.; HOFFMAN, B.; IRO, A.; GUILLOUF, C.; LIEBERMANN, D.A.; EL-HOUSEINI, M.E. Induction of p21^(WAF-1/CIP1) during differentiation. **Oncogene**, v.9, n.11, p.3389-3396, 1994.

STOCKMANN, D.; FERRARI, H.F.; ANDRADE, A.L.; LOPES, R.A.; CARDOSO, T.C.; LUVIZOTTO, M.C.R. Canine transmissible venereal tumours: aspects related to programmed cell death. **BJVP**, v.4, p.67-75, 2011.

STRAKOVA, A.; MURCHISON, E.P. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. **BMC Vet. Res.**, v.10, p.168, 2014.

STRAKOVA, A., MURCHISON, E.P. The cancer which survived: insights from the genome an 11000 year-old cancer. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.30, p.49-55, 2015.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, A. The cancer genome. **Nature**, v.458, n. 9, p.719-724, 2009.

STRUNNIKOVA, M.; SCHAGDARSURENGIN, U.; KEHLEN, A.; GARBE, J.C.; STAMPFER, M.R.; DAMMANN, R. Chromatin inactivation precedes de novo DNA methylation during the progressive epigenetic silencing of the RASSF1A promoter. **Mol. Cell Biol.**, v.25, n.10, p.3923-3933, 2005.

SU, X.; Y.E, J.; HSUEH, E.C.; ZHANG, Y.; HOFT, D.F.; PENG, G. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. **J. Immunol.**, v.184, n.3, p.1630-1641, 2010.

SUI, X.; JIN, L.; HUANG, X.; GENG, S.; HE, C.; HU, X. p53 signaling and autophagy in cancer A revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. **Autophagy**, v.7, n.6, p.565-571, 2011.

SUN, X.; CHARBONNEAU, C.; WEI, L.; YANG, W.; CHEN, Q.; TEREK, R.M. CXCR4-targeted therapy inhibits VEGF expression and chondrosarcoma angiogenesis and metastasis. **Mol. Cancer Ther.**, v.12, n.7, p.1163-1170, 2013.

SUZUKI, K.; MATSUBARA, H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. **J. Biomed. Biotechnol.**, doi: 10.1155/2011/978312, 2011.

THIERY, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat. Rev. Cancer**, v.2, n.6, p.442-454, 2002.

THLIVERIS, A.T.; SCHWEFEL, B.; CLIPSON, L.; PLESH, L.; ZAHM, C.D.; LEYSTRAS, A.A.; WASHINGTON, M.K.; SULLIVAN, R.; DEMING, D.A.; NEWTON, M.A.; HALBERG, R.B. Transformation of epithelial cells through recruitment leads to polyclonal intestinal tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.110, n.28, p.11523-11528, 2013.

TING, J.P.; BALDWIN, A.S. Regulation of MHC gene expression. **Curr. Opin. Immunol.**, v.5, p.8-16, 1993.

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

TINUCCI-COSTA, M. Tumor venéreo transmissível. In: DALECK, C.R.; NARDI, A.B.; RODASKI, S. (Eds). **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2009. p.540-555.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 587p.

TOKUMOTO, M.; TSURUYA, K.; FUKUDA, K.; KANAI, H.; KUROKI, S.; HIRAKATA, H.; IIDA, M. Parathyroid cell growth in patients with advanced secondary hyperparathyroidism: vitamin D receptor and cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v.18, Suppl 3:iii9-12, 2003.

TSUCHIDA, S.; KAGI, A.; TAKAHASHI, T. Characterization of cDNA and genomic sequences encoding a canine chemokine receptor, CXCR4 and its ligand CXCL12. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.116, n.3-4, p.219-225, 2007.

TURLEY, S.J.; CREMASCO, V.; ASTARITA, J.L. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. **Nat. Rev. Immunol.**, v.15, n.11, p.669-682, 2015.

UGUREL, S.; RAPPL, G.; TILGEN, W.; REINHOLD, U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. **J. Clin. Oncol.**, v.19, p.577-583, 2001.

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 de apresentação clínico-patológicas. **Clin. Vet.**, v.6, n.32, p.32-38, 2001.

VÁZQUEZ-MOTA, N.; SIMÓN-MARTÍNEZ, J.; CÓRDOVA-ALARCON, E.; LAGUNES, L.; FAJARDO, R. The T963C mutation of TP53 gene does not participate in the clonal origin of canine TVT. **Vet. Res. Commun.**, v.32, p.187-191, 2008.

VELDHOEN, N.; STEWART, J.; BROWN, R.; MILNER, J. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene**, v.16, n.2, p.249-255, 1998.

VILLUENDAS, R.; PEZZELLA, F.; GATTER, K.; ALGARA, P.; SÁNCHEZ-BEATO, M.; MARTÍNEZ, P.; MARTÍNEZ, J.C.; MUÑOZ, K.; GARCÍA, P.; SÁNCHEZ, L.; KOCIALKOWSKY, S.; CAMPO, E.; ORRADRE, J.L.; PIRIS, M.A. p21^{WAF1/CIP1} and MDM2 expression in non-Hodgkin's lymphoma and their relationship to p53 status: a p53+, MDM2-, p21- immunophenotype associated with missense p53 mutations. **J. Pathol.**, v.181, p.51-61, 1997.

VIOLA, J.P.B.; TEIXEIRA, L.K.; WERNECK, M.B.F.P. Imunologia Tumoral. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. (Eds). **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.105-112.

WEYDEN, L.; ADAMS, D.J. The Ras-association domain Family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1776, p.58-85, 2007.

WIEBKE, E.A.; CUSTER, M.C.; ROSENBERG, S.A.; LOTZE, M.T. Cytokines alter target cell susceptibility to lysis: I. Evaluation of non-major histocompatibility complex-restricted effectors reveals differential effects on natural and lymphokine-activated killing. **J. Biol. Response Modif.**, v.9, n.2, p.113-126, 1990.

WOLF, D.; ROTTER, V. Inactivation of p53 gene expression by an insertion of Moloney murine leukemia virus-like DNA sequences. **Mol. Cell Biol.**, v.4, n.7, p.1402-1410, 1984.

YE, D.; LI, H.; QIAN, S.; SUN, Y.; ZHENG, J.; MA, Y. Bcl-2/bax expression and p53 gene status in human bladder cancer: relationship to early recurrence with intravesical chemotherapy after resection. **J. Urol.**, v.160, p.2025-2028, 1998.

YU, H.; JOVE, R. The stats of cancer — new molecular targets come of age. **Nat. Rev. Cancer**, v.4, n.2, p.97-105, 2004.

ZHENG, H.; FU, G.; DAI, T.; HUANG, H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.50, n.3, p.274-280, 2007.

ZHOU, H.; CHEN, J.; MEAGHER, J.; YANG, C.; AGUILAR, A.; LIU, L.; BAI, L.; CONG, X.; CAI, Q.; FANG, X.; STUCKEY, J.; WANG, S. Design of Bcl-2 and Bcl-xL inhibitors with subnanomolar binding affinities based upon a new scaffold. **J. Med. Chem.**, v.55, n.10, p.4664-4682, 2012.

Trabalho

Científico

Trabalho a ser enviado para a revista
“Veterinary Immunology and Immunopathology”

Does the Tumor Microenvironment alter tumorigenesis and clinical response in Transmissible Venereal Tumor in Dogs?

Haline B. Fêo¹, Luis M.M. Flórez^{1,2}, Ricardo S. Yamatogi³, Anderson P. Duzanski^{1,6}, João P.A. Júnior⁴, Rogério A. Oliveira⁵, Noeme S. Rocha¹

¹ Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP – Brazil

² Veterinary Pathology Research Group, Faculty of Agricultural Sciences, Universidad de Caldas, Manizales – Colombia

³ Department of Veterinary Medicine, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa, MG – Brazil

⁴ Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP – Brazil

⁵ Department of Biostatistics, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP – Brazil

⁶ Department of Pathology, Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP – Brazil

*** Correpondent Author**

Email address: halinebf@hotmail.com

Department of Veterinary Clinics, Faculty of Veterinary Medicine, UNESP,
Botucatu, SP – Brazil, AC Rubião Junior, 18618-970 – Botucatu, SP – Brazil –
Post Office Box: 581



VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY

An International Journal of Comparative Immunology

DESCRIPTION

The journal reports basic, comparative and clinical immunology as they pertain to the animal species designated here: livestock, poultry, and fish species that are major food animals and companion animals such as cats, dogs, horses and camels, and wildlife species that act as reservoirs for food, companion or human infectious diseases, or as models for human disease.



