



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



Anderson do Prado Duzanski

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

**Botucatu
(2017)**

Anderson do Prado Duzanski

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

Botucatu
(2017)

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

Dusanski, Anderson do Prado.

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

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

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

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

Nome do autor: Anderson do Prado Duzanski

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

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

COMISSÃO EXAMINADORA

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

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

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

Data da defesa: 01 de Agosto de 2017.

Dedicatória

À **Deus** autor e Senhor da vida.

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

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

À minha amada noiva **Giovana Zangrande Negrisolo**.

À minha tão querida e especial tia **Natália Duzanski**.

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

Agradecimentos

Agradeco

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

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

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

Totus tuus ego sum mariae.

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

Obrigado Professora por tornar minha caminhada mais significativa.

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

Obrigado pelo convívio pacífico, compreensão e amizade verdadeira.

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

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

Agradeço

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

São Bonaventura (1218-1274)

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

Tabela 10 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes à raça dos cães com TVTC 142

Tabela 11 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes à idade dos cães com TVTC 143

Tabela 12 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes à resposta ao tratamento quimioterápico dos cães com TVTC 143

Tabela 13 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares comparando os resultados obtidos em amostras de sangue e de tumor..... 144

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

SUMÁRIO

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

Apresentação

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

Capítulo 1

Revisão de literatura

1. TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1 Epidemiologia

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Aspectos clínicos e diagnóstico

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

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

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

(CALVERT; LEIFER; MACEWEN, 1982).

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

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

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

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

(KOMNENOU et al., 2015).

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

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

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

1.3 Biologia tumoral

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

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

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

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

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

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

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

1.3.1 Características histológicas e citológicas

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

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

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

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

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

1.4 Tratamento

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

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

cirúrgicos (GANGULY; DAS; DAS, 2013).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. INTERAÇÃO ENTRE SISTEMA IMUNOLÓGICO E TUMOR

A capacidade do sistema imune para combater o câncer foi inicialmente proposta por Paul Ehrlich, em 1902, e expandida por Burnett e Thomas na década de 50 em sua teoria da *vigilância imunológica*. O conceito foi originalmente proposto como a capacidade do sistema imune do hospedeiro de reconhecer e eliminar células anormais antes que se transformem em tumores, assim como combater tumores clinicamente aparentes (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

Mais tarde, com a demonstração funcional de antígenos específicos de tumores em modelos animais (OLD; BOYSE, 1964) foi possível atestar experimentalmente que os tumores não são ignorados pelo sistema imunológico, mas podem estimular tanto respostas primárias mediadas por células e fatores solúveis,

como respostas mais específicas e adquiridas do hospedeiro contra antígenos tumorais, revigorando a hipótese de imunovigilância (SENGUPTA et al., 2010).

No entanto, dados experimentais derivados de modelos de tumores murinos somados aos dados obtidos pelo estudo do câncer humano têm sustentado o reconhecimento crescente de que a imunovigilância representa apenas uma etapa de um processo mais amplo e dinâmico da relação entre o sistema imune do hospedeiro e o cancer, chamado *imunoedição de tumores* (DUNN et al., 2002; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; SHANKARAN et al., 2001).

A imunoedição de tumores é descrita como a habilidade do sistema imune em controlar e moldar o câncer através de um processo que inclui fase de eliminação, fase de equilíbrio e fase de escape (Anexo A). Estas ações protetoras e promotoras de tumores pelo sistema imune podem ocorrer de maneira independente ou em sequência (DUNN et al., 2002; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). Com efeito, na fase de eliminação, as células do sistema imune inato reconhecem a iniciação e o crescimento tumoral, devido aos danos teciduais locais causados pela remodelagem estromal, que provoca a resposta inflamatória (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). Durante esse processo, células infiltrantes, tais como as células Natural Killers (NK), são estimuladas a produzir diversas citocinas, incluindo o interferon-gama (IFN- γ), que modulam a resposta imune antitumoral (SENGUPTA et al., 2010).

Células NK e macrófagos são capazes de ativar um ao outro através de uma via recíproca de produção de IFN- γ , o qual induz à morte das células tumorais em um processo de citotoxicidade. O IFN- γ junto a interleucina-12 (IL-12) amplifica o desenvolvimento de funções efetoras antitumorais mediadas pela imunidade inata e

adaptativa, promovendo a geração de células T citotóxicas (CD8+) e de células T auxiliares (T CD4+) contra tumores (TRINCHIERI, 2003; SENGUPTA et al., 2010).

Dentre as evidências clínicas que sustentam a imunovigilância está a remissão espontânea do câncer em pacientes humanos sem tratamento, bem como a identificação de anticorpos tumor específicos (JESSY, 2011); a presença severa de linfócitos T, células DCs, macrófagos, células NK e plasmócitos em infiltrados circundantes aos tumores, associada a um melhor prognóstico (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010); a elevada incidência de certos tipos de câncer em pacientes imunossuprimidos, como linfomas, sarcoma de Kaposi e câncer cervical (BOSHOF; WEISS, 2002); e mais recentemente os registros bem documentados de remissão do câncer através da imunoterapia (SENGUPTA et al., 2010; KHALIL et al., 2016).

Por outro lado, desafiando todos os achados clínicos descritos acima, a resposta imune gerada pelo organismo é capaz de moldar a imunogenicidade do tumor, dando origem a variantes com mutações que conferem resistência à imunovigilância, permitindo que o tumor entre em fase de equilíbrio, como resultado do processo de imunoedição. Assim, o balanço entre a resposta imune anti e pró-tumorigênica pode se tornar a favor do crescimento tumoral (DUNN et al., 2002).

A supressão celular da imunidade antitumoral é descrita, com destaque especial para as células T reguladoras (Treg), particularmente as células CD4+ CD25+ e FoxP3+, células B reguladoras (Breg), células supressoras derivadas mielóides (MDSC), e macrófagos associados a tumores (MATs), consideradas barreiras fisiológicas capazes de modular negativamente a imunidade tumoral. As

evidências recentes indicam que estas células desempenham um papel crítico na manutenção da progressão tumoral por atenuar mecanismos efetores tanto da imunidade natural como da adquirida (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; UGEL et al., 2015; SCHWARTZ; ZHANG; ROSENBLATT, 2016).

Além disso, tumores evadem eficazmente a imunovigilância quando perdem a expressão de coestimuladores e de moléculas do MHC, ou apresentam falhas no processamento de antígenos, incluindo aquelas ligadas à proteína transportadora associada com o processamento do antígeno (TAP), de modo que as células tumorais escapam do reconhecimento pelas células T. Outro mecanismo comum de escape tumoral inclui a secreção de citocinas imunossupressoras, tais como o Fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e a interleucina-10 (IL-10) que inibem as respostas efectoras do hospedeiro (DRAKE; JAFFEE; PARDOLL, 2006; VINAY et al., 2015).

Finalmente, as células tumorais resistentes que sobreviveram à fase de eliminação e passaram pela fase de equilíbrio entram na fase de escape, na qual crescem dentro do hospedeiro de uma maneira descontrolada, sendo então consideradas células tumorais editadas (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

2.1 Complexo Principal de Histocompatibilidade

O MHC foi descoberto pela primeira vez na década de 1940 em estudos sobre transplante de órgãos e de tecidos. Somente na década de 1970 é que foi verificado o papel central do MHC em respostas imune a antígenos proteicos, quando evidências

experimentais demonstraram que os linfócitos T reconhecem peptídeos apenas quando são apresentados por moléculas de MHC (BJORKMAN et al., 1987).

No homem, o MHC é denominado HLA (Human Leukocyte Antigen). Os genes do sistema HLA constituem um subconjunto de genes do MHC, que são divididos em dois grupos principais: HLA de classe I – subdivididos em genes clássicos (HLA-A, -B, -C) e não clássicos (HLA-E, -F, -G) – e HLA de classe II (HLA-DRA, -DRB, -DQA, -DQB, -DPA, -DPB) (KLEIN; SATO, 2000).

A moléculas do MHC de classe I possui uma cadeia α (pesada) polimórfica ligada de modo não covalente à molécula $\beta 2$ microglobulina (leve), sendo composta de três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$). Possui uma região transmembrana e um domínio citoplasmático. A molécula do MHC de classe II são compostas de duas cadeias polimórficas associadas de modo não covalente, uma cadeia α composta pelos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, e uma cadeia β composta pelos domínios $\beta 1$ e $\beta 2$. Possui uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática (Anexo B) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Estudos comparativos mostram que a organização molecular do sistema HLA é semelhante em várias espécies animais, incluindo o cão (POLVI et al., 1997). Com base na terminologia HLA, em cães o sistema MHC é denominado DLA (Dog Leukocyte Antigen) e está localizado no cromossomo 12. Através de ensaios sorológicos o DLA foi dividido em três locus genômicos: DLA-A (classe I), DLA-B (classe II) e DLA-C (classe I) (WAGNER; BURNETT; STORB, 1999).

Enquanto todas as células nucleadas e diplóides expressam moléculas de MHC classe I em sua superfície celular, um limitado grupo de células imunes

expressam moléculas de MHC classe II, que inclui células apresentadoras de antígenos (APCs) especializadas, como macrófagos, células dendríticas e células B. A expressão de moléculas de MHC classe II é tanto constitutiva como induzível nestas células, especialmente pelo IFN- γ (BJORKMAN et al., 1987).

As APCs, especialmente as DCs, são consideradas as células chaves na iniciação da resposta imune efetora. Uma vez capturado o antígeno tumoral pela DC, os peptídeos derivados de processamento interno na célula são associados com moléculas do MHC expressas na superfície celular para apresentação às células T virgens. Conforme a localização do antígeno no compartimento celular, as estratégias de proteólise, ou seja, as vias de processamento de antígeno e a associação de peptídeos com moléculas de MHC diferem no MHC de classe I e classe II (NEEFJES et al., 2011).

2.1.1 Apresentação de antígenos via MHC de classe I

Os peptídeos associados ao MHC de classe I são produzidos pela degradação proteolítica no citosol, dentro dos proteassomos, estruturas complexas capazes de realizar proteólise enzimática, e são, então, de origem endógena (citossólica). Uma vez que os peptídeos derivados do processamento são gerados no citosol, mas as moléculas do MHC de classe I são sintetizadas no retículo endoplasmático (RE), a proteína TAP transporta os peptídeos do citosol para o RE onde irão se ligar às moléculas do MHC recém-sintetizadas e não ocupadas (NEEFJES et al., 2011).

Por fim, as moléculas do MHC I com peptídeos antigênicos ligados são

transportadas por vesículas exocíticas adquirida no complexo de Golgi até a superfície celular para o reconhecimento por células T CD8⁺ (NEEFJES et al., 2011).

2.1.2 Apresentação de antígenos via MHC de classe II

Para a apresentação de antígenos associados ao MHC de classe II, as proteínas extracelulares são internalizadas em endossomos por APCs, onde sofrem clivagem por enzimas lisossomais. As moléculas de classe II recém-sintetizadas no RE recebem a cadeia peptídica invariante associada à classe II (CLIP), para bloquear a fenda de ligação e impedir que ela aceite uma prematura ligação a qualquer peptídeo. Deste modo, as moléculas de classe II não podem se ligar a peptídeos que elas encontram no RE, e nem apresenta-los (NEEFJES et al., 2011).

As vesículas que transportam moléculas de classe II do RE até a superfície celular se fundem com fagolisossomos contendo os antígenos processados. Dentro dessas vesículas, o CLIP é então removido e o peptídeo antigênico liga-se à moléculas de classe II para ser apresentado na superfície celular para células T CD4⁺ (NEEFJES et al., 2011).

2.2 Imunidade celular a tumores

A eliminação das células tumorais requer o envolvimento dos componentes da imunidade inata, assim como os da imunidade adaptativa, por meio da geração de uma resposta imune humoral e celular integrada. Enquanto células inatas, como

macrófagos e células NK medeiam respostas imediatas de curta duração, células adaptativas, como células T e B desenvolvem respostas de longa duração e memória (Anexo C) (BORGHAEI; SMITH; CAMPBELL, 2009).

A efetividade da resposta antitumoral é determinada pela responsividade imune inerente do hospedeiro e as características dos antígenos tumorais, ou seja, a imunogenicidade do tumor (REUSCHENBACH; DOEBERITZ; WENTZENSEN, 2009). Os efetores antitumorais do sistema imune inato, como as células NK e os macrófagos, não necessitam de priming antígeno-específico de CDs (DELAMARRE; HOLCOMBE; MELLMAN, 2003). Ao contrário, a resposta imune adquirida é realizada pelo sistema imune adaptativo, que consiste tanto em componentes mediados por células como humorais, e, obrigatoriamente requer que os antígenos tumorais sejam apresentados pelas células imunes num contexto de reconhecimento via MHC (BORGHAEI; SMITH; CAMPBELL, 2009).

2.2.1 Células NK

As células NK são descritas como uma subpopulação distinta de linfócitos capazes de matar células tumorais sem necessidade de sensibilização prévia, de modo não-restrito a moléculas do MHC de classe I. Ao que parece, constituem a principal linha de imunovigilância (WALDHAUER; STEINLE, 2008).

Morfologicamente, as células NK são maiores do que os linfócitos T e B apresentam citoplasma granular e marcadores de superfície CD16 e CD56. Diferem funcionalmente dos integrantes da imunidade adaptativa por reagirem de maneira

rápida através de atividade citotóxica (BLOM; SPITS, 2006). Ademais, não apresentam receptor de célula T (TCR), molécula central da resposta imunológica do linfócito T, e nem a molécula acessória CD3. A maioria das células NK expressa CD16, receptor para a porção Fc de IgG (PARHAM, 2006).

A medula óssea é considerada o sítio primário de geração das células NK porque possui todos os substratos celulares para a maturação dessas células. Porém ainda não está claro se a medula óssea sozinha é suficiente para garantir a maturação completa destas células. Acredita-se que as NK sejam geradas na medula óssea, mas completem sua maturação em outro sítio (BLOM; SPITS, 2006).

Células NK são reguladas por um balanço de sinais derivados de receptores de superfície ativadores e inibitórios. Os receptores de ativação reconhecem moléculas de superfície celular, das quais são expressas na superfície de outras células. Os receptores inibidores, tais como o KIR, reconhecem moléculas do MHC I, que são expressas na superfície de praticamente todas as células normais do corpo. A ligação do KIR com o MHC I desencadeia sinais inibitórios dentro da célula NK que resultam em tolerância (BORGHAETI; SMITH; CAMPBELL, 2009). Enquanto muitas células tumorais não expressam MHC I e prevalecendo os sinais de ativação, a morte da célula alvo ocorre através da exocitose de moléculas citotóxicas contendo perforina e várias granzimas que induzem a lise celular (SMYTH ET AL., 2005; WALDHAEUER; STEINLE, 2008).

Outro mecanismo efetor frequentemente subestimado nas células NK é a sua capacidade para secretar uma variedade de citocinas e quimiocinas, incluindo IFN- γ , fator necrose tumoral (TNF), factor de estimulação de colônias de granulócitos e

macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatória de macrófagos 1- α (MIP-1 α) e reguladas sob ativação expressa por linfócitos T, e secretadas (RANTES) (DORNER et al., 2004). Ademais, uma subpopulação de NK, chamadas células NKT, também apresenta atividade antitumoral. Estas células são excelentes produtoras de citocinas, indutoras de lise e reguladoras da atividade de célula T CD8+ (MACCALLI; SCARAMUZZA; PARMINANI, 2009).

Estudos mostraram que camundongos com deficiência de células T não apresentaram alta incidência de tumores espontâneos, e isto é atribuído a células NK exercendo sua função de imunovigilância (WALDHAUER; STEINLE, 2008). Outro estudo reportou que as células NK juntamente com as células T controlam os linfomas de células B deficientes em MHC de classe I através de ação citotóxica (STREET et al., 2004). Adicionalmente, foram descritos ainda pacientes com deficiência de células NK e incidências elevadas de linfomas (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

2.2.2 Macrófagos

Os monócitos são precursores diretos de macrófagos, circulam temporariamente na corrente sanguínea e depois migram para os tecidos, onde se diferenciam (RICHARDS; HETTINGER; FEUERER, 2012). Estas células são componentes essenciais do sistema fagocítico mononuclear (SFM) e estão envolvidas em processos centrais da imunidade tumoral (QUAI; JOYCE, 2013).