Original research papers: These should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. Full-length articles should conform to the traditional format with headings for Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion section.

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. **Introduction:** State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. **Material and methods:** Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. **Results:** Results should be clear and concise. **Discussion:** This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. **Conclusions:** The

main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. **Abstract:** A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Your abstract should not be longer than 400 words. **Keywords:** Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. **Graphical abstract:** Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. **Abbreviations:** A number of standard accepted abbreviations can be used in the body of a manuscript without further explanation, but must be explained if used in the **Title or Abstract:** Non-standard abbreviations should be explained when first used in the Abstract, and again when first used in the body of a manuscript, and should also be explained in an abbreviations list to follow the list of keywords. **Acknowledgements:** Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. **Funding:** List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. **Units:** Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. **Reference Style:** All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)". If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author.

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

Does the tumour microenvironment alter tumorigenesis and clinical response in transmissible venereal tumour in dogs?

Haline B. Fêo¹, Luis M.M. Flórez^{1,2}, Ricardo S. Yamatogi³, Anderson P. Duzanski^{1,6}, João P.A. Júnior⁴, Rogério A. Oliveira⁵, Noeme S. Rocha¹

* Correspondent author

Email adress: halinebf@hotmail.com

Abstract

The canine transmissible venereal tumor (CTVT) is a transmissible cancer that is spread naturally between dogs, with the ability to develop and evade the immune system, despite strict immune surveillance of the host. Furthermore, molecular signaling between cells of the immune system and the tumor microenvironment appear to influence the behavior and development of the tumor. Thus, this study aimed to quantify the expression of genes related to the immune system such as *IL-6*, *IFN- γ* , and *TGF- β* , as well as angiogenic factors (*VEGF*, *CXCR4*), in CTVT cells *in vivo* and *in vitro* (primary culture), correlating with the clinical response of the animals treated with vincristine. As expected, the most prevalent subtype was plasmacytoid cells, although lymphocytic cells were also found, indicating the possibility of polyclonality. When we compared the gene expressions of *IFN- γ* and *IL-6*, we mostly found low expression, concluding that MHC expression was probably not occurring in tumor cells, and no activation of immune cells to eliminate the tumor. The *TGF- β* gene was normal in the majority of animals but demonstrated decreased expression in vincristine resistant animals, leading to the hypothesis that the concentration of tumor-derived TGF- β was affecting and even suppressing the real TGF- β expression, favoring tumor proliferation and progression in these cases. *VEGF* expression was extremely high, demonstrating its angiogenic role in tumor growth, while *CXCR4* was decreased, possibly because of CTVT's low metastatic potential. Thus, we concluded that the tumor microenvironment, together with the immune system of the host, influences CTVT, presumably altering its tumorigenesis and the animal's clinical response to treatment.

Keywords: cancer, tumour microenviroment, CTVT, dog

1. Introduction

The majority of cancers arise as a result of cumulative mutations in somatic cells during the life of an organism and constitute a clonal expansion of transformed cells with the host-derived genotype (Stratton et al., 2009).

Cancer is considered monoclonal when all tumor cells can be traced to a single progenitor cell and/or initiator. Alternatively, polyclonal malignancy derives from the concurrent processing of two or more genetically distinct cells and does not provide any indication of a common origin (Comertpay et al., 2014). Although the monoclonal origin is most widely accepted in the scientific universe, studies have suggested that some types of cancer may have a polyclonal origin (Thliveris et al., 2013; Gu et al., 2015).

In vertebrates, tumors are not generally contagious or transmitted to others, as they are usually targets of immune recognition (Belov, 2012). To become transmissible, cancer needs to develop abilities to support the physical transmission of its cells and escape from the host immune system. Once transmissible, cancer must acquire a genomic configuration that affords a long life without inducing the death of the host (Strakova and Murchison, 2015).

The tumor microenvironment has increasingly been shown to influence neoplastic development and progression processes. Components such as fibroblasts, inflammatory leukocytes, endothelial cells from blood and lymphatic vessels, and the extracellular matrix (ECM) (Carvalho et al., 2015), can together support the modulation of gene expression, morphology, classification, degree of aggressiveness, tumor prognosis, and responses to the therapeutic protocol (Mendelsohn et al., 2008; Álvaro et al., 2010). Furthermore, there is molecular signaling between the tumor microenvironment and immune system cells. Instead of protection against neoplastic cells, this interaction begins to facilitate the evolution of the neoplastic process by immune system cells (Carvalho et al., 2015).

The canine transmissible venereal tumor (CTVT) attracts the interest of researchers in oncology because of its various characteristics, including a controversial origin (Mozos et al., 1996; Mukaratirwa; Gruys, 2003), questionable spontaneous regression (Tinucci-Costa, 2009), and resistance to chemotherapy (Boscos et al., 1999), in addition to which it provides an excellent research model for comparative malignancy (Belov, 2012).

CTVT cells have the particularity of implanting in mucous tissue when they lose their integrity (Stockmann et al., 2011), at which point the tumor proliferates and may even develop metastases (Ganguly et al., 2013). The mechanism by which implantation occurs is still uncertain, however, it is known that the reduction in immune defense can greatly contribute to the process, since tumor transference is only possible between animals that share the same MHC or when immunity is affected (Murgia et al., 2006).

Once established, the clinical manifestation may present in solitary or multiple forms, preferably in the external genitalia (Santos et al., 2008), although it can be found in the nasal or oral cavity, conjunctival mucosa, and skin (Park et al., 2006), and its subtype can have a lymphocytoid or plasmacytoid aspect. The cells with a lymphocytic aspect are small and have a regular shape with a round nucleus, which has coarse chromatin and one or two nucleoli. The cytoplasm is sparse and finely granulated, with vacuoles in the cell periphery, while the cells with a plasmacytoid aspect are bulky and present an irregular contour, with an eccentric nucleus and abundant cytoplasm (Amaral et al., 2007).

Both clinical phases of regression and progression of CTVT have been described and the recommended treatment is a weekly application of vincristine sulfate as a single agent (four to eight intravenous shots), although some animals present resistance (Flórez et al., 2016a). In the initial regression phase the presence of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) can be observed, which are diffusely distributed or associated with connective stroma (Liao et al. 2003; Mukaratirwa et al., 2006), while in the final regression phase there is tumor parenchyma collapse and the presence of apoptotic figures (Mukaratirwa et al., 2006).

Hisao et al. (2008) showed that CTVT cells produce transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) which inhibits the activity of natural killer cells (NK), favoring, in this case, the progression phase. However, the suppressive effect of TGF β 1 on NK cell activity can be balanced by the effect of interleukin-6 (IL-6) secreted by tumor lymphocytes. IL-6 in synergy with interferon- γ (IFN- γ) can induce the expression of MHC by the CTVT cells *in vitro* and *in vivo* (Hsiao et al., 2008). In the latter case, MHC is induced by the presence of IL-15 (Chou et al., 2009).

IL-6 can also be induced by SDF-1 α – stromal cell-derived factor 1 α – also known as CXCL12 chemokine, which together with its receptor CXCR4, have been shown to mediate the proliferation and migration of tumor cells, thereby increasing

tumor-associated angiogenesis (Sun et al., 2013), and promoting metastasis in many cancer types (Chen et al., 2007).

Furthermore, hypoxia is a powerful stimulus for the angiogenesis process (Hitchon et al., 2002), having the ability to over-regulate CXCR4 and CXCL12. Consistent with this, CXCR4 can also be over-regulated by VEGF, a potent angiogenic promoter in tumor cells, enhancing the process of invasion (Epstein, 2004).

Thus, this study aimed to observe if there are differences in the expression of cytokines related to the immune system, such as *IL-6*, *IFN- γ* , and *TGF- β* , as well as angiogenic factors (*VEGF*, *CXCR4*) in CTVT cells *in vivo* and *in vitro* (primary culture). These factors are important to understand tumor behavior and its relationship with the host immune system, helping in monitoring and the prognosis of the patient.