No microambiente tumoral, sob o controle de sinais locais, os monócitos se

diferenciam em macrófagos associados a tumores (TAMs). Os TAMs respondem aos sinais do microambiente local de forma a sofrer polarizações funcionais e genéticas. Fenotipicamente são classificados como macrófagos pró-inflamatórios M1 (classicamente ativados) e macrófagos anti-inflamatórios M2 (alternativamente ativados), e parecem exercer papéis distintos na tumorigênese (RICHARDS; HETTINGER; FEUERER, 2012).

Os M1, quando ativados pelo IFN- γ exercem atividade citotóxica pela liberação de intermediários reativos de oxigênio, enzimas lisossomais e óxido nítrico, independente dos antígenos do MHC. Secretam ainda o TNF, que age induzindo a trombose em vasos tumorais, e grandes quantidades de IL-12, que atua nas células NK e células T CD8⁺ aumentando o potencial da resposta efetora antitumoral (QUAI; JOYCE, 2013).

Por outro lado, acredita-se que mecanismos de evasão das células tumorais junto às características como inflamação crônica e hipóxia dão origem a um microambiente tumoral que favorece o estabelecimento do fenótipo M2 por TAMs, o qual é capaz de secretar IL-10, e modular negativamente a resposta imune antitumoral através de imunossupressão (QUAI; JOYCE, 2013).

Os M2 desempenham um importante papel na função pró-tumoral através da produção de fatores de crescimento no microambiente tumoral, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o TGF- β . Estes fatores promovem a angiogênese tumoral e contribuem com o aumento do crescimento do tumor e a formação de metástases (RICHARDS; HETTINGER; FEUERER, 2012).

Recentes estudos têm sugerido que o fenótipo de TAMs é útil para a predição prognóstica no câncer. Os dados indicam que o aumento da densidade de TAMs tipo M2 é um marcador de mau prognóstico, enquanto que a densidade aumentada de TAMs tipo M1 é um marcador de melhor prognóstico (YUAN et al., 2015).

2.2.3 Células T

As células T atuam tanto na destruição das células tumorais através de citotoxicidade, quanto na ativação, expansão e manutenção de outros mecanismos efetores. No timo, adquirem o TCR e os co-receptores CD4 e/ou CD8. Após a maturação, elas atingem a corrente sanguínea e recirculam nos órgãos linfóides secundários, como linfonodos e baço, até encontrarem seu antígeno específico e se tornarem ativas (BLOM; SPITS, 2006).

As células T expressam um grande número de imunomarcadores em suas membranas. O sistema CD (cluster of differentiation) refere-se a marcadores identificados por anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a eles. O CD3 é uma importante molécula junto ao complexo TCR presente na membrana de todas as células T, que transmite sinais à célula quando o receptor TCR se conjuga com o antígeno. Assim, enquanto o TCR é responsável pelo reconhecimento do complexo peptídeo-molécula de MHC, a molécula CD3, faz a sinalização celular subsequente (RUDD, 1990).

O processo de reconhecimento dos antígenos pelas células T é altamente específico, com plena capacidade de distinguir diferenças sutis entre os antígenos.

Estas células somente reconhecem antígenos, processados e apresentados por moléculas do MHC na superfície de uma APC. Com efeito, a célula T CD4⁺ somente reconhece o complexo peptídeo-MHC de classe II, enquanto a célula T CD8⁺ reconhece apenas o complexo peptídeo-MHC de classe I (SENGUPTA et al., 2010).

Como as células tumorais na maioria das vezes não expressam por si mesmas moléculas do MHC II há um forte consenso científico de que as respostas de células T efectoras aos tumores iniciam a partir de células APCs, como as células DCs, que são capazes de ingerir e processar antígenos tumorais realizando um processo único, chamado *apresentação cruzada* (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). As DCs capturam e ingerem antígenos liberados pelas células tumorais, a fim de que esses antígenos sejam processados e os peptídeos tumorais apresentados ligados à molécula do MHC I para reconhecimento e ativação de células T CD8⁺. O processo de fagocitose pela DC é o caminho natural para ativação de linfócitos T CD4⁺, onde os peptídeos tumorais são apresentados ligados à molécula do MHC II (DELAMARRE; HOLCOMBE; MELLMAN, 2003).

As CDs apresentam coestimuladores que sinalizam para a diferenciação de células T CD8⁺ em linfócitos T citotóxicos (CTLs) e células T CD4⁺ em linfócitos T auxiliares, específicos contra tumores (DELAMARRE; HOLCOMBE; MELLMAN, 2003). Uma vez que os CTLs efetores são gerados, eles podem reconhecer e destruir células tumorais pela liberação de grânulos líticos contendo perforina e granzina, sem que seja necessário haver coestimulação (NISHIMURA et al., 1999).

Depois de ativadas as células T auxiliares (Th) se responsabilizam por orquestrar outras células da resposta imune efectora, incluindo células T CD8⁺ e

células B (DELAMARRE; HOLCOMBE; MELLMAN, 2003). Mais recentemente as células Th foram subdivididas fenotipicamente e funcionalmente pelo padrão de citocinas que produzem. Durante o estímulo fornecido por uma APC, a célula precursora Th0 pode se tornar um linfócito Th1, Th2, Th9, Th22, Th17 e Treg na dependência do ambiente de citocinas presente no microambiente tumoral. Embora morfológicamente indistinguíveis essas células apresentam diferentes respostas efetoras (BAILEY et al., 2014).

Os fenótipos Th1 e Th2 têm seu papel melhor definido na resposta imune tumoral em relação aos demais subtipos que ainda não estão claros. Ambos os fenótipos Th1 e Th2 exercem papel na ativação, expansão e manutenção de mecanismos efetores de imunidade antitumoral (BAILEY et al., 2014). Assim, o fenótipo Th1 libera IL-2, que induz a proliferação de células T, incluindo T CD8⁺ e T CD4⁺, de maneira autócrina. Outra importante citocina produzida pelos Th1 é o INF- γ , que é capaz de aumentar a expressão de moléculas de MHC I pelas células tumorais e a sensibilidade à lise por CTL (BRADLEY, 2003). Apesar de não possuir atividade antitumoral direta, pela ausência de citotoxicidade e de fagocitose, os Th1 são imprescindíveis na iniciação da resposta imune efetora antitumoral (BOS; SHERMAN, 2010).

De outra parte, o Th2 libera IL-4 e suporta a resposta imune humoral (NISHIMURA et al., 1999), promovendo a expansão de linfócitos B que tenham sido ativados contra determinado antígeno tumoral. Esta expansão de clones específicos de linfócitos B gera uma resposta humoral específica contra o antígeno tumoral (BORGHAEI; SMITH; CAMPBELL, 2009).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* de tumores suportam a ideia de que a ajuda de células T CD4⁺ é crucial para reforçar a expansão clonal de células CTLs e aumentar significativamente as respostas efetoras antitumorais, seja através de interação célula-célula, pela produção de IFN- γ , ou da IL-2, considerada um forte fator de proliferação de linfócitos T CD8⁺ (NISHIMURA et al. 1999; BOS; SHERMAN, 2010).

2.2.4 Células B

Ao contrário das células T que migram para o timo, onde se dá todo o processo de maturação, as células B permanecem na medula óssea durante todo esse processo. Ao final de sua maturação, as células B deixam a medula e adentram a circulação, migrando para os órgãos linfoides secundários (BLOM; SPITS, 2006).

Enquanto as células T dependem de apresentação de antígenos pelo MHC, as células B são capazes de reconhecer antígenos solúveis na sua forma nativa. As moléculas responsáveis pelo reconhecimento de antígenos nas células B são as imunoglobulinas de membrana, IgM e IgD. Estas são a contrapartida dos receptores TCR e fazem parte do complexo do receptor de células B (BCR). O BCR inclui, além das imunoglobulinas de membrana, duas cadeias peptídicas denominadas Iga (CD79a) e Igb (CD79b), que têm como função iniciar a sinalização intracelular após o encontro com o antígeno (GRAY; GRAY, BAR, 2007).

As células B são responsáveis pela imunidade humoral que se caracteriza pela produção e liberação de imunoglobulinas que exercem função efetora na ativação do

sistema complemento contra células tumorais. As imunoglobulinas podem reconhecer antígenos na superfície das células tumorais, e induzir a formação de poros na membrana dessas células por meio da ativação do sistema complemento (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

As células B também exercem papel de apresentadoras de antígenos, após interiorizarem e processarem o Ag ligado ao BCR. Os peptídeos gerados são expressos na superfície celular ligados às moléculas do MHC classe II, para apresentação às células TCD4+. A interação do complexo peptídeo/MHC classe II com o TCR inicia uma cascata de eventos que levam as células T CD4+ à expansão clonal e produção de citocinas que estimulam a proliferação e diferenciação das células B (GRAY; GRAY, BAR, 2007).

Alternativamente, a citotoxicidade celular dependente de anticorpos também é descrita. Células NK ou macrófagos são atraídas pela ligação das imunoglobulinas na superfície das células tumorais, induzindo a lise destas células por citotoxicidade (PÀGES et al., 2010). Há também vários estudos descrevendo o envolvimento de células B na indução de ótimas respostas de células T CD4 + e CD8 + efetoras contra tumores (FREMD et al., 2013).

Por outro lado, embora a produção de anticorpos antitumorais e a indução de respostas celulares revelam uma função efetora antitumoral por parte de células B, evidências mostram que estas células também exercem funções promotoras de tumores, resultando num quadro totalmente controverso. Alguns estudos têm mostrado que as células B podem inibir a proliferação de células T bem como induzir a conversão de células T CD4 + em células Tregs, tanto *in vitro* como *in vivo*,

favorecendo assim a progressão tumoral e metástase (OLKHANUD et al., 2011; FREMD et al., 2013).

2.3 TVTC de ocorrência natural e experimentalmente induzido implicados na resposta imunológica do hospedeiro

Experimentalmente o TVTC é um modelo clássico de neoplasia que evolui conforme as fases de imunoestágio. O tumor exibe um padrão de crescimento previsível, que inclui fase de progressão, seguida de estabilização e, por último, uma fase de regressão (CHU et al., 2001; HSIAO et al., 2002). Porém, em cães imunossuprimidos, a exemplo de filhotes recém-nascidos e adultos desnutridos, o curso clínico normalmente termina em progressão tumoral com disseminação metastática (POWERS, 1968; YANG; JONES, 1973; MUKARATIRWA; GRUYS, 2003).

Imunidade humoral contra células do tumor também merece menção. Estudos mostram que anticorpos IgG anti-TVTC podem ser detectados nos cães com o tumor, independente do estágio tumoral (POWERS, 1968; EPSTEIN; BENNETT, 1974; FELTON; YANG, 1988), e que filhotes nascidos de mães expostas previamente ao tumor são menos susceptíveis à doença (YANG; JONES, 1973). Ademais, outro estudo descreve que a transferência passiva de soro imune favorece a regressão do tumor, e corrobora a participação de mecanismos efetores antitumorais dependentes de anticorpos (COHEN, 1985).

A propagação celular, bem como a iniciação e progressão tumoral parecem

ocorrer principalmente pela evasão das células tumorais aos mecanismos de reconhecimento imune relacionado à via do MHC (SIDDLE; KAUFMAN, 2015). Outro mecanismo atribuído ao escape da imunovigilância é a secreção do TGF- β 1 pelas células tumorais, um fator imunossupressor e promotor de crescimento (HSIAO et al., 2004). Esta é uma adaptação evolutiva única que raramente resulta em morte para o hospedeiro, e garante a contínua propagação do tumor (MURGIA, 2006).

Uma vez suportado a transmissão física de suas células tumorais e evadido o sistema imune do hospedeiro, o TVTC segue com uma fase de progressão, caracterizada por um rápido aumento no volume tumoral com um tempo de duplicação entre 4 e 7 dias. Essa fase pode perdurar meses, mas 10 a 20 dias após a transplantação, os tumores geralmente tornam-se palpáveis (CHU et al., 2001).

Células do TVTC produzem TGF- β 1 que inibe a atividade de células NK e de células T citotóxicas (HSIAO et al., 2008), além de uma proteína citotóxica que age interferindo diretamente a ação de monócitos e de DCs, de modo a impedir a iniciação de resposta imune efetora antitumoral (LIU et al., 2008). Também foi descrito que proporção de linfócitos B do sangue periférico diminui com a progressão do TVTC. Este achado foi atribuído à ação de uma proteína citotóxica produzida pelas células do tumor sobre os linfócitos B (LIAO et al., 2003).

Na fase estável, há um crescimento tumoral marcadamente mais lento, com um tempo de duplicação de aproximadamente três semanas. Após a fase estável, que pode durar de semanas a meses até indefinidamente, aproximadamente 80% dos tumores entram em fase de regressão, levando em média 12 semanas para a completa remissão (COHEN, 1985; CHU et al., 2001).

Enquanto na fase de progressão nota-se a presença predominante de células tumorais e muitas figuras mitóticas dispostas difusamente ao delicado estroma conjuntivo, a regressão tumoral associa-se à maior presença de infiltrado inflamatório (PÉREZ; DAY; MOZOS, 1998; LIAO et al., 2003), aumento de apoptose das células tumorais, áreas de necrose e fibrose (SANTOS et al., 2008), além de maior expressão de moléculas do MHC I e II, especialmente no estágio final da regressão (HSIAO et al., 2002; PÉREZ; DAY; MOZOS, 1998). Na fase de regressão, o efeito supressor do TGF- β parece ser equilibrado pelo efeito da IL-6 secretada por células T e macrófagos ativados presentes no microambiente tumoral. A IL-6 junto ao INF- γ produzido pelas células T induz a expressão de moléculas do MHC de classe I e II pelas células do TVTC, o que provavelmente não acontece durante a fase de progressão (HSIAO et al., 2008).

No entanto, embora os dados de pesquisas experimentais sejam usados para fornecer evidências de regressão no tumor de ocorrência natural, quando estabelecido em cães adultos e imunologicamente competentes (HIGGINS, 1966; MUKARATIRWA; GRUYS, 2003), estudos com acompanhamento clínico controlado não documentaram tal achado (ROGERS, 1997; BOSCO; TONTIS; SAMARTZI, 1999; DRUMOND et al., 2013).

Aparentemente, os estudos clínicos indicam que o TVTC natural apresenta um comportamento biológico bastante variado e diferente do tumor induzido experimentalmente, permanecendo no hospedeiro canino por períodos indeterminados na ausência de tratamento, o que aponta para a hipótese de que tal fato seja indicativo de uma inabilidade da imunovigilância no controle e combate

efetivo ao tumor. Portanto são necessários mais estudos para acompanhar e melhor esclarecer os eventuais processos imunológicos envolvidos na interação tumor/hospedeiro, e a sua real implicação na imunidade antitumoral.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

A proposta central deste estudo foi analisar sob o ponto de vista da imunidade tumoral, a interação entre TVTC natural e hospedeiro com base nas respostas imunes celulares, sobretudo nas fases clínicas de progressão e regressão do tumor, assim como avaliar o comportamento tumoral frente ao tratamento quimioterápico.

3.2 Objetivos Específicos

- Classificar os subtipos citológico e histológico do TVTC e avaliar a resposta ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina quanto à regressão macroscópica do tumor e presença de células tumorais ao exame citológico;
- Analisar a população de células mononucleares, como monócitos, macrófagos, células T (CD3+, CD4+, CD8+), células B e NK no sangue e no tumor por citometria de fluxo;
- Identificar e quantificar a expressão de moléculas do MHC de classe I e II no tumor por imunoistoquímica.

4. JUSTIFICATIVA

O TVTC é um modelo experimental de tumor transplantável que ganhou significativa importância para pesquisas aplicadas em estudos sobre o câncer. O tema da relação entre tumor e sistema imune tem possibilitado vários estudos, desde a pesquisa básica aplicada em modelos experimentais aos estudos clínicos, e seu entendimento tem potencial aplicação para melhor compreender os fenômenos que norteiam a biologia do câncer, assim como indicar potenciais terapias de combate ao câncer avançado em pacientes humanos e animais.