2. Material and methods

2.1 Ethics Committee

All animals and methods involving the animals in this study were in agreement with the approval of the Ethics Committee on Animal Use (CEUA), Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu — UNESP (Protocol 81/2014).

The experimental protocol included an epidemiological study based on information from the owners on the medical history, behavioural habits, and reproductive history of the animals, as well as contact with other dogs and population density in the living area. Similarly, information was obtained about previous treatments, including doses and application dates.

2.2 Tumour Collection

Once a CTVT diagnosis had been confirmed, the animals were anesthetized for total cleansing of the tumor site, where sample collection was carried out by incisional biopsy, obtaining fragments of approximately 1cm³. All samples were taken from the patients before chemotherapy. The samples were stored in saline and phosphate solution (PBS) pH 7.4 and in RNA Later (Qiagen, Venlo, Limburg, the Netherlands) in the Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science — UNESP — Botucatu until processing of the material. To verify that tissues and culture cells coming from as pertaining to CTVT, samples were subjected to

immunocytochemistry as well as analyses of chromosome numbers in the Animal Genetics Laboratory of the Institute of Biosciences UNESP — Botucatu (Flórez et al., 2016b).

2.3 Analysis of biological behavior

The biological behavior was based on cytological and histological analysis of the tumor phase at the time of collection and subsequently on the clinical response of the animals to treatment with chemotherapy.

Cytological preparations were fixed with methyl alcohol (5 minutes) and stained with Giemsa (May Grünwald Giemsa 2%) for 20 minutes. A minimum of 100 cells per blade (two) were analyzed by light microscopy at 400x magnification for the diagnosis and classification of the tumors according to the characteristics of the predominant cell type, these being plasmacytoid, lymphocytoid, or mixed as described by Amaral et al. (2007).

The lymphocytoid group has a predominance of 60% or more of small cells with a regular shape and round nucleus, which has coarse chromatin and one or two nucleoli. The cytoplasm is sparse and finely granulated, with vacuoles in the cell periphery. In the plasmacytoid group, the cells are bulky and present an irregular contour, with eccentric nuclei and abundant cytoplasm. The mixed group presents a mixture of the two cell types, not exceeding 59% of the total (Amaral et al., 2007).

The analysis of tumor stage was carried out from tissue sections stained with hematoxylin-eosin (HE) as follows: progressive stage (Intense cellularity immersed in delicate stroma), initial regressive stage (Evidence of moderately stromal tissue), and final regressive stage (Intense stromal tissue forming bands between tumor cells). These criteria have previously been employed by Mukaratirwa and Gruys (2003) and Stockmann et al. (2011). To examine these samples an optical microscope was used Carl Zeiss, LAb A1, Germany, objective 10X, and the images were captured with AxioVision program 4.8 software at 200x magnification, for subsequent measurement of the areas and classification of the tumor progression stage.

For analysis of the clinical response of the animals to the chemotherapy treatment three categories were established: complete response (CR) when the duration of the treatment for complete tumor regression did not exceed four weeks; partial response (PR), when there was a regression in tumor size of 50% or less after four

weeks, and resistant (R) in the case of animals that were required to change the treatment protocol. For this, all dogs received the same treatment protocol, with weekly intravenous infusion of vincristine sulfate at a dosage of 0.75 mg/m² body surface. The duration of chemotherapy ranged from 4 to 8 weeks. Animals were monitored throughout the treatment period.

2.4 CTVT Primary culture

CTVT cell cultures were performed according to the protocol described by Bassani-Silva et al. (2007), Hasio et al. (2008), and Flórez et al. (2016a). Thus, aseptic fragments of CTVT, placed in saline PBS pH 7.4 (Invitrogen, Life Technology, Waltham, MA, USA), were transported to the Laboratory for *in vitro* Fertilization and Cellular Cultures in the Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology FMVZ — UNESP, Botucatu Campus.

There, samples were transferred to a trypsin solution (TrypLE Select – Invitrogen, Life Technology) at 37.5°C, and kept for 40 minutes with a magnetic homogenizer. Subsequently, the solution was centrifuged (820g, 4°C, 25 min) discarding the supernatant. The pellet was resuspended and conditioned in two 25 cm flasks (Sarstedt – Germany) with 5 ml of DMEM high glucose culture (Dulbecco's modified essential medium – Gibco). This material was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco Life Technologies), with a combination of 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Life technologies – Gibco) and 3 µg/ml amphotericin B (Life technologies – Gibco).

Next, samples were maintained in a CO₂ incubator at 5%, 95% humidity, and a temperature of 37.5°C. Cell viability and concentration were assessed by an exclusion test using trypan blue, and cells resuspended in DMEM high glucose culture (DMEM – Gibco, Life Technologies). It is important to highlight that to verify that cells coming from cultures pertained to CTVT (Figure 1), samples were subjected to analysis of chromosome numbers in the Animal Genetics Laboratory of the Institute of Biosciences of UNESP (Figure 2).

2.6 Real time PCR (RT-qPCR)

RNA extraction was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. After being purified, the RNA was treated with RQ1

RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA) for 30 min at 37°C to avoid false positive results arising from the genomic DNA amplification. The quality of the extracted RNA was evaluated on 2% agarose gel stained with ethidium bromide and analyzed using the equipment NanoVue (GE Healthcare). The samples were stored in a freezer at -80°C.

The complementary DNA (cDNA) synthesis was performed with 1 µg of RNA using the kit High Capacity (Applied Biosystems). The reaction was performed with 6 µL of Random Primer (10x), 6 µL of RT buffer (10x), 2.5 µL dNTPs (25x), 3 µL of MultiScribe (50 U/µL), and RNase-free H₂O, according to the manufacturer's protocol. The reaction was incubated at 25°C for 10min, then 37°C for 120 min, and finally stored at 4°C. Samples were kept at a temperature of -20°C.

The qPCR steps were performed in an automatic thermocycler (ABI Prism 7500 Sequence Detection System FAST, Applied Biosystems). A sequence amplification of primers is detailed in Table 1. The qPCR reaction consisted of 4 µL of sample cDNA, 200 nM of each primer, 10 µL GoTaq qPCR Master Mix (Promega, USA) and nuclease-free water, giving a final volume of 20 µL.

The reaction conditions for all genes were: initial denaturation 95°C for 2min, followed by 40 cycles of amplification (95°C for 15 seconds for denaturation, 60°C for annealing, and 1 min for extension) and the dissociation curve (95°C for 15s, 60°C for 30s, and 95°C for 15s). As a negative control, nuclease-free water was used in place of the sample. The relative standard curve for each gene was generated using serial dilutions of cDNA regarded as a reference sample. The lowest dilution of the standard was considered as a relative value of 100. Following serial dilutions of 1/10, the three points were 10, 1, 0.1.

The relative concentration of the studied genes was normalized according to Larionov et al. (2005), through the most stable endogenous control from the endogenous genes tested (RPS5, RPS19, and ACTB) according to Brinkhof et al. (2006). All reactions were performed in duplicate. A QR value < 0.5 was defined as decreased expression, whereas QR > 2.0 was considered increased expression.

2.7 Statistical analysis

For statistical analysis, non-parametric tests of Wilcoxon (two independent samples) were used. The results of the gene expressions obtained from tissue were

compared to the expression of the same genes obtained from *in vitro* assays. The medians for each group were compared and statistically significant differences were considered when the test p-value was below the significance level of 0.05 ($P < 0.05$).

For analysis of the animal's response to treatment with vincristine, we used the nonparametric Kruskal-Wallis test that considered three variables (CR, PR, and R). Statistical analyses were performed in the SAS statistical program.

3. Results and discussion

3.1 Clinical behavior

The material used in this study was obtained from dogs from the Botucatu region attended at the Veterinary surgery and clinic FMVZ UNESP — Botucatu Hospital. Clinical data of the animals are presented in Table 2.

The cytology allowed diagnosis and classification of the tumor according to its morphology (Figure 3). However, the prevalence was only the plasmacytoid subtype, which reached 100% in all cases. This morphology has prevailed in other studies, principally on CTVTs with longer evolution time, predominantly between 74% and 95% (Amaral et al., 2004; Fonseca et al., 2012; Flórez et al., 2013).