A revisão das evidências de regressão tumoral em estudos de transplantes experimentais mostra que o TVTC é uma doença bastante relacionada à imunidade do hospedeiro, com imunoestágio bem caracterizado. No entanto, embora muito se tenha aprendido sobre o comportamento biológico do tumor através de tais estudos, a evolução clínica do tumor de ocorrência natural em cães é menos compreendida. Ainda que uma fase de progressão com manutenção de crescimento celular e uma fase estável subsequente possam ser observadas, a regressão espontânea parece não ocorrer e torna o assunto bastante discutível.

Assim, o estudo dos eventos imunológicos envolvidos na interação entre tumor e hospedeiro pode ajudar a esclarecer questões divergentes e fundamentais relacionadas à biologia e tumorigênese do TVTC natural.

5. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Capítulo 2

Manuscrito

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

Anderson do Prado Duzanski^{1,2*}, Luis Mauricio Montoya Flórez^{2,3}, Haline Ballesterofêo², Graziela Gorete Romagnoli⁴, Ramon Kaneno⁴, Noeme Sousa Rocha^{1,2}

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Botucatu.

²Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Patologia Investigativa e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

³Universidad de Caldas, Veterinary Pathology Research Group, College of Agricultural Sciences, Manizales, Colombia.

⁴Universidade Estadual Paulista (UNESP), Laboratório de Imunologia de Tumores, Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Botucatu.

Autor para correspondência:

*E-mail: andersonduzanski@hotmail.com

Manuscrito modelo redigido para submissão para periódico científico.

RESUMO

DUZANSKI, A.P. **Interação entre hospedeiro e tumor venéreo transmissível canino: diversidade de células mononucleares e do complexo principal de histocompatibilidade.** 2017. 149 p. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017. O tumor venéreo transmissível canino (TVTC) ocorre naturalmente em cães, sem predileção por raça ou sexo sendo transmitido durante o coito ou hábitos sociais. É também um tumor transplantável experimentalmente e tem sido utilizado como modelo para o estudo da relação entre tumor e hospedeiro. Apesar da maior infiltração inflamatória intratumoral e da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) estar associada à regressão do tumor, o papel central das células imunes do hospedeiro na evolução clínica do TVTC ainda não está claro. Neste estudo nós buscamos analisar a interação entre TVTC natural e hospedeiro, especialmente sob o ponto de vista da imunidade celular tumoral. Aqui nós identificamos e quantificamos por citometria de fluxo células T (CD3+, CD4+ e CD8+), células NK, células B, macrófagos, em amostras de sangue e de tumor, além da expressão imunoistoquímica de moléculas do MHC de classe I e II, sobretudo nas diferentes fases clínicas do tumor, assim como classificamos os subtipos citológicos do tumor e avaliamos o comportamento tumoral frente ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina em uma amostra de 22 cães com TVTC natural. A quimioterapia foi efetiva no tratamento da maioria dos casos. Encontramos predomínio de TVTC linfocitóide e que metástases e resistência quimioterápica ocorreram apenas nos tumores de fenótipo linfocitóide e misto. Identificamos aumento significativo na expressão de moléculas de MHC classe I e II na fase de regressão. As células T CD3+ estavam igualmente presentes nas fases de progressão e regressão. Porém, as células T (CD4+ e CD8+), células NK e macrófagos estavam mais presentes na fase de regressão, enquanto as células B estavam em maior quantidade na fase de progressão, mas não foi possível correlacionar a fase clínica do tumor com um único tipo predominante de infiltrado inflamatório intratumoral.

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

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

Introdução

O Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC) é um tipo raro de tumor transmissível documentado, comumente diagnosticado em cães sem raça definida (SRD), sexualmente ativos, com livre acesso às ruas (BRANDÃO et al., 2002; STRAKOVA; MURCHISON, 2014; FÊO; FLÓREZ; ROCHA, 2016). Desde que Novinsky, em 1876, relatou o primeiro transplante experimental bem sucedido usando esta neoplasia (COHEN, 1978), além dos pesquisadores Smith e Washbourn, em 1898, terem demonstrado pela primeira vez a transmissão natural entre cães, quando 11 de 12 fêmeas cobertas por um macho portador do tumor desenvolveram a lesão genital (ROGERS, 1997), o tumor tem sido alvo de inúmeras pesquisas no que tange aos estudos oncológicos, genéticos e imunológicos (DUZANSKI et al., 2016).

Experimentalmente e sem influência terapêutica o TVTC é um modelo clássico de tumor que evolui conforme o imunoestágio. Exibe um padrão de crescimento, que inclui fase de progressão, seguida de estabilização e, por último, uma fase de regressão (CHU et al., 2001; HSIAO et al., 2002; HSIAO et al., 2008). Por outro lado, em cães imunossuprimidos, a exemplo de filhotes recém-nascidos e adultos desnutridos, o curso clínico normalmente termina em progressão tumoral com disseminação metastática (POWERS, 1968; YANG; JONES, 1973).

Com base em observações de estudos experimentais, fatores como taxa de apoptose, proliferação celular (SANTOS et al., 2008; FLÓREZ et al., 2016a), infiltrado inflamatório tumoral, fibrose (PEREZ; DAY; MOZOS, 1998; MUKARATIRWA; GRUYS, 2006), e sobretudo, expressão de moléculas do

complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (HSIAO et al., 2002; HSIAO et al., 2008) têm sido utilizados como indicadores da fase de progressão e regressão do TVTC no cão. No entanto, estudos com acompanhamento clínico controlado não documentaram a regressão espontânea no tumor natural (ROGERS, 1997; BOSCOS; TONTIS; SAMARTZI, 1999; DRUMOND et al., 2013).

Mais recentemente dados experimentais somados aos achados obtidos pelo estudo do câncer humano têm sustentado o reconhecimento de que o sistema imune exerce uma pressão seletiva sobre os tumores, induzindo sua eliminação ou seleção de variações celulares menos imunogênicas, que não são reconhecidas pela imunovigilância, sendo, portanto, capaz de moldar o seu fenótipo durante a evolução tumoral. Nesse caso, a imunovigilância, representa na verdade, apenas uma etapa de um processo mais amplo e dinâmico da relação entre o sistema imune e o tumor, chamado imunoedição (DUNN et al., 2002; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; SENGUPTA et al., 2010).

Estudos têm mostrado que as interações entre células tumorais e imunes podem ter efeitos tanto estimuladores como inibitórios na imunidade antitumoral, resultantes da composição celular heterogênea das células imunes presentes no microambiente tumoral e das diferentes interações entre estas e as células tumorais, implicando diferentes significados prognósticos (O'SULLIVAN, LEWIS, 1994; GAJEWSKI et al., 2006).

A revisão das evidências de regressão tumoral em estudos de transplantes experimentais mostra que o TVTC é uma doença bastante relacionada à imunidade do hospedeiro. Embora muito se tenha aprendido sobre o comportamento biológico

do tumor através de tais estudos, a evolução clínica do tumor de ocorrência natural em cães é menos compreendida. Neste estudo nós analisamos a interação entre TVTC natural e hospedeiro com base em respostas imunes celulares, sobretudo nas fases clínicas de progressão e regressão do tumor, assim como avaliamos o comportamento tumoral frente ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina.

Material e métodos

Comitê de Ética

Este estudo obteve parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Botucatu/SP, sob protocolo de número 126/2015 (Anexo D).

Casuística e avaliação clínica dos cães com TVTC

Ao longo do estudo foram estudados 22 cães com TVTC de ocorrência natural, com localização primária genital. O protocolo experimental incluiu estudo epidemiológico com base em informações obtidas dos tutores sobre história clínica do cão, hábitos de criação, histórico reprodutivo, contato com outros cães e densidade populacional, além de informações sobre tratamentos prévios para o tumor. O tempo de evolução do tumor foi estimado pela data de início da apresentação dos sinais clínicos até o momento do diagnóstico.

Os dados clínicos dos cães foram obtidos com base no exame físico geral,

exame hematológico e avaliação específica do tumor pelo sistema TNM clínico (Tumor, Linfonodo, Metástase), no qual incluiu a medição do tamanho do tumor através de paquímetro universal, avaliação dos linfonodos regionais, bem como a presença ou ausência de metástase através de inspeção visual e exame ultrassonográfico (Anexo E).

Além da citologia, todos os cães tiveram o diagnóstico de TVTC inteiramente confirmado pelas técnicas histopatológica e citogenética.

Coleta do tumor e de sangue

Fragmentos do tumor de aproximadamente 1,5cm³ foram coletados por biópsia incisional após antissepsia e anestesia do animal. Parte da amostra tumoral foi acondicionada em tubo falcon com solução salina e fosfatada (PBS) pH 7,2, e a outra em recipiente contendo formol tamponado a 10%, até o momento do uso. Também foram coletados de cada cão 10mL de sangue venoso periférico, mantidos em tubos BD Vacutainer com EDTA (Apêndice A).

Citopatologia

Amostras citológicas do tumor foram obtidas por meio de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), e coradas pelas técnicas de colorações Giemsa (May Grünwald Giemsa 2%) e Papanicolaou, no intento de observar mais claramente os fortes critérios de malignidade celular. Em seguida, as amostras foram analisadas por microscopia óptica, no aumento 630x.

Segundo a classificação citomorfológica proposta por Amaral et al. (2007), os tumores que apresentaram 60% ou mais de células redondas, com alta relação núcleo:citoplasma, caracterizadas por núcleos redondos, tendendo a centralização, foram classificados em fenótipo linfocitóide. Já os tumores compostos por 60% ou mais de células ovais, com baixa relação núcleo:citoplasma, apresentando núcleo excêntrico, foram classificados em fenótipo plasmocitóide. O tipo misto foi definido quando o tumor apresentou ambas células plasmocitóides e linfocitóides, porém com nenhuma das populações excedendo 59% do total de células.

Histopatologia

Cortes histológicos de 3µm corados pela Hematoxilina-Eosina (H.E) foram utilizados para classificar as fases clínicas do tumor, da seguinte forma: *fase de progressão* (alta celularidade imersa em delicado estroma), *fase de regressão inicial* (evidência de tecido estromal de forma moderada), e *fase de regressão final* (intensa proliferação de tecido estromal) conforme estudos de Mukaratirwa et al. (2003) e Stockmann et al. (2011). A análise das áreas histológicas foram feitas no microscópio óptico Carl zeiss, LAb A1, Germany, com o software AxioVision 4.8.

Imunoistoquímica

Cortes histológicos seriados de 3µm foram estendidos em lâminas (Slidtech Plus Novocastra® Newcastle UK). O material foi desparafinado em xilol e hidratado em álcool etílico em concentrações decrescentes. O bloqueio da peroxidase

endógena foi alcançado em solução de peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol; para a recuperação antigênica as lâminas imersas em tampão citrato 10mM, pH 6 foram levadas ao forno micro-ondas por 15 minutos; e para o bloqueio das reações inespecíficas foi utilizado leite em pó a 5%.

Em seguida, as amostras histológicas foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 1 – Apêndice B) em câmara úmida *overnight*, a 4°C. O sistema Novolink™ (Leica Biosystems Newcastle Ltd) foi utilizado para imunomarcação de moléculas de MHC classe I, e o sistema Envision™ (Dako) para imunomarcação de moléculas de MHC classe II. A revelação foi feita com solução cromógena Diaminobenzidina (DAB, 3.3' - DAKO® Carpinteria USA) e a contra-coloração com Hematoxilina de Meyer. Como controle positivo da reação imune foi utilizado amostra tecidual de linfonodo de cão saudável. Quanto ao controle negativo, o anticorpo foi substituído por solução tampão de Tris-HCl pH7,4.

Para identificar e quantificar a expressão de moléculas de MHC classe I e II, as reações obtidas foram avaliadas de forma semi-quantitativa, conforme critérios empregados por Flórez et al. (2016b), da seguinte forma: 1= < 25% de células marcadas (não marcado); 2 = 26-50% (marcação leve); 3= 51-75% (marcação moderada) e 4 = >75 % (= marcação intensa). A análise das imagens foi feita no microscópio óptico Carl Zeiss, LAb A1, Germany, com o software AxioVision 4.8.

Em todos os casos a avaliação foi realizada de forma independente por dois patologistas e os dados apresentados com a média das observações obtidas.

Citometria de fluxo

As amostras foram adquiridas no citômetro FACSCanto™ II [BD Biosciences, Configuração 4:2 - 2 lasers (Azul 488nm e Vermelho 633nm) com o software FACSDiva (BD Biosciences)]. Para análise no sangue o objetivo era ler 20.000 eventos totais. Do mesmo modo, para o tumor buscava ler 20.000 eventos totais. Os resultados foram analisados no software FlowJo, versão vX.10.6 (Tree Stars Inc.) e expressos em porcentagem de células positivas para os marcadores em questão (Figura 5 – Apêndice B).

Obtenção de amostras celulares

As amostras de sangue foram transferidas para tubos falcon contendo gradiente Histopaque 1077 (Sigma), em uma proporção de 1:1, e submetidas à centrifugação a 1500 rpm por 40 minutos, a 21°C. Após, as células mononucleares foram transferidas em novos tubos e lavadas duas vezes com meio de cultura celular [solução DMEM baixa glicose (Gibco), contendo 100UI/mL de penicilina e 250ng/mL de Anfotericina B] através de centrifugação a 1500 rpm, por 5 minutos. Por fim, as células foram ressuspensas em 1mL de meio de cultura para análise da quantidade e viabilidade celular pelo teste de exclusão com Azul de Tripán em câmara de Neubauer.

Com lâmina de bisturi, as amostras tumorais foram divididas em fragmentos menores com cerca de 3-5mm³, e após eliminado o tecido sanguíneo remanescente,

foram submetidas à digestão enzimática com Colagenase IV (Sigma), a 37,5°C em banho Maria, por 40 minutos. Em seguida, o tecido digerido foi transferido para um filtro peneira de nylon acoplado a um tubo falcon contendo meio de cultura, e lavado duas vezes com meio de cultura através de centrifugação a 1500 rpm, por 5 minutos. No final, as células do tumor foram ressuspensas e determinadas seguindo a mesma metodologia aplicada às células sanguíneas.

Para criopreservação das amostras, no mínimo cerca de 1×10^6 células/mL foram ressuspensas em solução de congelamento com 10% de dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma), 20% soro fetal bovino (SFB) e 70% de DMEM alta glicose (Gibco), contendo Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina-B. O material foi transferido e acondicionado em criotubos (Sarstedt) por 24h em Freezer -80°C, e em seguida, colocados em botijão criogênico a -196°C.

Imunofenotipagem de células mononucleares

Para determinar a frequência das células T (CD3+, CD4+, CD8+), células B (CD79α), células NK (Asialo GM1) e Macrófagos (MAC387), no mínimo cerca de 2×10^5 células viáveis foram adicionadas em tubos cônicos de 1,5mL e centrifugadas a 10000rpm, a 18°C, por 20 segundos em solução tampão de citometria (PBS-BSA 0,5%).

Depois de desprezados os sobrenadantes, os anticorpos conjugados anti-CD3+, anti-CD4+ e anti-CD8+, bem como os respectivos isotipos controles (Tabela 2 - Apêndice B), foram adicionados em concentrações apropriadas junto aos

sedimentos celulares e incubados por 20 minutos, a 4°C e ao abrigo da luz. Terminada a incubação, as amostras foram lavadas (centrifugação a 1000 rpm por 20 segundos) três vezes com 300µL de solução tampão de citometria e ressuspendidas em 200µL de solução fixadora (PBS-BSA 0,5% contendo 2% de formaldeído) para a análise. De modo similar seguiu a imunomarcação com o anticorpo anti-Asialo GM1, exceto pela inclusão do anticorpo secundário F (ab') anti-Rabitt IgG conjugado.