However, despite the predominance of the plasmacytoid subtype, we cannot forget the fact that tumors also present lymphocytoid cells, although in lesser amounts. This mixture of cell subtypes in CTVT samples could be a result of polyclonal products, indicating an origin that results from the concomitant transformation of two or more genetically distinct cells. The cytology seems to have an important role in the biological behavior of the tumor; therefore, future investigations into this process should be performed.

Histopathological examination, however, allowed classification of the tumor into different stages of evolution. For this purpose, the relation between the cellularity and amount of fibroblasts was used (Figure 4). In the present study, the animals were found to be mostly in the phase of progression (14/18), except for four animals, two of which were in the initial stage of regression and two in the phase of complete regression.

Our results are in accordance with Rogers (1997), who reported that although the spontaneous regression phase is well documented in the literature in experimental CTVT, the same fact is not routinely observed in reported clinical treatments.

Additionally, the chronic presence of tumors for more than four years opposes this theory (Boscos et al., 1999).

3.2 Gene expression

From the total of the 17 tumor tissues, gene expression of mRNA was obtained from a variable number of samples, depending on the gene analyzed (Table 3). In agarose gel, RNA samples presented good integrity of 18S and 28S ribosomal RNA. Cell culture of 3 samples from tumor tissues was also performed, and gene expressions of the same previously described genes and evaluated in tissue, to minimize and/or remove the presence of constituents from the tumor microenvironment. The analysis showed statistically significant differences in the expressions of *TGF-β* genes compared to the response of the animals treated with vincristine, and *CXCR4* in tissue samples compared to cells in culture taken as controls.

TGF-β, in general, showed a prevalence of normal expression in tissues samples (12/17) (QR = 0.5 to 0.9) while the cells showed subexpression (2/3) (QR = 0.4) and normal expression (1/3) (QR = 0.5). With respect to the statistical analysis, there was a statistically significant difference between expression of the *TGF-β* gene when compared to the clinical subcategory of the animals' response to treatment with vincristine, these responses were classified as complete (CR), partial (PR), or ineffective (R) ($P < 0.05$) (Figure 5).

In the early stages, *TGF-β* presents a suppressive ability in the tumorigenesis, inhibiting cell cycle progression and the induction of apoptosis (Bierie and Moses, 2009). Hsiao et al. (2008) showed that *TGF-β1* (analogous derived-tumor) suppresses *IFN-γ* from TILs promoting low expression of MHC classes I and II, and thereby preventing tumor recognition by the immune system. It is hypothesized, therefore, that tumor-derived *TGF-β1* concentrations affect and even suppress the real *TGF-β* expression by promoting tumor proliferation and progression.

The loss of growth inhibition function mediated by *TGF-β* contributes to the development and progression of a variety of human tumors. Retinoblastoma, gastric cancer, colon cancer, hepatoma, and some malignancies of T and B cells do not respond to growth inhibition controlled by *TGF-β*. Many of these tumors contain inactivating mutations in the *TGF-β* receptors, and/or in the Smad proteins and are, therefore, resistant to growth inhibition by *TGF-β* (Lodish et al., 2002). The cytostatic and

apoptotic impact of TGF- β as a tumor suppressor, however, was equilibrated by observations that demonstrated that TGF- β could promote tumor progression by suppressing the immune surveillance (Bierie and Moses, 2009).

Thus, normal or reduced expression of TGF- β in CTVT makes us question how this gene can promote regulation of the real TGF- β expression through TGF- β 1 synthesis, depending on the phase of the tumor. In animals that were resistant to treatment with vincristine, for example, the expressions of TGF- β were reduced. In these cases, high concentrations of TGF- β 1 could be suppressing the real TGF- β expression, favoring tumor proliferation and progression.

Moreover, as there are no comparative facts in the CTVT literature, other types of cancer were taken into account, and our data are similar to Oda et al. (2012). These authors, in a study involving breast cancer in women, found an association between lower TGF- β expression with larger tumor size, as well as an association between lower expression of this cytokine with a greater number of committed lymph nodes. Thus, the risk of regional lymph nodes being compromised is directly proportional to tumor size. These observations suggest that TGF- β has an ambiguous role in the tumor microenvironment, functioning as much as a suppressor as a promoter, depending on the context of their stimulation.

In relation to IFN- γ , the majority of samples were subexpressed (14/17) (QR = 0.004 to 0.49). Schreiber et al. (2011) demonstrated that mice deficient in IFN- γ signaling are more susceptible to tumor formation when treated with carcinogens. These data suggest a direct role of IFN- γ in the specific activation of cells that operate during tumor removal. Furthermore, mice deficient in IL-12, cytotoxic T lymphocytes, and NK cells, such as IFN- γ also develop more tumors in similar models (Viola et al., 2004).

In the gene expression for IL-6, decreased expression was also observed (9/17) (QR = 0.001 to 0.3). In CTVT, IL-6 and IFN- γ in synergy can induce *in vitro* MHC expression. When the IL-6 level secreted by TILs reaches a threshold, it starts its activity with IFN- γ allowing lymphocyte infiltration into the tumor, activating the expression of MHC classes I and II in CTVT cells and initiating the regression phase (Hsiao et al., 2008).

However, although suspicions exist that naturally occurring CTVT can regress after it is installed in the host, there are few reports in this direction in the literature and it is rarely observed in clinical medicine. Thus, the fact that the IFN- γ and IL-6 expressions are decreased or absent in the tumor microenvironment, in these

circumstances, is clear, since there will be neither MHC expression nor activation of immune cells to eliminate the tumor.

Furthermore, studies indicate that IL-6 may be induced by SDF-1 α – stromal cell-derived factor-1 α – also known as the CXCL12 chemokine. In human synovial fibroblasts, SDF-1 α increases IL-6 production by CXCR4 signaling through the PI3K/Akt pathway (Chen et al., 2011). Similarly, in oral cancer cells, SDF-1 α from osteoclasts can induce IL-6 and promote osteoclast genesis (Tang et al., 2008). Thus, the CXCL12 chemokine, along with its receptor CXCR4, has been shown to mediate the proliferation and migration of tumor cells, thereby increasing the angiogenesis associated with tumors (Sun et al., 2013), and promotion of metastasis in many cancer types (Chen et al., 2007).

In the ovary, prostate, and esophagus tumors and other types of cancer an increase in CXCR4 have been observed (Domanska et al., 2013), related to a higher degree of malignancy. This receptor, however, was reduced in most animal tissues in the present study (11/17) (QR = 0.06 to 0.4), except for five samples that showed normal expression (QR = 0.5 to 0.7) and an absence of tissue. In cultured cells, there was only subexpression (QR = 0.01 to 0.06) and a statistically significant difference was observed between the expression of *CXCR4* levels in tissue samples compared to samples from cell cultures ($P < 0.05$) (Figure 6). The cells showed lower levels of gene expression when compared to tissues. This may be related to the fact that these cells do not need to express high levels of angiogenic factors in culture, where theoretically cell competition does not exist. Also, pro and antiangiogenic soluble factors produced by cells present in the tumor microenvironment are not present in the culture, such as hematopoietic cells and fibroblasts.

Although reports of metastasis in CTVT and this tumor is considered malignant from a cytohistologic point of view (Amaral, 2007), it is known that its metastatic potential is low – around 1% (Tinucci-Costa, 2009) to 17% (Macewen, 2001) in naturally occurring tumors and 1.5 to 6% in experimental transplantation – a fact that would account for the low expression of this receptor.

In addition to the angiogenesis process, it may also be stimulated through regulation of *VEGF* expression in both epithelial and fibroblasts cells, in addition to the HIF1- α transcription factor, that controls the homeostasis of oxygen in the cellular microenvironment (Ferrara, 2002; Yu and Jove, 2004) and directly induces *VEGF* expression (Boudreau and Myers, 2003).

The *VEGF* gene exhibited high expression in both tissue samples (14/17) (QR = 2.2 to 11.4) and cells from culture (3/3) (QR= 6.2 to 11.5). According to Kabbinavar et al. (2003), Schneider and Miller (2005), Duncan et al. (2008), Rini and Small (2005), Stefanou et al. (2004), and Ugurel et al. (2001), an increase in *VEGF* expression was associated with tumor progression and poor prognosis in colorectal, breast, ovaries, kidney, lung, and melanoma cancers, respectively (Capps et al., 2009). However, in TVT, we believe that the high *VEGF* expression is more related to the morphological characteristics of the tumor, such as high vascularization, inflammation, and friability, requiring great nutritional support for its growth, than with the prognosis of the patient, as the animals live with this tumor for long periods without it being the usual cause of death of these animals.