Quanto às imunomarcações de células B e macrófagos, as amostras primeiramente foram lavadas duas vezes com 250µL de solução tampão BD Perm/WashTM (BD Biosciences) e ressuspendidas em 250µL de solução BD Cytofix/CytopermTM (BD Biosciences) aguardando 20 minutos, a 4°C. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas duas vezes com solução tampão BD e incubadas com os anticorpos conjugados anti-CD79α e anti-MAC 387 por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Terminada a incubação, as amostras foram lavadas mais duas vezes com solução tampão BD e ressuspendidas em 200µL de solução tampão de citometria para análise.

Cultura primária de TVTC

Os isolamentos das culturas do TVTC seguiram conforme descrito por Hsiao et al. (2008) e Flórez et al. (2016b). As amostras tumorais foram mantidas em solução de tripsina (TrypLE Select – Invitrogen), a 37,5°C por 60 minutos no homogenizador magnético. Após a centrifugação e descartado o sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspendido com 5 mL de meio de cultivo [solução DMEM

alta glicose (Gibco), suplementada com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100U/mL de penicilina, 100mg/mL de estreptomicina (Gibco), e 3µg/mL de Anfotericina B (Gibco)], e acondicionado em frascos para cultura celular de 25 cm² (Sarstedt).

Por fim, as amostras 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, em câmara de Neubauer. Após três passagens de cultura, as amostras foram submetidas à análise citogenética para determinação do número de cromossomos presentes nas células do tumor.

Quimioterapia com sulfato de vincristina

Quanto à resposta clínica do tumor ao tratamento quimioterápico foram estabelecidas três categorias: *resposta completa* (RC), quando houve regressão total do tumor em 4 sessões de quimioterapia; *resposta parcial* (RP), quando houve regressão do tamanho do tumor em 50% ou mais em 4 sessões de quimioterapia e *resistentes* (R), quando foi necessário trocar o tratamento. Os cães receberam infusão semanal de sulfato de vincristina intravenosa, na dose de 0,75 mg/m². A duração da quimioterapia variou entre 3 a 8 semanas. Nos casos resistentes à vincristina, foi utilizada a doxorrubicina intravenosa, na dose de 30mg/m², a cada 21 dias, totalizando 3 aplicações.

A remissão completa do tumor foi determinada com base na ausência clínica de massa tumoral e de células tumorais no exame citológico. Para a constatação de recidiva, estes cães foram monitorados por um período de até oito meses após a cura.

Análise estatística

Devido ao tamanho e à distribuição não normal das amostras foram utilizados testes não paramétricos de Wilcoxon (duas amostras independentes) e de Kruskal-Wallis (três amostras independentes) para verificar se havia diferença significativa nas variáveis estudadas. Os resultados obtidos na imunoistoquímica e na citometria de fluxo foram comparados frente às categorias clínicas apresentadas pelos cães, incluindo raça, sexo, idade, subtipo citológico e fase clínica do tumor, além de resposta quimioterápica. Foram ainda comparados os resultados da citometria de fluxo obtidos no sangue e no tumor. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SAS e foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Com relação aos dados clínicos e epidemiológicos dos cães com TVTC foi utilizada a estatística descritiva no programa Excel e os resultados apresentados na forma de percentual e frequência.

Resultados e discussão

Dados epidemiológicos e clínicos dos cães com TVTC

Dos 22 casos de TVTC genital, observamos presença do tumor em 3 diferentes raças: Blue Heller (1), Border Collie (1) e Pincher (1). Os animais sem raça definida (SRD) foram os mais acometidos, com 86% (19) dos casos. Quanto à idade, 55% (12) dos cães eram adultos com idade entre 2 e 7 anos, 32% (7) eram animais jovens com idade menor a de 2 anos, e 13% (3) animais idosos com idade

entre 8 anos e 13 anos (Apêndice C). A faixa etária dos cães aqui mais diagnosticada reflete o período de maior atividade sexual (DAS; DAS, 2000; GANGULY; DAS; DAS, 2013).

Neste estudo 55% (12) dos cães eram machos e 45% (10) fêmeas, assim como também foi encontrado por Chikweto et al. (2013). Embora haja estudos apontando maior ocorrência do TVTC nas cadelas (BRANDÃO et al., 2002) e outros referindo os machos como os mais acometidos (FÊO; FLÓREZ; ROCHA, 2016), em geral, não há predisposição do tumor em relação ao sexo, idade e raça, ocorrendo na maior parte das vezes em animais sexualmente ativos e SRD. Isso pode indicar uma maior população de cães SRD, um baixo controle de cruzamentos e fácil acesso dos animais às ruas (STRAKOVA; MURCHISON, 2014).

Quanto aos hábitos de reprodução, todos os cães tinham livre acesso às ruas sendo impraticável o controle sobre a origem dos contatos. Os animais não eram esterilizados, exceto uma fêmea SRD que adquiriu o tumor genital mesmo após a cirurgia de ovário-histerectomia (OSH). A cadela apresentou retorno ao cio e foi coberta por um macho portador. Sinais de estro após castração são característicos da síndrome do ovário remanescente (SANGSTER, 2005).

A história junto ao exame clínico proporcionou a suspeita do tumor genital. Os principais sinais observados foram corrimento serossanguinolento oriundo do pênis e da vagina, aumento e deformidade genital, dificuldade de exposição peniana, e presença de massa visível. Na avaliação específica do TVTC pelo sistema TNM, em geral as massas genitais eram formações vegetantes multilobulares, em formato de couve-flor ou de placas, de coloração avermelhada ou rosácea, sendo comumente

notadas áreas necrosadas (Apêndice D). Quanto ao tamanho do tumor, observamos diâmetro entre 2 e 5cm (T2) em 45% (10), tamanho acima de 5cm (T3) em 32% (7), invasão local com extensão tumoral (T4) em 18% (4) e diâmetro menor com menos de 2cm (T1) em 5% (1) dos casos.

Nas fêmeas o sítio mais comum de implante do tumor foi no vestíbulo vaginal com protrusão da massa tumoral, além da genitália externa. Quanto aos machos a região do bulbo peniano foi a mais acometida. Alterações secundárias à presença do tumor incluíram presença de miíase em 13% (3) dos casos. Não foram verificadas infecções e obstruções das vias urinárias, apesar do tumor predispor aos distúrbios urinários (BATAMUZI; KRISTENSEN, 1996). Em geral, os cães estavam em boas condições físicas, mas em praticamente todos os casos houve menção de algum grau de emagrecimento.

Metástases de TVTC são consideradas incomuns (VERMOOTEN, 1987; CHIKWETO et al., 2013), com ocorrência na maioria das vezes estimada entre 0 e 5% dos casos (STRAKOVA; MURCHISON, 2014). Foram descritos casos de metástases acometendo olhos (FERREIRA et al., 2000), pele e tecido subcutâneo (SANTOS; CARDOSO; OLIVEIRA, 2011), tonsilas, cérebro, medula espinhal, músculos, ossos, glândula mamária, hipófise, rins, baço, pâncreas, fígado, pulmão, ovários, testículos, e mais comumente linfonodos regionais (CHIKWETO et al., 2013; STRAKOVA; MURCHISON, 2014). Aqui observamos metástases de TVTC em 9% (2) dos casos, incluindo linfonodo regional (N1) e baço (M1), em cães que apresentaram grandes crescimentos tumorais (Apêndice D). Achados similares foram encontrados em um estudo retrospectivo de 127 casos do tumor, reportando taxa de

mestástases de 7,9% (BRANDÃO et al., 2002).

A presença do TVTC no cão pode ainda acarretar distúrbios hemodinâmicos. Foi reportado eritrocitose absoluta associada ao aumento sérico de eritropoietina como quadro clínico de síndrome paraneoplásica em cães transplantados (COHEN, 1985) e naturalmente adquiridos (DUARTE et al., 2006). Outro estudo descreve que os animais portadores naturais do tumor apresentaram anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia, enquanto alguns cães transplantados mostraram aumento dos parâmetros eritrocitários (APTEKMANN et al., 2005).

Aqui a média do perfil hematológico dos cães com TVTC sem a influência quimioterápica não mostrou alterações significativas. No entanto verificamos anemia em 18% (4), linfopenia em 23% (5) e trombocitopenia em 41% (9) dos casos (Tabela 5 – Apêndice C). Quadros de anemia e trombocitopenia podem estar associados às características intrínsecas do TVTC, como a natureza bastante vascularizada e friável do tumor, que tende a resultar em contínua secreção serosanguinolenta. Contudo, alguns autores atribuem a anemia ao quadro populacional canino mais predisposto, como nutrição deficiente, verminose concomitante, ectoparasitas e livre acesso às ruas (APTEKMANN, 2005).

Vários estudos mostram que o exame citológico promove, na maioria das vezes, o diagnóstico conclusivo de TVTC. É uma técnica simples, rápida, minimamente invasiva, indolor e de baixo custo (BRANDÃO et al., 2002; AMARAL et al., 2007; VARUGHESE et al., 2012; ROCHA; TREMORI; CARNEIRO, 2014). Em nosso estudo o exame citológico aspirativo por agulha fina (CAAF) constituiu uma valiosa ferramenta diagnóstica, levando à sensibilidade de 100% (22) nos casos

de TVTC natural, além de ter possibilitado a classificação dos subtipos citológicos do tumor e a caracterização dos critérios de malignidade (Apêndice E). Porém a avaliação citológica não possibilita identificar invasão de tecidos adjacentes (DUNCAN; PRASSE, 1979).

Em atenção às alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas, observamos que os oncócitos se mostraram individualizados, de tamanhos variáveis entre 13 a 25 µm, caracterizados por citoplasma com contornos bem delimitados e distintos, discretamente basofílico, contendo múltiplos vacúolos claros dispersos. Os núcleos excêntricos ou centrais, conforme o subtipo plasmocitóide ou linfocitóide do TVTC, respectivamente, mostraram cromatina agregada e nucléolos proeminentes. Com relação aos vacúolos citoplasmáticos, Meinkoth e Cowell (2002) ressaltam que esse achado é uma característica morfológica que costuma distinguir o TVTC das outras células neoplásicas redondas, sendo que sua ausência é rara nas células do tumor.

Alterações malignas observadas por anisocitose, anisocariose, binucleação, macrocariose, hipercromasia, células fantasma, figuras de mitose, e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e polimorfonuclear, foram encontradas em algum grau, independente da fase clínica do TVTC natural (Apêndice E), corroborando os achados descritos em outros estudos (MUKARATIRWA et al., 2006; STOCKMANN et al., 2011). Notamos ao mesmo tempo que ambos os subtipos citológicos plasmocitóide e linfocitóide do tumor exibiram critérios citoplasmáticos e nucleares de malignidade. Outro estudo recente mostrou não haver diferença estatística entre os subtipos celulares do TVTC e a presença de critérios de malignidade (LIMA et al.,

2013).

A eficácia do citodiagnóstico teve comprovação nos exames histológico e citogenético. A análise citogenética contribuiu no diagnóstico definitivo de TVTC porque a diferença de cariótipo é altamente significativa entre as células normais do cão e tumorais. Enquanto no cão o cariótipo normal é de 78 cromossomos, dos quais 76 são acrocêntricos e um par sexual é metacêntrico, células do tumor podem exibir variação no número de cromossomos, entre 56 a 68 (FLÓREZ et al., 2016b), onde 15 a 17 cromossomos são metacêntricos ou submetacêntricos (MURGIA et al., 2006). Neste estudo a caracterização citogenética do TVTC a partir de cultivos primários, igualmente mostrou uma ampla variação no número de cromossomos nas células tumorais, entre 54 a 72 (Apêndice F), apoiando a teoria do transplante contínuo de células a gerações.

Fenótipo celular e comportamento biológico do TVTC

Diferenças parecem existir na linhagem celular do TVTC, em função do grau de variação em relação ao seu comportamento biológico. Estudos mostram que os tumores de fenótipo plasmocitóide estão associados a maior frequência de anormalidades nucleares e nucleolares, maiores índices mitóticos e de proliferação celular (marcador Ki-67), expressão de glicoproteína-P (P-gp), além de menor quebra de DNA no teste do cometa. Em condições clínicas, estes achados podem implicar maior agressividade, metástases, recidivas e resistência quimioterápica (DUZANSKI et al., 2016).

Neste estudo encontramos evidências que sugerem uma relação entre subtipo citológico e tamanho do tumor. Vimos que os tumores (T4) apresentaram apenas padrão celular linfocitóide ou misto, enquanto o tipo de célula plasmocitóide foi predominante nos tumores menores (T2), corroborando achados de outros pesquisadores (LIMA et al., 2013). Não reportamos aqui uma relação entre tempo transcorrido de evolução tumoral e fenótipo celular, uma vez que os proprietários não forneceram informações exatas sobre o tempo de evolução das lesões nos cães. Ainda, a identificação das fases de progressão e regressão do TVTC com base nos fatores histológicos, como a relação celularidade e tecido estromal, não mostrou haver diferença entre os subtipos citológicos do tumor.

Alguns estudos têm apontado para uma maior frequência de TVTC de fenótipo plasmocitóide em cães (AMARAL et al., 2007; LIMA et al., 2013; PARANZINI et al., 2015), o que não foi corroborado pelos dados deste estudo, no qual 36% (8) dos tumores foram caracterizados em fenótipo linfocitóide, 32% (7) plasmocitóide, e outros 32% (7) misto. Outro estudo anterior também não encontrou predomínio de fenótipo plasmocitóide nos tumores estudados, mas em igual proporção ao fenótipo linfocitóide e misto (SIMERMANN, 2009).

Enquanto há evidência de uma associação entre o fenótipo plasmocitóide do TVTC e a maior agressividade e resistência quimioterápica (AMARAL et al., 2007; DUZANSKI et al., 2016), outros estudos clínicos têm mostrado que os subtipos citológicos do TVTC não diferem em relação à resposta ao tratamento com sulfato de vincristina, assim como aos critérios de malignidade (SIMERMANN, 2009; LIMA et al., 2013; PARANZINI et al., 2015). Interessante notar em nosso estudo que

metástases e resistência quimioterápica ocorreram apenas em tumores maiores (T3/T4), em fase de progressão e de fenótipo celular linfocitóide e misto, embora tenhamos encontrado resposta completa (RC) ao tratamento em todos os subtipos citológicos do tumor (Apêndice C). Estes achados sugerem que fatores intrínsecos ao comportamento biológico do TVTC, tais como resistência e agressividade não parecem estar associados unicamente ao subtipo citológico do tumor, e necessitam, portanto, de maiores esclarecimentos, especialmente no que tange aos aspectos moleculares envolvidos, para melhor associar o subtipo tumoral ao seu comportamento biológico.

A quimioterapia com sulfato de vincristina implicou diferentes respostas do TVTC. Entre os cães que receberam tratamento, 65% (11) mostraram resposta parcial, 23% (4) resposta completa e 12% (2) apresentaram resistência à droga. Em geral, a vincristina foi eficaz em 88% dos casos e a cura foi alcançada entre três a seis sessões quimioterápicas, sem causar recidiva. Outro estudo reportou a cura de 90% dos cães com TVTC com apenas três aplicações de vincristina (OLGIVIE, 1996). A resistência do tumor à terapia é um fenômeno multifatorial. Dentre alguns fenômenos que regulam esse processo, é citada a elevada expressão de moléculas que transportam as drogas para fora da célula, a exemplo da P-gp, um produto do gene MDR-1 expresso pelas células do TVTC (GERARDI et al., 2014; FLÓREZ et al., 2016a).

A vincristina age sobre o aparelho mitótico da célula, e em particular exerce atividade citotóxica por perturbar a formação de microtúbulos celulares, induzindo a inibição da replicação celular, sendo que isso geralmente resulta em mielossupressão

(ALLEMAN; HARVEY, 1991; HANTRAKUL et al., 2014). Embora a toxicidade hematológica seja o efeito colateral mais comumente associado ao uso da droga, há também menção à anorexia, vômito, diarreia, depressão, hiperestesia, ataxia, queda de pelos, úlcera cutânea (MARTINS et al., 2014) e infertilidade temporária (SARATSIS; YPSILANTIS; TSELKAS, 2000). Aqui, após a primeira ou segunda sessão de quimioterapia, observamos que alguns poucos animais apresentaram determinados episódios de anorexia e vômitos, além de moderada queda de pêlos, mas não caracterizada por áreas de alopecia. Por outro lado, a toxicidade hematológica, como leucopenia e trombocitopenia pôde ser observada em 88% (15) dos casos tratados, em menor ou maior grau.

Ao exame histológico, 86% (19) dos tumores aqui estudados foram caracterizados em fase de progressão, dois casos em fase de regressão inicial e um apenas em fase de regressão final (Apêndice G). Não encontramos uma associação entre a fase clínica do TVTC natural e a resposta quimioterápica. Enquanto tumores em fase de progressão apresentaram desde resposta completa até resistência quimioterápica, entre os tumores em fase de regressão, incluindo regressão final, houve resposta parcial, sendo que apenas um mostrou resposta completa. Ainda, outro recente estudo reportou resistência quimioterápica na fase de regressão do tumor (FÊO, 2016).

Estes achados levam a acreditar que o TVTC natural possui evolução clínica bastante diferenciada em relação ao tumor transplantado experimentalmente, que mostra um comportamento biológico relativamente previsível. Inicialmente ocorrem as fases de crescimento e estabilização, mas a regressão espontânea do tumor natural

provavelmente não ocorre. Tal hipótese pode ainda ser apoiada por outros estudos que não documentaram a regressão em tumores de ocorrência natural (ROGERS, 1997; BOSCO; TONTIS; SAMARTZI, 1999; DRUMOND et al., 2013).

Expressão de moléculas de MHC classe I e II e infiltrado inflamatório intratumoral

Dada a capacidade de tumores para manipular o sistema imunológico do hospedeiro (GAJEWSKI et al., 2006; SENGUPTA et al., 2010), talvez não seja surpreendente observar que as células tumorais possam adquirir a capacidade de passar entre indivíduos através de transplantes alogênicos, tornando-se um tipo de tumor transmissível como no caso do TVTC em cães.

Sendo assim, o processo de iniciação e progressão do TVTC em cães receptores parece ocorrer principalmente pela evasão das células tumorais aos mecanismos de imunovigilância relacionados à via do MHC (SIDDL; KAUFMAN, 2015). O TVTC experimental exibe um padrão de crescimento, que inclui fase de progressão, seguido de estabilização e, por último, uma fase de regressão (CHU et al., 2001; HSIAO et al., 2002). Porém, em cães imunossuprimidos o curso clínico normalmente termina em progressão tumoral com disseminação metastática (POWERS, 1968; YANG; JONES, 1973; MUKARATIRWA; GRUYS, 2003).

Enquanto na fase de progressão do TVTC nota-se a presença predominante de células tumorais e muitas figuras mitóticas dispostas difusamente ao delicado estroma conjuntivo, a regressão tumoral parece estar associada à infiltração de células imunes (HILL; YANG; WACHTEL, 1984; PEREZ; DAY; MOZOS, 1998;

LIAO et al., 2003) e maior expressão de moléculas MHC classe I e II (HSIAO et al., 2002; MUKARATIRWA; GRUYS, 2003; HSIAO et al., 2008). Ademais, a apoptose das células tumorais resultante da ativação do gene supressor tumoral P53 também representa importante papel na regressão do TVTC experimental (SANTOS et al., 2008).

Neste estudo, através de análise imunoistoquímica encontramos diferença estatisticamente significativa ao compararmos a expressão de moléculas de MHC classe I ($P < 0,004$) e de MHC classe II ($P < 0,003$) com as fases de progressão e regressão do TVTC natural. Notamos que na progressão do tumor houve baixa expressão de moléculas MHC ($6,9 \pm 3,1\%$ classe I e $13 \pm 4,1\%$ classe II), aumentando consideravelmente na fase de regressão ($18,6 \pm 5,8\%$ classe I e $38,5 \pm 6,5\%$ classe II) (Apêndice H). Não observamos diferença estatisticamente significativa ao comparar as expressões de MHC I e II com os subtipos citológicos (plasmocitóide, linfocitóide e misto) do TVTC, assim como às demais subcategorias clínicas dos cães ($P > 0,05$).

Nossos resultados confirmam alguns estudos experimentais prévios que descreveram que as moléculas de MHC podem estar subexpressas na progressão do TVTC (PEREZ; DAY; MOZOS, 1998; HSIAO et al., 2002), enquanto o fator de crescimento transformador beta ($TGF-\beta 1$) produzido pelos oncócitos tende a estar elevado (HSIAO et al., 2004). Após a fase progressiva, cerca de 3 meses, o tumor geralmente regride espontaneamente, apresentando superexpressão do MHC pelas células (HSIAO et al., 2008).

A apresentação defeituosa dos complexos peptídeo-MHC de classes I e II pela

célula tumoral pode permitir que o tumor escape do reconhecimento por células T CD8⁺ e T CD4⁺, respectivamente (SENGUPTA et al., 2010). A perda ou baixa regulação de subunidades de proteassoma, TAP1, TAP2, β 2-microglobulinas (p2m) ou mesmo a cadeia pesada do MHC I foram bem documentadas em alguns tumores sólidos humanos (KAKLAMANIS et al., 1994; QUADRI; SINGAL, 1998).

De outra parte, tumores podem estimular tanto respostas imunes primárias mediadas por células e fatores solúveis, como respostas mais específicas e adquiridas (SENGUPTA et al., 2010). O TVTC experimentalmente transplantado mostra que a resposta imune do hospedeiro tem importante papel na evolução e severidade do tumor. Isso pode ser explicado, em parte, pelo fato de cães imunocompetentes apresentarem regressão espontânea, enquanto cães imunossuprimidos, como filhotes recém-nascidos e adultos desnutridos, o curso clínico do tumor termina em progressão e metástases (POWERS, 1968; YANG; JONES, 1973).

Acredita-se que transição da fase progressiva para a regressiva do TVTC experimental seja desencadeada pela indução da expressão de MHC por infiltrado linfocitário tumoral (TIL) (SIDDL; KAUFMAN, 2015). Estudos descrevem que a proporção de TIL é maior nos tumores em regressão do que naqueles em fase de progressão (TRAIL; YANG, 1985; BARBER; YANG, 1999; HSIAO et al., 2008), e que o aumento de linfócitos infiltrantes CD8⁺ e CD4⁺ na fase regressiva do TVTC sugere que a regressão do tumor ocorre na dependência de uma reposta imune específica do hospedeiro (HSIAO et al., 2008).

No entanto, mesmo quando o tumor se encontra em fase de progressão há infiltração tumoral por células T, assim como por células B, células NK e macrófagos

(HILL; YANG; WACHTEL, 1984; PEREZ; DAY; MOZOS, 1998; HSIAO et al., 2004; TROMPIERI SILVEIRA et al., 2009). Em nosso estudo com TVTC natural, a análise pela citometria de fluxo não mostrou haver diferença significativa entre as populações mononucleares do sangue periférico e do tumor quando comparadas com as fases clínicas de progressão (P) e regressão (R) do tumor ($P>0,05$). Não encontramos ainda evidência de uma correlação entre subtipo citológico do tumor e resposta imune (Apêndice I). Apesar de o TVTC de padrão misto ter mostrado uma maior frequência de células T CD4⁺ ($P<0,01$) e de células B ($P<0,3$) no sangue, e maior infiltrado intratumoral de células NK ($P<0,2$) não encontramos nenhuma outra diferença imune expressiva entre os subtipos do tumor, indicando, portanto, não haver diferença quanto à interação tumor/hospedeiro ($P>0,05$).

Por outro lado, a análise pela citometria de fluxo nas amostras tumorais mostrou evidência de uma diferença biológica entre as células imunes nas fases de progressão (P) e de regressão (R) do TVTC natural. Na fase de regressão encontramos uma maior presença de células NK (R. $9 \pm 8,2\%$ e P. $6 \pm 8,1\%$) ($P<0,1$), e de macrófagos (R. $54,4 \pm 58,6\%$ e P. $29,6 \pm 32,5\%$) ($P<0,1$), enquanto na fase de progressão verificamos maior presença de células B (P. $16,6 \pm 14,1\%$ e R. $5,7 \pm 6,1\%$) ($P<0,06$). Identificamos ainda igual presença de células T CD3⁺ nas fases de progressão e de regressão do tumor, porém com infiltração maior de T CD4⁺ (P. $54,9 \pm 22,4\%$ e R. $63 \pm 10,7\%$) ($P<0,4$) e de células T CD8⁺ (P. 11 ± 14 e R. $15,1 \pm 9,6\%$) ($P<0,2$) na regressão do tumor, como descrito em estudos com TVTC induzido experimentalmente (HILL; YANG; WACHTEL, 1984; HSIAO et al., 2008).

Embora a perda de moléculas de moléculas MHC I pelo tumor ative a

atividade citotóxica de células NK, nossos achados em citometria podem sugerir que durante a fase de progressão as células do TVTC produziram quantidades elevadas de fator TGF- β 1 (HSIAO et al., 2004) que foram capazes de suprimir as células NK e os macrófagos no microambiente tumoral, uma vez que esta citocina pode impedir a imunidade inata antitumoral por inibir a atividade de células NK, assim como o recrutamento e ativação de macrófagos no tumor (CORRADIN et al., 1993; FLAVELL et al., 2010). Contudo, pesquisas adicionais são necessárias para uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais o TVTC lança mão para escapar da imunovigilância exercida por células NK (SIDDL; KAUFMAN, 2015).

Se por um lado células B podem colaborar na promoção tumoral através da produção de TGF- β 1 (BJARNADÓTTIR et al., 2016), por outro têm papel crucial na geração da imunidade humoral do TVTC, caracterizada pela produção de imunoglobulinas que exercem função efetora na ativação do sistema complemento contra as células tumorais (EPSTEIN; BENNETT, 1974; FELTON; YANG, 1988). Além disso, a citotoxicidade celular anticorpo-dependente só ocorre na presença dos linfócitos B, os quais serão as primeiras células imunes a se infiltrarem no TVTC (CHANDLER; YANG, 1981). Logo, as células NK e os macrófagos são atraídos pela ligação das imunoglobulinas na superfície das células tumorais, podendo induzir à lise celular por citotoxicidade (MIZUNO; FUJINAGA; HAGIO, 1994; PÀGES et al., 2010).

Muito além do seu papel no desenvolvimento da imunidade humoral, as células B são APCs eficientes para as células T, programando a diferenciação e expansão de células T efetoras contra tumores (GRAY; GRAY, BAR, 2007; FREMD

et al., 2013). Um interessante estudo mostrou que células T vírus-específicas foram eficientemente induzidas na presença de uma linhagem de células B expressando antígeno específico (SUN et al., 1999). Também foi reportado que a ausência congênita de células B resultou em anormalidades no sistema imune, incluindo a diminuição no número e na diversidade de timócitos, defeitos nas células DC e compartimentos de células T, a falta de placas de Peyer, além de uma ausência de subgrupos de macrófagos acompanhada por níveis diminuídos de quimiocinas específicas (LEBIEN; TEDDER, 2008).

Enquanto células T dependem de apresentação de antígenos pelo MHC para destruir células tumorais, células B reconhecem e interiorizam antígenos tumorais através de seus IgR de superfície, apresentando os peptídeos gerados no contexto das moléculas do MHC II para células T CD4⁺. Evidências crescentes mostram ainda que as células B também fazem apresentação cruzada *in vivo*, expressando antígenos específicos de tumor via MHC I para células T CD8⁺ (HON et al., 2005; FREMD et al., 2013).

Acredita-se que quando o nível de IL-6 secretado por linfócitos TIL atinge um determinado limiar, inicia-se sua atividade em sinergismo com o IFN- γ , também secretado por TIL, macrófagos ativos e células NK, de modo a ativar a expressão de moléculas do MHC pelas células do TVTC, dando início a fase de regressão (HSIAO et al., 2004; SIDDLE; KAUFMAN, 2015). Porém, um estudo em imunoistoquímica do infiltrado linfocitário no TVTC experimental constatou que células T CD4⁺ e CD8⁺ foram predominantes na progressão do tumor e menos presentes na fase de regressão (TROMPIERI SILVEIRA et al., 2009).

Em nosso estudo, a evidência de células T (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺) já na fase de progressão do TVTC natural pode sugerir possibilidade de influência de células B na regulação e expansão de células T contra o TVTC natural ao desempenhar função de APC, como já foi bem documentado em outros estudos que apontaram para o envolvimento de células B na indução de ótimas respostas de células efetoras T CD4⁺ e T CD8⁺ contra tumores (RON et al., 1983; LANZAVECCHIA; BOVE, 1985; SCHULTZE et al., 1997; LEBIEN; TEDDER, 2008; DILILLO et al., 2010).

Por outro lado, embora o infiltrado linfocitário intratumoral seja considerado uma manifestação da resposta imunológica contra o tumor, há bastante controvérsia sobre as células T terem um papel central na imunidade antitumoral (O'SULLIVAN, LEWIS, 1994, GAJEWSKI, 2006; BAILEY et al., 2014). Nossos dados em citometria de fluxo mostram que a intensa proliferação de células T na fase de progressão do TVTC natural não foi capaz de impedir o crescimento tumoral, sugerindo um certo tipo de tolerância imunológica ou de inabilidade das células T no combate efetivo ao tumor. Isto talvez possa ter ocorrido devido à baixa expressão de moléculas do MHC I e II pelo TVTC, como encontramos aqui. Outros estudos também evidenciaram que apesar das células T estarem presentes no TVTC em progressão, a atividade citotóxica para as células do tumor parece ser melhor observada na fase de regressão (CHANDLER; YANG, 1981; TROMPIERI SILVEIRA et al., 2009).

Outra hipótese é quanto à subversão da imunidade antitumoral pelo TVTC. A superexpressão de fator TGF- β pelas células do TVTC durante a fase de progressão (HSIAO et al., 2004) pode ter regulado a proliferação e diferenciação de células T

CD4⁺ e CD8⁺ em células T reguladoras (Treg) no sítio tumoral, que são altamente capazes de inibir mecanismos antitumorais da imunidade natural e adquirida (WEI et al., 2005; ZOU, 2006; FLAVELL et al., 2010). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a indução de células T reguladoras CD8⁺ é independente das células T reguladoras CD4⁺, e que ambas as células suprimem significativamente as respostas efectoras das células T aos tumores e promovem o crescimento tumoral (RIFA et al., 2004; WEI et al., 2005; ZOU, 2006). Adicionalmente, dados experimentais sugerem que TGF- β 1 favorece a formação de metástase de tumores através dos seus efeitos sobre as células presentes no microambiente tumoral (FLAVELL et al., 2010).

Portanto a relação entre o infiltrado de células imunes e o seu papel na fase evolutiva do TVTC, assim como o mecanismo exato pelo qual regula a expressão do MHC durante as fases de progressão e regressão do tumor ainda não está claro (TROMPIERI SILVEIRA et al., 2009; SIDDLE; KAUFMAN, 2015). Além disso, evidências crescentes mostram que a resposta imune gerada pelo hospedeiro pode moldar a imunogenicidade do tumor, dando origem a variantes mutantes que conferem resistência à pressão exercida pela imunovigilância, num processo descrito como imunoedição tumoral. Nesse processo as células tumorais continuam a se proliferar como células editadas, indetectáveis pela imunidade antitumoral, e podem eventualmente levar a malignidade do tumor (DUNN et al., 2002; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; SENGUPTA et al., 2010).

Muitas vezes o balanço entre a resposta imune anti e pró-tumorigênica se torna então a favor do crescimento do tumor (DUNN et al., 2002). Isto talvez possa explicar o paradoxo aparente de regressão espontânea no TVTC natural, que mesmo

estabelecido em cães saudáveis e imunocompetentes, o tumor aparentemente parece sobreviver por períodos indeterminados e pode metastatizar para linfonodos ou órgãos à distância, incorrendo, deste modo, em uma possível influência do próprio sistema imune nos eventos biológicos associados à tumorigênese e ao escape da imunovigilância.