4. Conclusion

The present data in this article demonstrate that the tumour microenvironment as well as the host immune system appears to influence tumorigenesis and CTVT stages, such as *IL-6*, *IFN- γ* , *TGF- β* , *CXCR4* and *VEGF* expressions. In addition, CTVT presents stable evolutionary behaviour which is certainly because of the adaptations that it has undergone over time, fact that probably depends on interactions with the tumour microenvironment, such as possibility of progressive modifications in the biological profile of tumoural cells. Therefore, the adaptive and continuing evolution of CTVT.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest in this publication.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 445250/2014-3), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2012/19285-2). We also thank the Veterinary Medicine Faculty Hospital Veterinary and Animal Science/UNESP Botucatu and the animals who unwittingly participated in the study.

References

- Álvaro, T., Noguera-Salva, R., Fariñas-Guerrero, F., 2010. La matriz extracelular: de lamecánica molecular al microambiente tumoral (parte II). *Rev. Esp. Patol.* 43, 24–32.
- Amaral, A.S., Gaspar, L.F.J., Bassani-Silva, S., Rocha, N.S., 2004. Cytological diagnostic of transmissible venereal tumor in the Botucatu region, Brazil (descriptive study: 1994-2003). *RPCV.* 99, 167–171.
- Amaral, A.S., Bassani-Silva, S., Ferreira, I., Fonseca, L.S., Andrade, F.H.E., Gaspar, L.F.J., Rocha, N.S., 2007. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. *RPCV.* 102, 253–260.
- Bassani-Silva, S., Sforcin, J.M., Amaral, A.S., Gaspar, L.F.J., Rocha, N.S., 2007. Efeito *in vitro* da própolis sobre células do tumor venéreo transmissível canino. *RPCV.* 102, 261–265.
- Belov, K., 2012. Contagious cancer: Lessons from the devil and the dog. *Bioessays.* 34, 285–292.
- Bierie, B., Moses, H.L., 2009. Gain or loss of TGFbeta signaling in mammary carcinoma cells can promote metastasis. *Cell Cycl.* 8, 3319–3327.
- Boscos, C.M., Tontis, D.K., Samartzi, F.C., 1999. Cutaneous involvement of TVT in dogs: a report of two cases. *Canine Practice.* 24, 6–11.
- Boudreau, N., Myers, C., 2003. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res.* 5, 140–146.
- Capp, C., Zennig, N., Wajner, S., Maia, A.L., 2009. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide the role of vascular. *Rev. HCPA.* 29, 1–9.
- Carvalho, J.R., Nascimento, E.S.M., Xavier, J.G., Bonamin, L.V., Hurtado, E.C.P., 2015. Papel do microambiente tumoral no desenvolvimento do melanoma. *Vet. Not.* 21, 39–49.
- Chen, H., Tan, Y., Cai, S., Ma, W., Guo, Z., Du, J., Cai, S., 2007. The role of SDF-1 and its receptor CXCR4 in tumor metastasis [article in chinese]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 24, 1180–1183.
- Chen, H.T., Tsou, H.K., Hsu, C.J., Tsai, C.H., Kao, C.H., Fong, Y.C., Tang, C.H., 2011. Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 promotes IL-6 production in human synovial fibroblasts. *J. Cell Biochem.* 112, 1219–1227.

- Chou, P., Chuang, T., Jan, T., Gion, H., Huang, Y., Lei, H., Chen, W., Chu, R., 2009. Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. *Vet. Immunol.Immunopathol.* 130, 25–34.
- Comertpay, S., Pastorino, S., Tanji, M., Mezzapelle, R., Strianese, O., Napolitano, A., Baumann, F., Weigel, T., Friedberg, J., Sugarbaker, P., Krausz, T., Wang, E., Powers, A., Gaudino, G., Kanodia, S., Pass, H.I., Parsons, B.L., Yang, H., Carbone, M., 2014. Evaluation of clonal origin of malignant mesothelioma. *J. Transl. Med.* 12, 301.
- Domanska, U.M., Kruizinga, R.C., Nagengast, W.B., Timmer-Bosscha, H., Huls, G., De Vries, E.G., Walenkamp, A.M., 2013. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur. J. Cancer.* 49, 219–230.
- Duncan, T.J., Al-Attar, A., Rolland, P., Scott, I.V., Deen, S., Liu, D.T., Spendlove, I., Durrant, L.G., 2008. Vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer: a model for targeted use of novel therapies? *Clin. Cancer Res.* 14, 3030–3035.
- Epstein, R.J., 2004. The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer.* 4, 901–909.
- Ferrara, N., 2002. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer.* 2, 795–803.
- Flórez, L.M.M., Ordóñez, F.P., Monteiro, S., Brandão, C.V.S., Rocha, N.S., 2013. Cytological and clinical staging of transmissible venereal tumour at the Veterinary Hospital of Botucatu. *Rev.Vet. Zoot.* 7, 1–17.
- Flórez, M.M., Fêo, H.B., Da Silva, G.N., Yamatogi, R.S., Aguiar, A.J., Araújo, J.P., Rocha, N.S., 2016a. Cell cycle kinetics, apoptosis rates and gene expressions of *MDR-1*, *TP53*, *BCL-2* and *BAX* in transmissible venereal tumour cells and their association with therapy response. *Vet. Comp. Oncol.* doi: 10.1111/vco.12220.
- Flórez, L.M.M., Fêo, H.B., Duzanski, A.P., Oliveira, P.B., Lima, J.F., 2016b. Immunocytochemical characterization of primary cell culture in canine transmissible venereal tumor. *Pesq. Vet. Bras.* 36, 844–850.
- Fonseca, L.S., Mota, L.S., Colodel, M.M., Rocha, N.S., 2012. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: association between different phenotypes and the insertion LINE-1/c-myc. *RCCP.* 25, 402–408.
- Ganguly, B., Das, U., Das, A.K., 2013. Canine transmissible venereal tumour: a review. *Vet. Comp. Oncol.* Doi: 10.1111/vco.12060
- Gu, Y.J., Zhu, Y.Y., Lu, X.Y., Zhao, Q., Cong, W.M., 2015. Hepatic carcinosarcoma: evidence of polyclonal origin based on microsatellite analysis. *Pathol. Res. Pract.* 211, 905–910.

- Hitchon, C., Wong, K., Ma, G., Reed, J., Lyttle, D., El-Gabalawy, H., 2002. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 46, 2587–297.
- Hsiao, Y., Liao, K., Chung, T., Liu, C., Hsu, C., Chu, R., 2008. Interactions of host IL-6 and IFN- γ and cancer-derived TGF- β 1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 1091–1104.
- Kabbinavar, F., Hurwitz, H.I., Fehrenbacher, L., Meropol, N.J., Novotny, W.F., Lieberman, G., Griffing, S., Bergsland, E., 2003. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 21, 60–65.
- Larionov, A., Krause, A., Miller, W., 2005. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics.* 6, 1–16.
- Liao, K.W., Hung, S.W., Hsiao, Y.W., Bennett, M., Chu, R.M. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 92, 149–162.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Damell, J., 2002. *Biologia Celular e Molecular*. Revinter, 1084 pp.
- MacEwen, E.G., 2001. Transmissible venereal tumor. In: Withrow, S.J., MacEwen, E.G. *Small Animal Clinical Oncology*. Saunders, 718 pp.
- Mendelsohn, J., Howley, I., Thompson, G., 2008. *The Molecular Basis of Cancer*, Elsevier, 888 pp.
- Mozos, E., Méndez, A., Gómez-Villamandos, J.C., Martín De Las Mulas, J., Pérez, J., 1996. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. *Vet. Pathol.* 33, 257–263.
- Mukaratirwa, S., Chiwome, T., Chitanga, S., Bhebhe, E., 2006. Canine transmissible venereal tumour: assessment of mast cell numbers as indicators of the growth phase. *Vet. Res. Commun.* 30, 613–621.
- Mukaratirwa, S., Gruys, E., 2003. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *Vet. Q.* 25, 101–111.
- Murgia, C., Pritchard, J.K., Kim, S.Y., Fassati, A., Weiss, R.A., 2006. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell.* 126, 477–487.
- Oda, J.M.M., Oliveira, K.B., Guembarovski, R.L., Lima, K.L.A., Herrera, A.C.S.A., Guembarovski, A.L., Sobrinho, W.J., Derossi, D.R., Watanabe, M.A.E., 2012. TGF- β polymorphism and its expression correlated with CXCR4 expression in human breast cancer. *Mol. Biol. Rep.* 39, 10131–10137.

- Park, M.S., Kim, Y., Kang, M.S., Oh, S.Y., Cho, D.Y., Shin, N.S., Kim, D.Y., 2006. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 130–133.
- Rini, B.I., Small, E.J., 2005. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 23, 1028–1043.
- Rogers, K.S., 1997. Transmissible venereal tumor. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 19, 1036–1045.
- Santos, D.E., Silva, D.T., Toledo-Pinto, E.A., Lot, R.F.E., 2008. Tumor venéreo transmissível (TVT): Revisão de Literatura. *Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.* 6, 1–7.
- Schneider, B.P., Miller, K.D., 2005. Angiogenesis of Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 1782–1790.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J., 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 331, 1565–1570.
- Stefanou, D., Batistatou, A., Arkoumani, E., Ntzani, E., Agnantis, N.J., 2004. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and non-smallcell lung carcinomas. *Histol. Histopathol.* 19, 37–42.
- Stockmann, D., Ferrari, H.F., Andrade, A.L., Lopes, R.A., Cardoso, T.C., Luvizotto, M.C.R., 2011. Canine transmissible venereal tumours: aspects related to programmed cell death. *BJVP.* 4, 67–75.
- Strakova, A., Murchison, E.P., 2015. The cancer which survived: insights from the genome an 11000 year-old cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 30, 49–55.
- Stratton, M.R., Campbell, P.J., Futreal, A., 2009. The cancer genome. *Nature.* 458, 719–724.
- Sun, X., Charbonneau, C., Wei, L., Yang, W., Chen, Q., Terek, R.M., 2013. CXCR4-targeted therapy inhibits VEGF expression and chondrosarcoma angiogenesis and metastasis. *Mol. Cancer Ther.* 12, 1163–1170.
- Tang CH, Chuang, J.Y., Fong, Y.C., Maa, M.C., Way, T.D., Hung, C.H., 2008. Bone-derived SDF-1 stimulates IL-6 release via CXCR4, ERK and NF-kappaB pathways and promotes osteoclastogenesis in human oral cancer cells. *Carcinogenesis.* 29, 1483–1492.
- Thliveris, A.T., Schwefel, B., Clipson, L., Plesh, L., Zahm, C.D., Leystra, A.A., Washington, M.K., Sullivan, R., Deming, D.A., Newton, M.A., Halberg, R.B., 2013. Transformation of epithelial cells through recruitment leads to polyclonal intestinal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 11523–11528.

Tinucci-Costa, M., 2009. Tumor venéreo transmissível, In: Daleck, C.R., Nardi, A.B., Rodaski, S. *Oncologia em cães e gatos*. Roca, p.540–555.

Ugurel, S., Rappl, G., Tilgen, W., Reinhold, U., 2001. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J. Clin. Oncol.* 19, 577–583.

Viola, J.P.B., Teixeira, L.K., Werneck, M.B.F., 2004. *Imunologia Tumoral*. In: Ferreira, C.G.; Rocha, J.C. *Oncologia Molecular*. Atheneu, 469 pp.

Yu, H., Jove, R., 2004. The stats of cancer — new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer.* 4, 97–105.

Table 1. Sequence of *primers* used in RT-qPCR.

Gene	Sense (5' → 3')	Antisense (3' → 5')
RPS5 ¹	GAGGCGTCAGGCTGTCGAT	AGCCAAATGGCCTGATTCAC
RPS19 ¹	GGGTCCTCCAAGCCCTAGAG	CGGCCCCCATCTTGGT
ACTB ¹	GGCATCCTGACCCTCAAGTA	CTTCTCCATGTCGTCCCAGT
IL-6 ²	CCACAAGCGCCTTCTCCCTGG	TCACGCACTCATCCTGCGACTG
TGF-β ³	GTATATGGCCCCCGAAGTTCTAG	CCCAGAATACTAAGCCCATTGC
IFN-γ ³	GCTTTGCGTGATTTTGTGTTCTT	CACCGTCCGATACATCTGGATTA
VEGF ⁴	CTTTCTGCTCTCCTGGGTGC	GGTTTGTGCTCTCCTCCTGC
CXCR4 ⁵	GACTCCATGAAGGAACCCTG	GCCAGTCAAGAAGATGATGG

¹ BRINKHOF et al., 2006² RIDYARD et al., 2002³ STEHLE et al., 2010⁴ KOOL et al., 2014⁵ CHUNG et al., 2014

Table 2. Clinical data of patients with CTVT treated at the Veterinary Hospital.

Animal	Sex	Age (years)	Breed	Location	Classification	Stage	Treatment Response
1	M	9	Mixed	penis	P	Initial Regression	R
2	F	9	Dachshund	vagina	P	Progression	CR
3	M	7	Mixed	penis	P	Complete Regression	CR
4	M	9	Mixed	penis	P	Complete Regression	CR
5	M	-	Mixed	skin – penis	P	Progression	CR
6	M	10	Mixed	penis	P	Progression	CR
7	M	-	Mixed	penis	P	Progression	CR
8	F	10	Mixed	vagina	P	Progression	PR
9	M	5	Mixed	penis	P	Initial Regression	PR
10	M	6	Mixed	penis	P	Progression	CR
11	M	-	Mixed	penis	P	Progression	R
12	M	8	Poodle	oral cavity	P	Progression	CR
13	M	10	Mixed	penis	P	Progression	CR
14	M	10	Mixed	penis	P	Progression	CR
15	M	16	Mixed	skin – penis	P	Progression	CR
16	M	-	Bull Terrier	penis	P	Progression	CR
17	M	-	Mixed	penis	P	Progression	CR

M = male; F = female; – = not specified by owner; Mixed = mixed breed; P = plasmacytoid; R = resistant; PR = partial response; CR = complete response.

Table 3. Numerical values (QR) for RT-qPCR analysis for genes *IL-6*, *IFN- γ* , *TGF- β* , *CXCR4* and *VEGF* in tissue samples and CTVT culture.

Sample	IL-6	IFN- γ	TGF- β	CXCR4	VEGF
T1	0	0.128	0.310	0.418	11.44
T2	0.002	0.095	0.431	0.409	5.60
T3	0	0.497	0.934	0.564	5.10
T4	0	0	0	0	9.60
T5	0	0.041	0.702	0.454	7.10
T6	0.022	0.162	0.806	0.184	3.80
T7	0.001	0.040	0.545	0.268	2.20
T8	0.041	0.018	0.919	0.324	7.80
T9	0.015	0.004	0.924	0.653	1.60
T10	0	0.072	0.483	0.146	2.80
T11	0	0.016	0.258	0.066	4.80
T12	0.104	0.027	0.671	0.620	6.80
T13	0.001	0.021	0.541	0.621	2.20
T14	0.329	0.043	0.580	0.187	5.20
T15	0	0.518	0.503	0.390	0
T16	0	0.064	0.527	0.358	0
T17	0.713	0.713	0.713	0.713	5.70
C1	0.095	0	0.410	0.066	11.53
C2	0	0.048	0.510	0.016	7.18
C3	0.110	0	0.430	0.016	6.20

T = tissue; C = culture.



Figure 1. CTVT in a female animal. Multiple injury, multilobular aspect of “cauliflower”. Roseate light colour to deep red, with areas of haemorrhage and necrosis.