Em nosso estudo, a análise pela citometria de fluxo mostrou que em geral, as células mononucleares estudadas foram mais expressivas no sangue (S) do que no tumor (T), exceto unicamente pela população de células T CD4⁺, que foi encontrada em maior número no microambiente tumoral (S. $52 \pm 7,5\%$ e T. $56 \pm 16,5\%$) ($P < 0,1$) (Apêndice I). No sangue, diferença significativa foi encontrada nas populações de células T CD3⁺ (S. $69 \pm 18,8\%$ e T. $32 \pm 15,7\%$) ($P < 0,001$) e de monócitos (S. $49,5 \pm 29,4\%$ e T. $32,1 \pm 29\%$) ($P < 0,001$), assim como uma diferença biológica nas populações de células T CD8⁺ (S. $18 \pm 12\%$ e T. $12,3 \pm 9,9\%$) ($P < 0,1$), células B (S. $20,7 \pm 15,8\%$ e T. $15,5 \pm 9,7\%$) ($P < 0,2$) e de células NK (S. $8,1 \pm 4,6\%$ e T. $6,5 \pm 6\%$) ($P < 0,09$).

Quanto às demais subcategorias clínicas dos cães com TVTC, observamos que em geral, as células mononucleares tanto circulantes quanto infiltrantes foram predominantes nos cães de raça e cães fêmeas, indicando que além do sexo, as diferenças genótípicas entre animais de raça e sem raça definida (SRD) parecem provocar variação na atividade do sistema imune (Apêndice I). Assim, cães de raça mostraram uma diferença significativa no sangue em relação às células T CD4⁺ (Raça $61,3\% \pm 6,2$ e SRD $51,2 \pm 9,1\%$) ($P < 0,02$) e células B (Raça $49 \pm 21,1\%$ e SRD $17 \pm 16,6\%$) ($P < 0,02$), e no tumor em células T CD4⁺ (Raça $74,1 \pm 8,4\%$ e

SRD $52,5 \pm 21,5\%$) ($P < 0,03$). Quanto ao sexo, enquanto as fêmeas mostraram diferença significativa no sangue em relação às células T CD3+ (F. $78,8 \pm 14,1\%$ e M. $63,9 \pm 25,2\%$) ($P < 0,05$) e T CD8+ (F. $24,7 \pm 12,2\%$ e M. $13,3 \pm 14,3\%$) ($P < 0,02$), machos apresentaram diferença em relação às células NK (F. $5,5 \pm 3,9\%$ e M. $8,5 \pm 7,9\%$) ($P < 0,04$). No microambiente tumoral, as fêmeas mostraram ainda diferença expressiva em relação às células T CD4+ (F. $65,5 \pm 11,2\%$ e M. $47,74 \pm 24,8\%$) ($P < 0,05$) e biológica quanto aos macrófagos (F. $43,2 \pm 39\%$ e M. $23 \pm 28,2\%$) ($P < 0,1$). Outro estudo também encontrou células T mais presentes nas fêmeas em comparação aos cães machos (GREELEY et al., 1996).

Estudos reportaram que mediadores endócrinos podem modular o sistema imune humoral e celular. *In vitro*, os estrogênios promoveram a proliferação dos linfócitos T, diferenciação, proliferação e sobrevivência dos linfócitos B e maior produção de imunoglobulinas (KANDA; TAMAKI, 1999). *In vivo*, mulheres têm o timo mais desenvolvido, maiores níveis de imunoglobulinas e maior proporção de linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico (MEDEIROS; MEDEIROS; OLIVEIRA, 2006). Outro estudo também aponta para uma correlação positiva entre os níveis séricos de estrogênio e a relação CD4/CD8. Após ooforectomia, a porcentagem de células CD4+ e CD8+ e de citocinas imunomoduladoras diminuíram (KUMRU; GODEKMERDAN; YILMAZ, 2004). Portanto fêmeas parecem possuir uma resposta imune celular e humoral mais ativa do que machos.

Ao analisarmos a influência da idade sobre as populações mononucleares dos cães com TVTC, observamos que enquanto os animais idosos mostraram uma diferença biológica no sangue em relação às células T CD8+ (Jovem $16,9 \pm 14,1\%$,

Adulto $14,7 \pm 14,4\%$ e Idoso $30,3 \pm 16,9\%$) ($P < 0,3$), os animais jovens mostraram diferença em relação às células B (Jovem $27,6 \pm 21,6\%$, Adulto $16,7 \pm 20,1\%$ e Idoso $21,4 \pm 17,7\%$) ($P < 0,4$). Já no microambiente tumoral, os animais idosos apresentaram maior presença de células T CD3+ (Jovem $31,4 \pm 14,4\%$, Adulto $27,2 \pm 21,6\%$ e Idoso $49,2 \pm 29,6\%$) ($P < 0,3$) e de células T CD8+ (Jovem $6,5 \pm 4,7\%$, Adulto $10,6 \pm 12,3\%$ e Idoso $31,7 \pm 16,5\%$) ($P < 0,07$), enquanto os animais jovens apresentaram maior infiltrado de células B (Jovem $27,8 \pm 17\%$, Adulto $8,7 \pm 4,8\%$ e Idoso $9,5 \pm 3,8\%$) ($P < 0,02$) (Apêndice I). A atividade de macrófagos e de células NK não foi afetada pela idade, como já foi descrito em outro estudo (GREELEY et al., 1996). Nossos dados sugerem uma relação entre o envelhecimento do animal e aumento na população de células T CD8+, assim como um declínio da resposta imunológica por células B.

Vários estudos que acompanharam a dinâmica e o desenvolvimento da imunidade celular em cães normais mostram que as populações de células T aumentam progressivamente conforme a idade canina (GREELEY et al., 1996; TOMAN et al., 2002; KLEIN et al., 2014), exceto as células B que parecem diminuir sua atividade (GREELEY et al., 1996). Adicionalmente, embora a porcentagem de CD4+ possa permanecer relativamente estável em cães até um ano de idade, a população CD8+ apresenta-se mais baixo nas primeiras semanas de vida e sofre elevação constante com o progredir da idade (FALDYNA et al., 2001; TOMAN et al., 2002).

Com relação às diferentes respostas ao tratamento quimioterápico com vincristina [resposta completa (RC), resposta parcial (RP) e resistência (R)], a análise

pela citometria antes do início da quimioterapia revelou que os cães que depois apresentaram RC ao tratamento mostraram maior infiltrado intratumoral de macrófagos (RC. $48 \pm 33\%$, RP. $36 \pm 32\%$ e R $3,4 \pm 0,3\%$) ($P < 0,08$), enquanto os animais resistentes (R) apresentaram maior presença de células T CD3⁺ (RC. $26 \pm 15\%$, RP. $24,2 \pm 11,1\%$ e R. $53,6 \pm 13,5\%$) ($P < 0,2$) e de células T CD4⁺ no tumor (RC. $56 \pm 23,4\%$, RP. $59,5 \pm 13\%$ e R. $70,8 \pm 4,6$) ($P < 0,2$) (Apêndice I). Nossos achados indicam que as células T presentes no microambiente tumoral não favoreceram a regressão do tumor, ao contrário da população macrofágica que parece ter contribuído para o menor número de sessões quimioterápicas. Outro estudo reportou uma associação entre regressão e maior infiltrado de macrófagos e de linfócitos (PEREZ; DAY; MOZOS, 1998).

No entanto, as células T somente exercem atividade efetora depois de ativadas por células APCs, tais como macrófagos e células DCs. As células CDs, por exemplo, são consideradas as células mais eficientes para iniciar e manter as respostas imunes efectoras antitumorais em cães, e tendem ser geradas a partir de monócitos (BONNEFONT-REBEIX et al., 2006; YU-SHAN et al., 2007). Com efeito, no TVTC experimental já foi descrito a habilidade do tumor em induzir a apoptose de monócitos, e comprometer seriamente a função e diferenciação de CDs derivadas de monócitos, o que parece ser outro mecanismo eficaz de evasão imune (LIU et al., 2008).

Outros estudos mostram não haver diferença no desenvolvimento do tumor primário em camundongos selvagem singênicos e ratinhos nude atímicos, que não apresentam imunidade celular por células T, e sustentam que as células T não

formam a base da imunovigilância como se pensava (SHANKARAN et al., 2001). Ademais, está claro que tumores induzem à formação de células Treg, que favorecem a progressão tumoral e metástases (ZOU, 2006; FLAVELL et al., 2010; BAILEY et al., 2014).

Embora a resistência ao tratamento tenha sido encontrada tanto em animais de raça como SRD, e em ambos os sexos caninos, nossos achados em citometria de fluxo sugerem a possibilidade de cães fêmeas apresentarem resposta mais favorável à remissão completa do tumor acompanhada de tratamento com sulfato de vincristina em comparação aos cães machos, uma vez que as fêmeas mostraram evidência de maior infiltrado intratumoral de macrófagos ($P < 0,1$). Além disso, sob o ponto de vista clínico, vimos que três entre os quatro cães que apresentaram RC ao tratamento eram fêmeas (Apêndice C).

Conclusão

A quimioterapia com sulfato de vincristina se mostrou efetiva no tratamento da maioria dos casos de TVTC, sem causar recidiva, quando administrado num mínimo de três aplicações; Casos de metástases e resistência quimioterápica ocorreram apenas em tumores maiores (T3/T4), em fase de progressão e de fenótipo celular linfocitóide e misto; Cães fêmeas mostraram evidência de resposta mais favorável à remissão completa do tumor acompanhada de quimioterapia em comparação aos cães machos.

Não encontramos neste estudo uma forte evidência de regressão espontânea

no TVTC natural com base nas respostas imunes celulares do hospedeiro. Apesar das expressões de moléculas de MHC classe I e II terem sido significativamente maior na fase de regressão tumoral, não foi possível correlacionar a fase clínica do tumor com um único tipo predominante de infiltrado inflamatório intratumoral. Ainda, a fase clínica do tumor natural não mostrou ser determinante na resposta ao tratamento quimioterápico, e os subtipos citológicos do tumor não diferiram quanto às respostas imunes, indicando não haver diferença na interação tumor/hospedeiro.

Nossos dados apontam para a necessidade de mais estudos visando esclarecer eventuais mecanismos envolvidos na interação entre células do tumor e hospedeiras e a sua implicação na imunidade antitumoral, pois o sistema imune do cão parece ser requisitado pelo tumor durante os eventos biológicos associados à tumorigênese e ao escape da imunovigilância.

Referências

1. Amaral AS, Bassani-Silva S, Ferreira I, Fonseca LS, Andrade FHE, Gaspar LFJ, Rocha NS. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. *Rev Port Ciên Vet.* 2007; 103:563–564.
2. Alleman AR, Harvey JW. The morphological effects of vincristine sulfate on canine bone marrow cells. *Vet Clin Pathol.* 1993;22(2):36-41.
3. Aptekmann KP, Tinucci-Costa M, Fabeni RC, Machado RZ, Santana AE. Avaliação comparativa da hemopoiese e do perfil seroproteico de cães portadores de tumor venéreo transmissível de ocorrência natural e induzido através de transplantes alogênicos. *Vet. Not.* 2005; 11(1): 25-34.
4. Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, Paulos CM. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Front Immunol.* 2014; 5(276): 1-10.

5. Barber MR, Yang TJ. Tumor infiltrating lymphocytes: CD8+ lymphocytes in canine transmissible venereal sarcomas at different stages of tumor growth. *Anticancer Res.* 1999; 19:1137-1142.
6. Batamuzi EK, Kristensen F. Urinary tract infection: the role of canine transmissible venereal tumour. *J Small Anim Pract.* 1996; 37(6):276-279.
7. Belov K. The role of the Major Histocompatibility Complex in the spread of contagious cancers. *Mamm Genome.* 2011; 22:83–90.
8. Bjarnadóttir K, Benkhoucha M, Merkler D, Weber MS, Payne NL, Bernard CC, Molnarfi N, Lalive PH. B cell-derived transforming growth factor- β 1 expression limits the induction phase of autoimmune neuroinflammation. *Sci Rep.* 2016; 6:34594.
9. Boscos CM, Tontis, DK, Samartzi FC. Cutaneous involvement of TVT in dogs: a report of two cases. *Canine Practice,* 1999; 3:10-15.
10. Bonnefont-Rebeix C, Carvalho CM, Bernaud J, Chabanne L, Marchal T, Rigal D. CD86 molecule is a specific marker for canine monocyte-derived dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006; 109:167-176.
11. Brandão CS, Borges AG, Ranzani JT, Rahal SC, Teixeira CR, Rocha NS. Tumor venéreo transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). *Rev Ed Cont Med Vet Zootec,* 2002; 5(1): 25-31.
12. Chandler JP, Yang TJ. Canine transmissible venereal sarcoma: distribution of T and B lymphocytes in blood, draining lymph nodes and tumors at different stages of growth. *Bra J Cancer.* 1981; 44(4):514-521.
13. Chikweto A, Kumthekar S, Larkin H, Keshaw CDP, Sharma TRN, Bhaiyat MI. Genital and Extragenital Canine Transmissible Venereal Tumor in Dogs in Grenada, West Indies. *OJVM.* 2013; 3(2): 111-114.
14. Chu RM, Lin CY, Liu CC, Yang SY, Hsiao YW, Hung SW et al. Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. *Anticancer Res.* 2001;21: 4017–4024.
15. Cohen D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. *Adv Cancer Res.* 1985; 43:75-112.
16. Cohen D. The transmissible venereal tumor of the dog--a naturally occurring allograft? A review. *Isr J Med Sci.* 1978; 14(1):14-19.

17. Corradin SB, Buchmuller-Rouiller Y, Smith J, Suardet L, Mauël J. Transforming growth factor beta 1 regulation of macrophage activation depends on the triggering stimulus. *J Leukoc Biol.* 1993 Nov;54(5):423-429.
18. Das U, Das AK. Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Vet Research Communi.* 2000; 24(8): 545-556.
19. DiLillo DJ, Yanaba K, Tedder TF. B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J Immunol.* 2010; 184(7):4006-4016.
20. Drumond KO, Quessada AM, Silva SMM, Costa FAL, Silva LS, Pinho FA, Lopes RRF. Transmissible venereal tumor treated with autohemotherapy. *Acta Sci Vet.* 2013;41: 1107.
21. Duarte R, Niero R, Doretto JS, Manzan RM, Kogika MM. Eritrocitose associada a tumor venéreo transmissível em cão: relato de caso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2006; 58(6):1018-1023.
22. Duncan JR, Prasse KW. Cytology of canine cutaneous round cell tumors. Mast cell tumor, histiocytoma, lymphosarcoma and transmissible venereal tumor. *Vet Pathol.* 1979; 16(6):673-679.
23. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004; 21(2):137-148.
24. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002; 3(11):991-998.
25. Duzanski AP, Fêo HB, Montoya LM, Seullner CV, Rocha NS. Canine Transmissible Venereal Tumor: Is its biological behavior changing? *Anat Rec (Hoboken).* 2016.
26. Epstein RB, Bennett BT. Histocompatibility typing and course of canine venereal tumors transplanted into unmodified random dogs. *Cancer Res.* 1974; 34:788-793.
27. Faldyna M, Levá L, Knötigová P, Toman M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs--a flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001; 82(1-2):23-37.
28. Felton MA, Yang TJ. Role of humoral immunity in progressive and regressive and metastatic growth of the canine transmissible venereal sarcoma. *Oncology.* 1988; 45(3): 210-213.