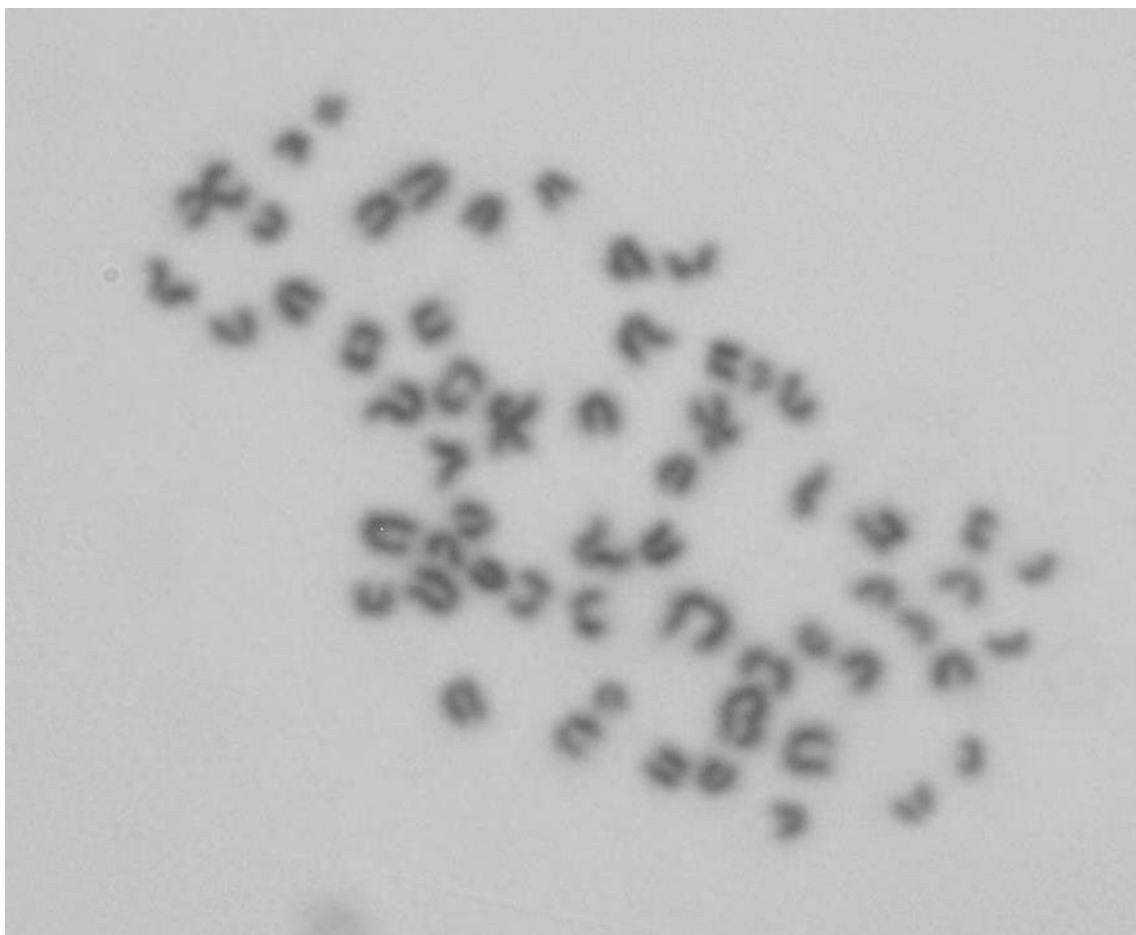


Figure 2. Cell karyotype in TVT culture. Observe the presence of 59 chromosomes, fewer than 78 of the somatic cells of the dog.

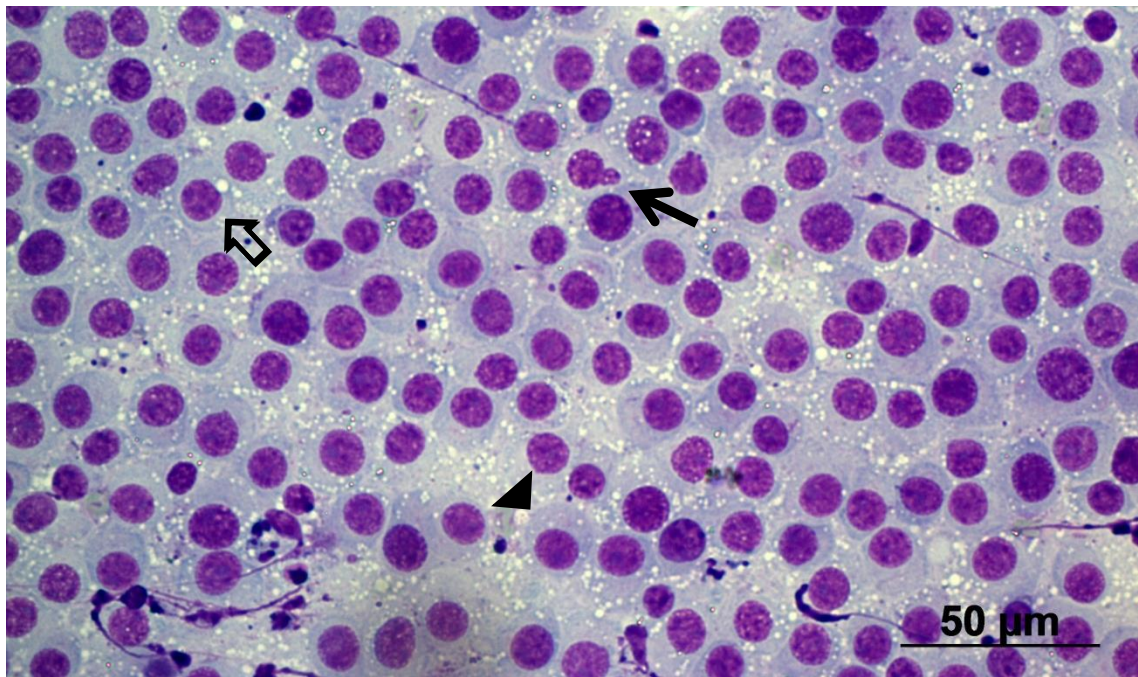


Figure 3. Cytology of TVT in a male mixed dog with genital location. Lymphocytoid standard: round cells, little cytoplasm and high ratio nucleus:cytoplasm (⇨). Plasmacytoid standard: ovoid cells, broad cytoplasm and eccentric nuclei (▶). Note the presence of nuclear projection (Blebe) (→). Staining: Giemsa, Obj 40x, bar 50 micrometers.

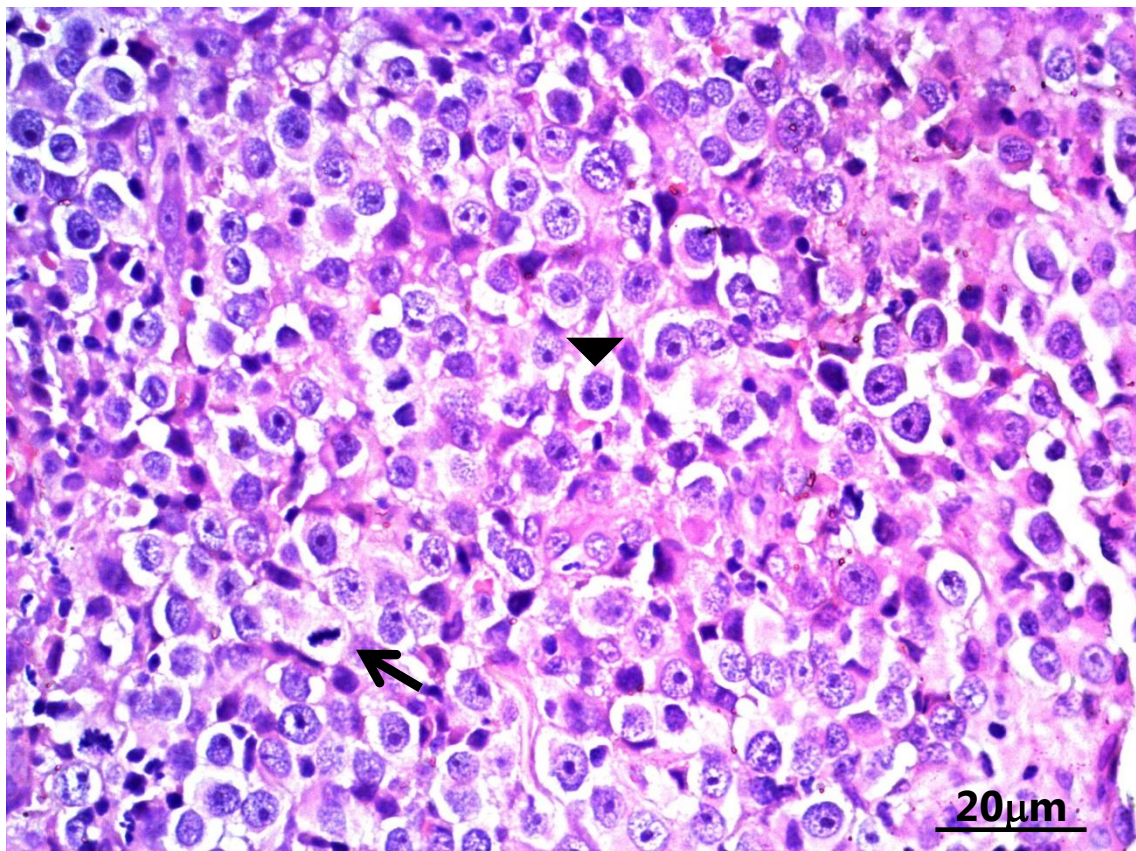


Figure 4. Histopathology of TVT plasmacytoid standard exhibiting large cells with wide and clear cytoplasm. Eccentric nuclei with coarse chromatin and nucleolus sometimes single, sometimes multiple (▶). Also note the presence of mitotic figure (→). Staining: HE, Obj 40x, bar 20 micrometers.