29. Fêo HB, Flórez LMM, Rocha NS. Tumor venéreo transmissível canino: análise da casuística 2008-2014 no hospital veterinário de Botucatu. *Vet e Zootec.* 2016; 23(3): 409-418.
30. Fêo HB. Tumor venéreo transmissível canino: Expressão de genes relacionados com o comportamento biológico e microambiente tumoral. [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista; 2016.
31. Ferreira AJ, Jaggy A, Varejão AP, Ferreira ML, Correia JM, Mulas JM, Almeida O, Oliveira P, Prada J. Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. *J Small Anim Pract.* 2000; 41(4):165-168.
32. Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(8):554-567.
33. Flórez MM, Fêo HB, Silva GN, Yamatogi RS, Aguiar AJ, Araújo JP Jr, Rocha NS. Cell cycle kinetics, apoptosis rates and gene expressions of MDR-1, TP53, BCL-2 and BAX in transmissible venereal tumor cells and their association with therapy response. *Vet Comp Oncol.* 2016a.
34. Flórez LMM, Ballesterio HF, Duzanski AP, Paulo R.O. Bersano PRO, Lima JF, Cruz FL, Mota LS, Rocha NS. Immunocytochemical characterization of primary cell culture in canine transmissible venereal tumor. *Pesq. Vet. Bras.* 2016b; 36(9):844-850.
35. Fremd C, Schuetz F, Sohn C, Beckhove P, Domschke C. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology.* 2013; 2(7):e25443.
36. Ganguly B, Das U, Das K. Canine transmissible venereal tumour: a review. *Vet Comp Onc* 2013; 11(4):1-12.
37. Gajewski TF, Meng Y, Blank C, Brown I, Kacha A, Kline J, Harlin H. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol Rev.* 2006; 213:131-145.
38. Gerardi DG, Tinucci-Costa M, Silveira ACT, Moro JV. Expression of P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein, glutathione-S-transferase pi and p53 in canine transmissible venereal tumor. *Pesq. Vet. Bras.* 2014; 34(1):71-78.

39. Gray D, Gray M, Barr T. Innate responses of B cells. *Eur J Immunol* 2007; 37(12):3304-3310.
40. Greeley EH, Kealy RD, Ballam JM, Lawler DF, Segre M. The influence of age on the canine immune system. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996; 55(1-3):1-10.
41. Hantrakul S, Klangkaew N, Kunakornsawat S et al. Clinical pharmacokinetics and effects of vincristine sulfate in dogs with transmissible venereal tumor (TVT). *J Vet Med Sci* 2014;76:1549-1553.
42. Hill DL, Yang TJ, Wachtel A. Canine Transmissible Venereal Sarcoma: Tumor Cell and Infiltrating Leukocyte Ultrastructure at Different Growth Stages. *Vet Pathol.* 1984; 21(1):39-45.
43. Hsiao YW, Liao KW, Chung TF, Liu CH, Hsu CD, Chu RM. 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.* 2008; 57:1091–1104.
44. Hsiao YW, Liao KW, Hung SW, Chu RM. Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF- β 1 and restores the lymphokine-activated killing activity. *J Immunol.* 2004; 172(3):1508–1514.
45. Hsiao YW, Liao KW, Hung SW, Chu RM. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002; 87(1-2):19–27.
46. Hon H, Oran A, Brocker T, Jacob J. B lymphocytes participate in cross-presentation of antigen following gene gun vaccination. *J Immunol.* 2005; 174(9):5233-5242.
47. Kaklamanis L, Townsend A, Doussis-Anagnostopoulou IA, Mortensen N, Harris AL, Gatter KC. Loss of major histocompatibility complex-encoded transporter associated with antigen presentation (TAP) in colorectal cancer. *Am J Pathol.* 1994; 145(3):505-509.
48. Kanda N, Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:282-288.
49. Klein RP, Lourenço MLG, Moutinho FQ, Takahira RQ, Lopes RS, Martins RR, Machado LP, Silveira VF, Ferreira H. Imunidade celular em caninos neonatos – do nascimento ao 45º dia de idade. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2014; 66(3):745-756.

50. Kumru S, Godekmerdan A, Yilmaz B. Immune effects of surgical menopause and estrogen replacement therapy in peri-menopausal women. *J Reprod Immunol.* 2004; 63(1):31-38.
51. Lanzavecchia A, Bove S. Specific B lymphocytes efficiently pick up, process and present antigen to T cells. *Behring Inst Mitt.* 1985; (77):82-87.
52. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008;112(5):1570-1580.
53. Liao K, Hung S, Hsiao Y, Bennett M, Chu R. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 92(3-4):149-62.
54. Lima CRO, Rabelo RE, Vulcani VAS, Furtado AP, Helrigel PA, Brito LAB, Moura VMB. Morphological patterns and malignancy criteria of transmissible venereal tumor in cytopathological and histopathological exams. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2013; 50(3): 238-246.
55. Liu CC, Wang YS, Lin CY, Chuang TF, Liao KW, Chi KH, Chen MF, Chiang HC, Chu RM. Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an in vivo canine model of transmissible venereal tumor. *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57(4):479-491
56. Martins BC, Martins GC, Horta RS et al. Sensory-Motor Neuropathy Due to Vincristine Treatment in a Dog. *Acta Sci Vet* 2014; 42:59.
57. Medeiros SF, Medeiros MMWY, Oliveira VN. Climacteric complaints among very low-income women from a tropical region of Brazil. *São Paulo Med J.* 2006;124(4):214-218.
58. Meinkoth JH, Cowell RL. Recognition of basic cell types and criteria of malignancy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2002; 32(6):1209-1235.
59. Mizuno S, Fujinaga T, Hagio M. Role of lymphocytes in spontaneous regression of experimentally transplanted canine transmissible venereal sarcoma. *J Vet Med Sci.* 1994; 56(1):15-20.
60. 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.* 2006; 30(6):613-621.

61. Mukaratirwa S, Gruys E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *The Veterinary Quarterly*.2003; 25(3): 101-111, 2003.
62. Olgivie GK. Chemotherapy. In: Withrow JS, MacEWEN EG. *Small Animal Clinical Oncology*, Philadelphia, W.B. Saunders, p.70, 1996.
63. O'Sullivan C, Lewis CE. Tumor-associated leucocytes: Friends or foes in breast cancer carcinoma. *J Pathol*. 1994; 172(3):229-235.
64. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29(8):1093-1102.
65. Paranzini CS, Sant'anna MC, Di Santis GW, Martins MIM. Prevalence of different cytomorphological types of transmissible venereal tumours and the association with prognosis in dogs treated with vincristine sulphate – Retrospective study. *Semina: Ciênc Agr*. 2015; 36:3795-3800.
66. Perez J, Day MJ, Mozos E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 64:133–147.
67. Powers RD. Immunologic properties of canine transmissible venereal sarcoma. *Am J Vet Res*. 1968; 29(8): 1637-1645.
68. Quadri SA, Singal DP. Peptide transport in human lymphoblastoid and tumor cells: effect of transporter associated with antigen presentation (TAP) polymorphism. *Immunol Lett*. 1998; 61(1):25-31.
69. Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H. Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med*. 2004; 200(9):1123-1134.
70. Rocha NS, Tremori TM, Carneiro JAM. Fine Needle Aspiration Cytology in the Diagnosis of Canine Cutaneous Transmissible Venereal Tumor— Case Report. *OJVM*. 2014; 4: 204-209.
71. Rogers KS. Transmissible veneral tumor. *Comp Cont Educ Pratic Vet*. 1997; 19(9):1036-1045.
72. Ron Y, De Baetselier P, Tzehoval E, Gordon J, Feldman M, Segal S. Defective induction of antigen-reactive proliferating T cells in B cell-deprived mice. II. Anti-mu treatment affects the initiation and recruitment of T cells. *Eur J Immunol*. 1983; 13(2):167-171.

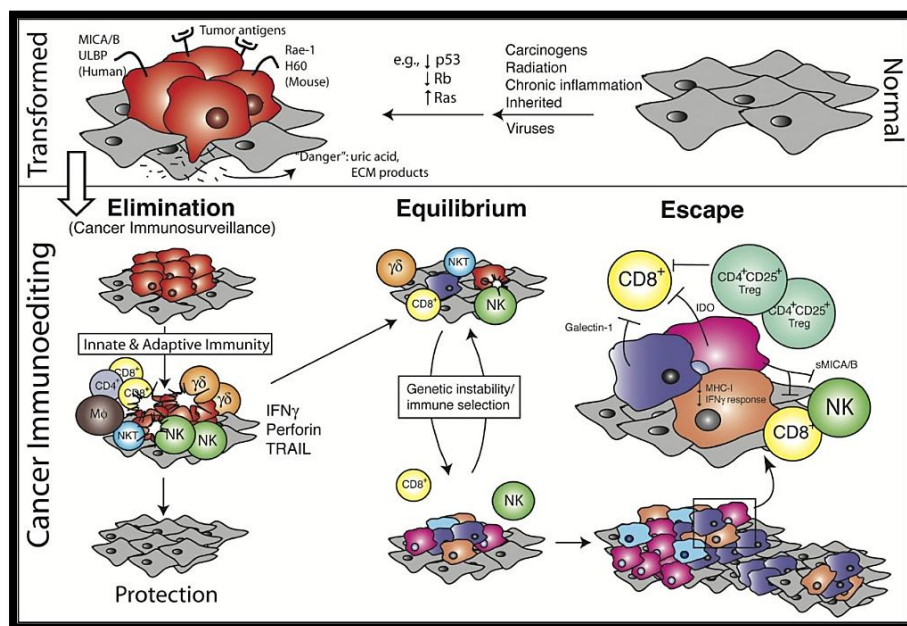
73. Sangster C. Ovarian remnant syndrome in a 5-year-old bitch. *Can Vet J*. 2005; 46(1): 62–64.
74. Santos IFC, Cardoso JMM, Oliveira KC. Metástases cutâneas de tumor venéreo transmissível canino – Relato de caso. *Medvep*. 2011; 9(31):639-645.
75. Santos FGA, Vasconcelos AC, Nunes JES, Cassali GD, Paixão TA, Martins AS; Silva SS. Apoptosis in the transplanted canine transmissible venereal tumor during growth and regression phases. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2008; 60(3):607-612.
76. Saratsis P, Ypsilantis P, Tselkas K. Semen quality during vincristine treatment in dogs with transmissible venereal tumor. *Theriogenology*. 2000; 53(5):1185-1192.
77. Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, Daley J, Delgado JC, Gribben JG, Nadler LM. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest*. 1997; 100(11):2757-2765.
78. Sengupta N, MacFie TS, MacDonald TT, Pennington D, Silver AR. Cancer immunoediting and "spontaneous" tumor regression. *Pathol Res Pract*. 2010; 206(1):1-8.
79. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107-1111.
80. Siddle HV, Kaufman J. Immunology of naturally transmissible tumours. *Immunology*. 2015;144(1):11-20
81. Simermann NFS. Sulfato de vincristina no tratamento do tumor venéreo transmissível frente à caracterização citomorfológica. [Dissertação]. Goiânia: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás; 2009.
82. Stockmann D, Ferrari HF, Andrade AL, Lopes RA, Cardoso TC, Luvizotto MCR. Canine transmissible venereal tumours: aspects related to programmed cell death. *BJVP*. 2011; 4:67-75.
83. Strakova A, Murchison EP. The cancer which survived: insights from the genome of an 11000 year-old cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2015; 30:49-55.

84. Strakova A, Murchison EP. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. *BMC Vet Res.* 2014; 10:168.
85. Sun Q, Pollok KE, Burton RL, Dai LJ, Britt W, Emanuel DJ, Lucas KG. Simultaneous ex vivo expansion of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes using B-lymphoblastoid cell lines expressing cytomegalovirus pp65. *Blood.* 1999; 94(9):3242-3250.
86. Toman M, Faldyna M, Knotigova P, Pokorova D, Sinkora J.. Postnatal development of leukocyte subset composition and activity in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 87: 321-326.
87. Trail PA, Yang TJ. Canine transmissible venereal sarcoma: quantitation of T-lymphocyte subpopulations during progressive growth and spontaneous tumor regression. *J Natl Cancer Inst.* 1985; 74(2):461-467.
88. Trompieri-silveira AC, Mouro DGJV, Costa MT, Alessi AC. Immunohistochemical expression of B and T lymphocytes and TGF- β in experimentally transplanted canine venereal tumor. *Ciência Rural.* 2009; 39(4):1148-1154.
89. Varughese EE, Singla VK, Ratnakaran U, Gandotra VK. Successful management of metastatic transmissible venereal tumour to skin of mammary region. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47(6):366-369.
90. Vermooten MI. Canine transmissible venereal tumor (TVT): a review. *J S Afr Vet Assoc.* 1987; 58(3):147-50.
91. Wei S, Kryczek I, Zou L, Daniel B, Cheng P, Mottram P, Curiel T, Lange A, Zou W. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2005; 65(12): 5020-5026.
92. Yang TJ, Jones JB. Canine Transmissible Venereal Sarcoma: Transplantation Studies in Neonatal and Adult Dogs. *J Nat Cancer Inst.* 1973; 51(6): 1915-1918.
93. Yu-Shan Wang, Kwan-Hwa Chi, Kuang-Wen Liao, Cheng-Chi Liu, Chiao-Lei Cheng, Yi-Chun Lin, Chiung-Hsiang Cheng, Rea-Min Chu. Characterization of canine monocyte-derived dendritic cells with phenotypic and functional differentiation. *Can J Vet Res.* 2007; 71(3): 165–174.
94. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology.* 2006(6): 295-305.

Anexos

ANEXO - A

Figura 1 - Fases do processo de edição imunológica do câncer.

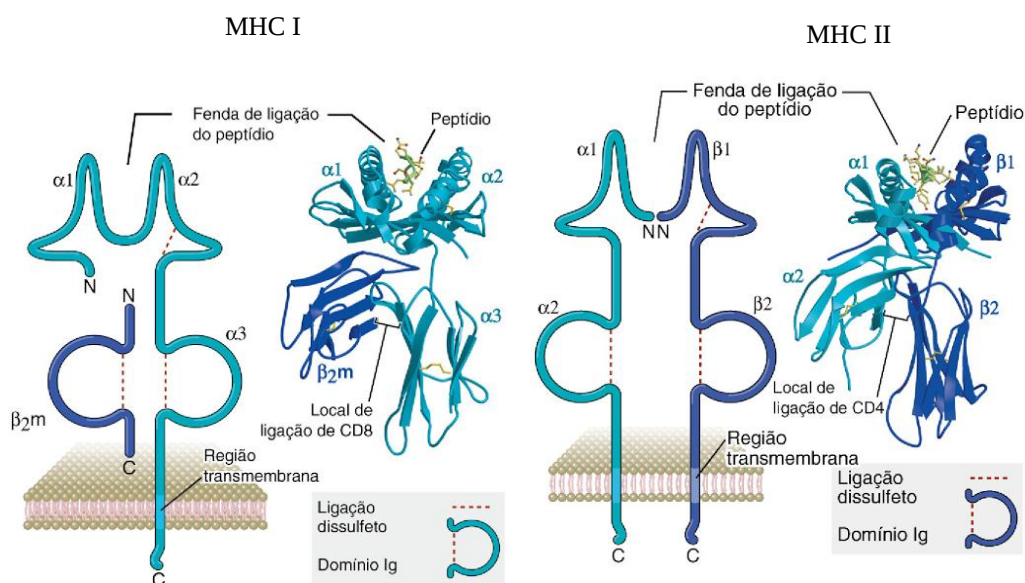


Fonte: Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21(2):137-148.

- As células normais (cinzas) sujeitas a estímulos oncogênicos acabam sofrendo transformações e se tornam células tumorais (vermelhas). Mesmo nos estágios iniciais da tumorigênese, essas células podem expressar marcadores tumorais específicos e gerar sinais pró-inflamatórios de perigo que iniciam o processo de imunoedição de câncer. Na primeira fase de eliminação, as células e moléculas de imunidade inata e adaptativa, podem erradicar o tumor em desenvolvimento e proteger o hospedeiro contra a formação tumoral. No entanto, se este processo não for bem sucedido, as células tumorais podem entrar na fase de equilíbrio onde são mantidas cronicamente ou são esculpidas por editores imunes para produzir novas populações de variantes tumorais. Estas variantes podem evadir o sistema imune e se tornar clinicamente indetectáveis na fase de escape.