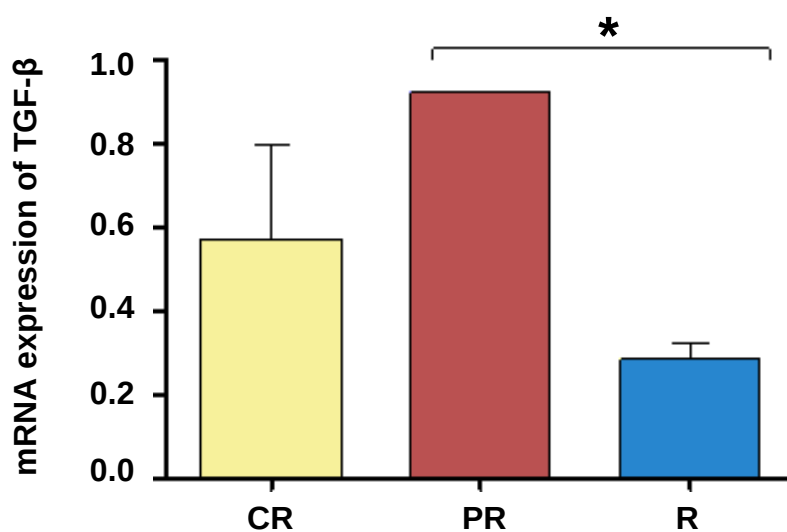


Figure 5. Graph of the relative expression of *TGF-β* mRNA showing statistically significant difference between the levels of expression of the gene when compared to the sub-clinical animal response to treatment with vincristine ($P<0.05$).

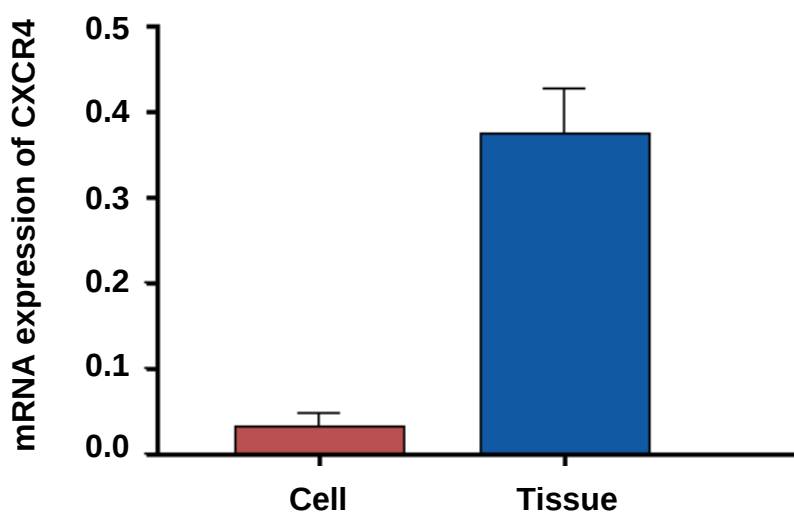


Figure 6. Graph of the relative expression of *CXCR4* mRNA showing statistically significant difference between the levels of expression in tissue samples compared to samples from cell cultures ($P<0.05$).

Anexos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



fmvz - unesp

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa **"Perfil de expressão gênica e de células mononucleares em TVTC e sua relação com a agressividade e resposta ao tratamento"** Protocolo nº 81/2014-CEUA, da Professora Noeme Sousa Rocha, a ser conduzido por **Haline Ballestero Fêo**, desta Faculdade, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 09 de maio de 2014.

Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

fmvz - unesp

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

A T E S T A D O

Atesto que o Projeto de Pesquisa "Perfil de expressão gênica e de células mononucleares em TVTC e sua relação e sua relação com a agressividade e resposta ao tratamento" **Protocolo CEUA 81/2014**, aprovado em 09/05/2014, a ser conduzido por **Haline Ballestero Fêo**, orientadora Profa. Noeme Souza Rocha, para fins de pesquisa científica; teve o título alterado para: "Tumor venéreo transmissível canino: expressão de genes relacionados com o comportamento biológico e microambiente tumoral", e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Vigência do projeto	10/05/2014 a 01/12/2016
Espécie/Linhagem	Canina/ <i>Canis familiaris</i>
Raça	SRD
Nº de animais	18
Peso/Idade	Variável
Sexo	16 machos e 2 fêmeas
Origem	Proprietários

Botucatu, 23 de junho de 2016



Profª. Ass. Drª. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica

Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n

UNESP - Câmpus de Botucatu/SP - Cep 18618-681

☐ (14) 3880-2176 – ☐ patrizia@fmvz.unesp.br – ☐ www.fmvz.unesp.br

Tumor Venéreo Transmissível

Genitais – Parâmetros TNM**					
Tumor primário		Nódulo linfático	Linfonodo regional	Metástases outros órgãos	
T1	Tumor < de 2 cm	N0	Ausência de metástases	M0	Ausência de metástases
T2	Entre 2-5 cm	N1	Metástase linfonodo regional		
T3	Maior de 5 cm	N2	Metástase outros linfonodos	M1	Com metástases
T4	Invasão local				

Descrição de massas adicionais

Antecedentes	Observações
Massa hemorrágica? Sim_ Não _	
Massa friável? Sim_ Não _	
Ordem de aparecimento.	
Crescimento: Lento__ Rápido __ Estável__	
Tempo de crescimento: < 3 semanas__ 3 a 8 semanas __ mais de 8 semanas __	
Localização da massa:	Massa única? Sim_ Não _
Tamanho tumor em cm:	
Gânglios locais:	

Seguimento do paciente

Antecedentes								
Tratamento utilizado:					Dose:			
Semana	1	2	3	4	5	6	7	8
Tamanho tumor em cm								
Gânglios locais tamanho								



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

Protocolo Semiológico / Dados Epidemiológicos

Projeto: Tumor Venéreo Transmissível Canino: Expressão de genes relacionados com o comportamento biológico e microambiente tumoral			
Nome do proprietário:		* Caso No:	
Endereço:		Ficha:	
Telefone:			
Dados Animal			
Sexo:	Raça:	Idade:	Peso:
Antecedentes do paciente		observações	
Acesso à rua? Sim_ Não_			
Teve contato com outros cães? Sim_ Não_			
Controle reprodutivo? Sim_ Não_			
Emagrecimento progressivo? Sim_ Não_			
Massa hemorrágica? Sim_ Não_			
Massa friável? Sim_ Não _			
Tratamento antineoplásico prévio? Sim_ Não _			
Crescimento: Lento__ Rápido __ Estável__			
Tempo de crescimento: < 3 semanas__ 3 a 8 semanas __ mais de 8 semanas __			
Localização da massa:		Massa única? Sim_ Não _	
Tamanho de tumor em cm:			
Linfonodos locais:			
Aplicar graduação TNM**			

*** Histórico do paciente.**



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do procedimento de anestesia geral, citologia e biopsia, referente ao Projeto de Pesquisa titulado: **Tumor venéreo transmissível canino: expressão de genes relacionados com o comportamento biológico e microambiente tumoral**; de responsabilidade de Noeme Sousa Rocha-Haline Ballesterero Fêo.

Nome do animal: _____

Nome do Responsável: _____

RG: _____ Data: ____ / ____ / ____

Assinatura: _____