ANEXO B

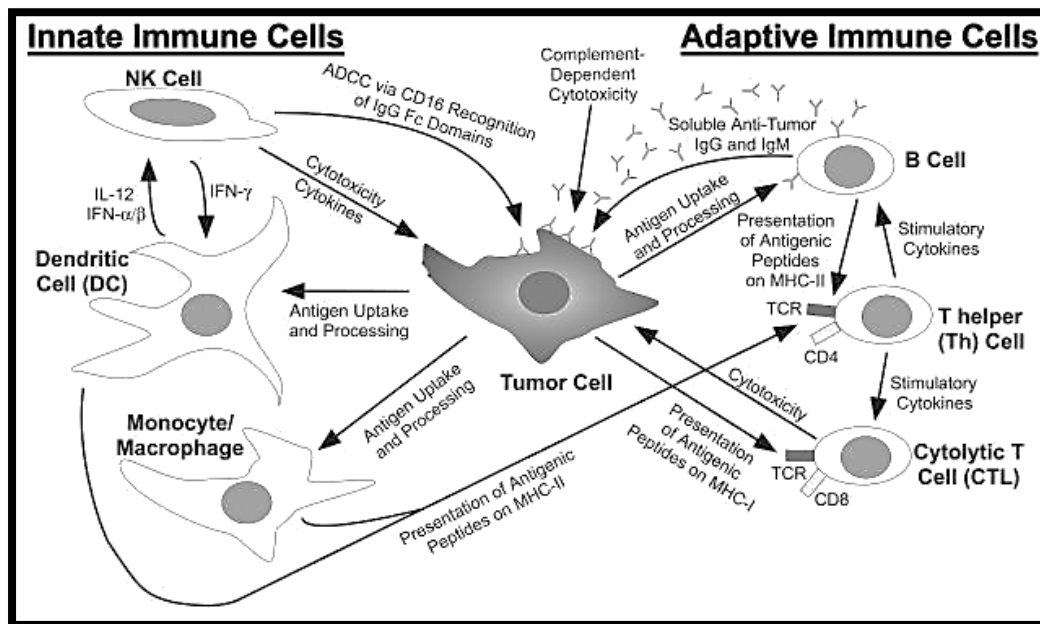
Figura 2 - Estrutura da molécula de complexo de histocompatibilidade maior (MHC) de classe I e II.



Fonte: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. p.389.

ANEXO - C

Figura 3 - Principais células do sistema imune inato e adaptativo e suas funções em resposta a uma célula tumoral.



Fonte: Borghaei H, Smith MR, Campbell KS. Immunotherapy of câncer. Eur J Pharmacol. 2009; 625(1-3): 41–54.

- Muitos tipos de células imunológicas influenciam o crescimento tumoral. O sistema imunológico é composto por células inatas que medeiam respostas imediatas de curta duração [monócitos, macrófagos, células dendríticas e células assassinas naturais (NK)], e células adaptativas que desenvolvem respostas de longa duração e memória (células T e células B). As setas descrevem os impactos das células imunes uma sobre a outra ou sobre o tumor.

ANEXO D



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO 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 **"Interação entre hospedeiro e tumor venéreo transmissível canino: diversidade de células mononucleares e do complexo principal de histocompatibilidade**, Protocolo nº 126/2015 - CEUA, da Professora Noeme Sousa Rocha, a ser conduzido por **Anderson do Prado Duzanski**, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 02 de outubro de 2015.

Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

DECLARAÇÃO

Declaro que estou ciente da necessidade da assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” pelo proprietário, antes do início da realização de qualquer procedimento experimental. O mesmo permanecerá em meu poder e ficará à disposição da Comissão de Ética no Uso de Animais, a qualquer momento.

NOME DO DOCENTE RESPONSÁVEL:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do procedimento de anestesia geral, coleta de sangue, e biopsia incisional, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado ***Interação entre hospedeiro e Tumor Venéreo Transmissível Canino: diversidade de células mononucleares e do complexo principal de histocompatibilidade***, de responsabilidade de Noeme Sousa Rocha e Anderson do Prado Duzanski.

Nome do animal ou Número de animais de produção: _____

NOME DO
RESPONSÁVEL: _____

RG: _____ Data: ____/ ____/ ____

Assinatura: _____

ANEXO E

Quadro 1 - Protocolo semiológico e terapêutico aplicado aos cães com TVTC.

Nome do proprietário:			
Endereço:		Ficha:	
Telefone:			
Resenha			
Nome:	Sexo:	Raça:	Idade: Peso:
Histórico do paciente		Observações	
Aceso à rua? Sim () Não ()			
Teve contato com outros cães? Sim () Não ()			
Castrado (a)? Sim () Não ()			
Emagrecimento progressivo? Sim () Não ()			
Tratamento prévio? Sim () Não ()			
Descrição da massa			
Massa hemorrágica? Sim () Não ()			
Massa friável? Sim () Não ()			
Crescimento: Lento () Rápido () Estável ()			
Tempo de crescimento: < 3 semanas ()			
Entre 3 a 8 semanas () > de 8 semanas ()			
Localização da massa:			
Massa única: Sim () Não ()			
Tamanho do tumor em centímetros:			
Avaliação de linfonodos locais:			
Aplicar estadiamento TNM**			

**ESTADIAMENTO CLÍNICO (TNM) APLICADO EM TVTC

Tumor primário		Nódulo linfático	Linfonodo regional	Metástases à distância	
T1	< 2 cm	N0	Ausência de metástases	M0	Ausência de metástases à distância
T2	Entre 2 a 5 cm	N1	Metástase em linfonodo regional		
T3	> 5 cm	N2	Metástase em linfonodos distantes	M1	Metástases
T4	Invasão local				

MASSAS ADICIONAIS

Descrição	Observações:
Massa única? Sim () Não ()	
Ordem de aparecimento:	
Crescimento: Lento () Rápido () Estável ()	
Tempo de crescimento: < 3 semanas () Entre 3 a 8 semanas () > de 8 semanas ()	
Massa hemorrágica? Sim () Não ()	
Massa friável? Sim () Não ()	
Localização da massa:	
Tamanho da massa em centímetros:	
Avaliação dos linfonodos:	

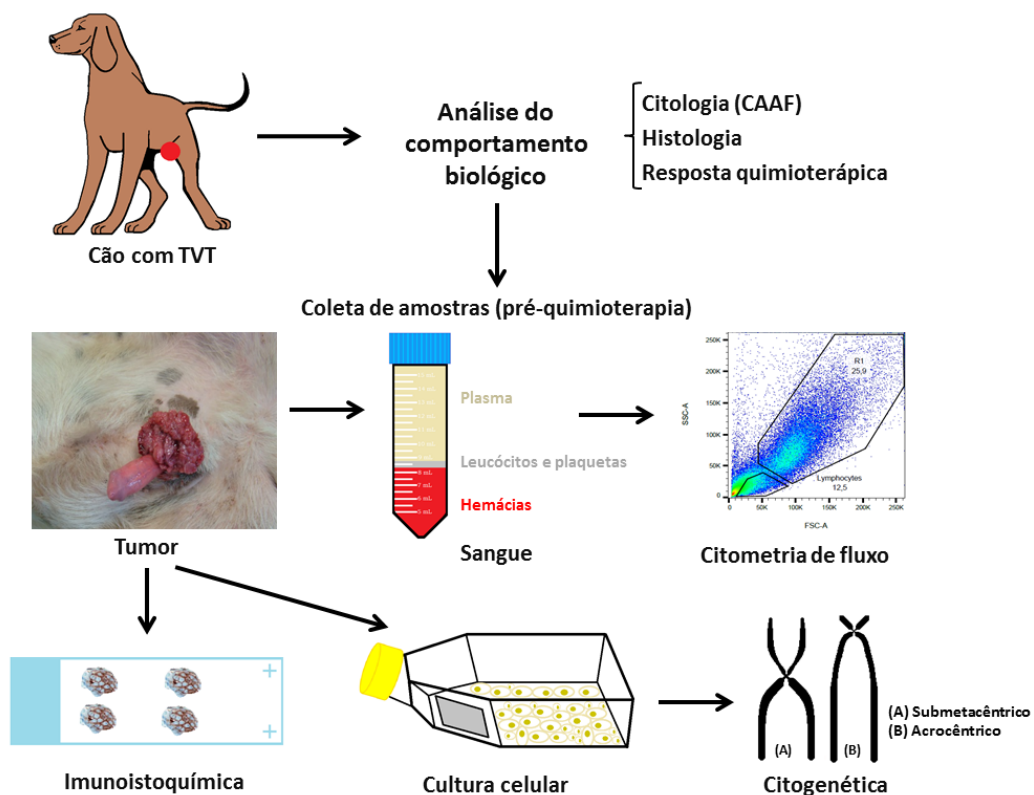
TERAPIA ANTI-NEOPLÁSICA E EVOLUÇÃO CLÍNICA DO TUMOR

Tratamento utilizado: Sulfato de vincristina	Dose: 0,75mg/m²							
Semana	1	2	3	4	5	6	7	8
Tamanho do tumor (cm)								
Avaliação dos linfonodos locais								

Apêndices

APÊNDICE A

Figura 4 - Organograma da metodologia esquematizando amostras coletadas para análises dos 22 cães com TVTC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE B

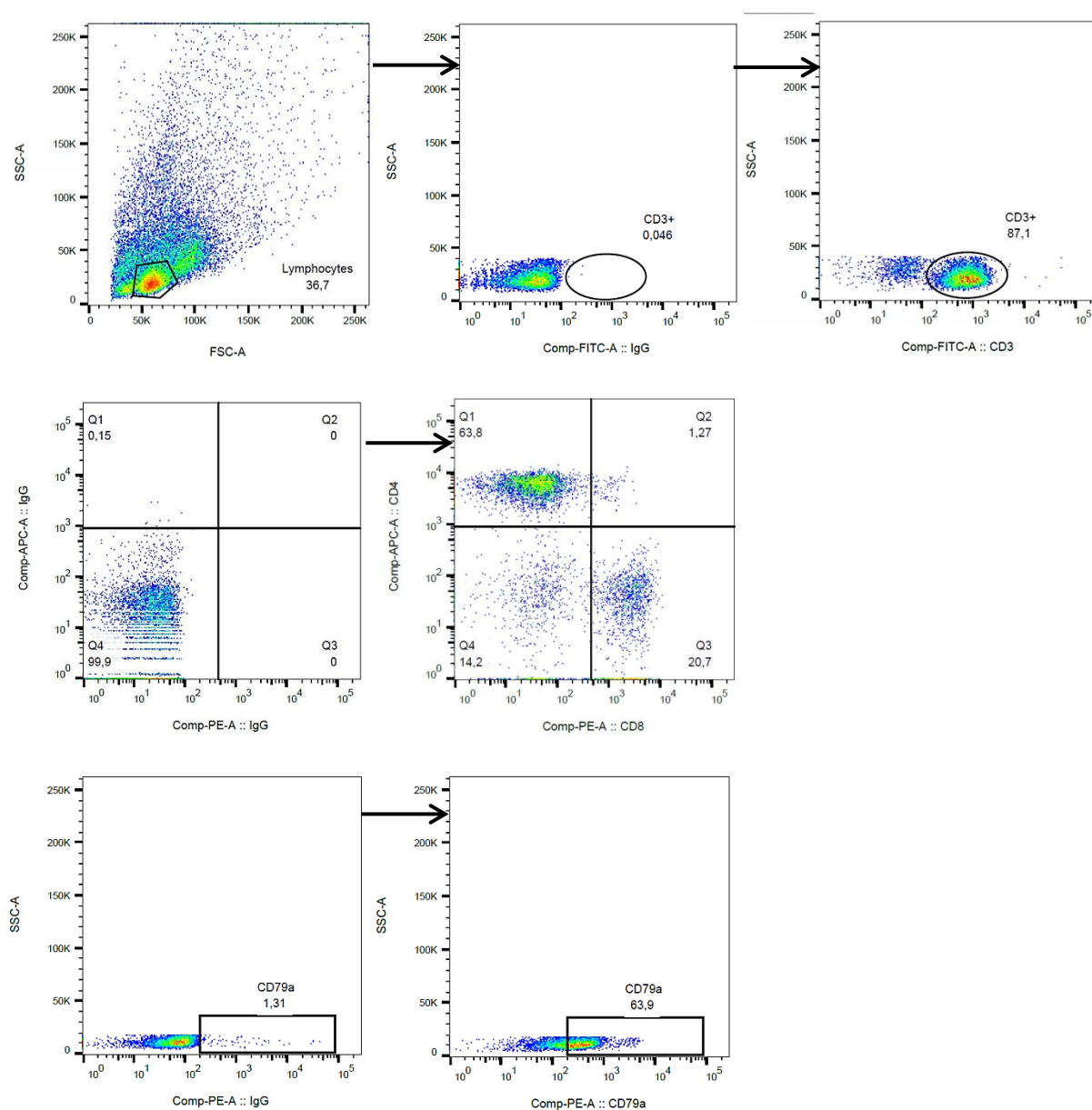
Tabela 1 - Painel de imunomarcação de moléculas de MHC classe I e II no tumor.

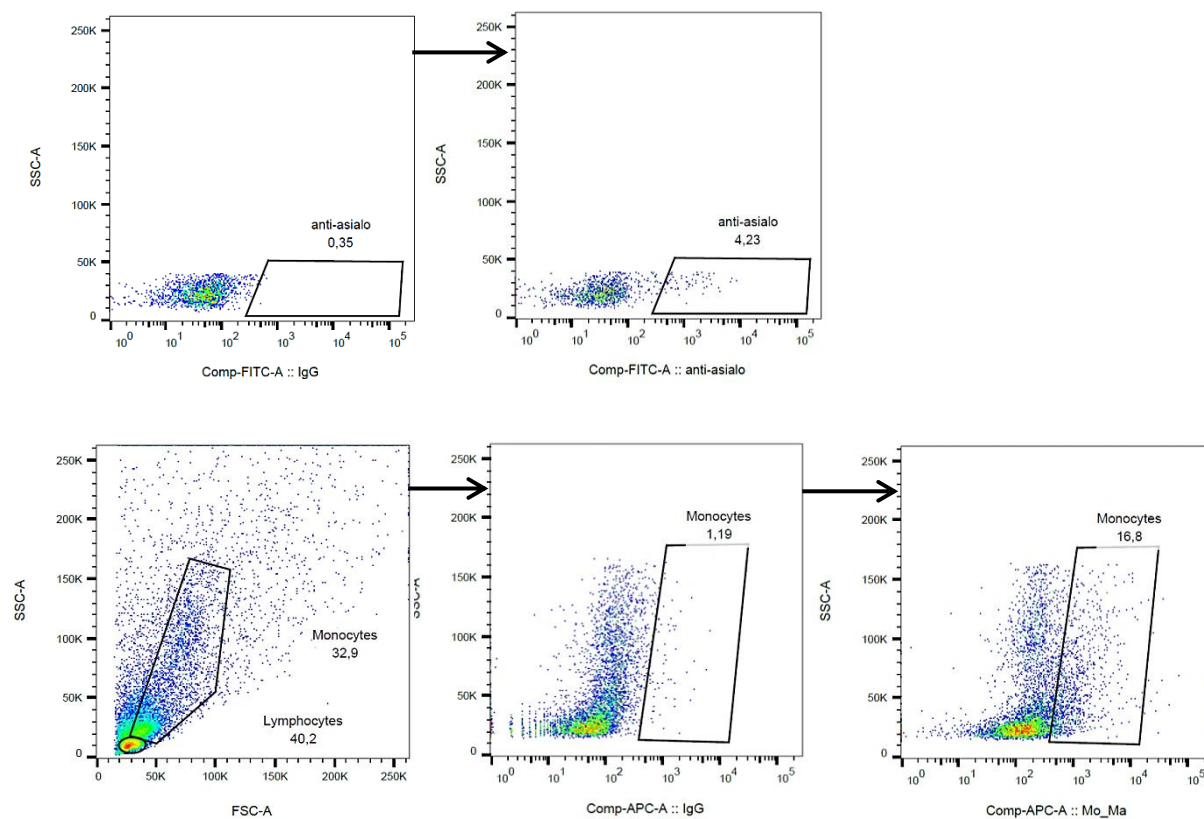
Anticorpo	Clone	Tipo	Diluição	Fabricante
Anti – MHC I	DG-H58A	Monoclonal	1:100	Washington University
Anti – MHC II	DG-TH14B	Policlonal	1:200	Washington University

Tabela 2 - Painel de imunomarcação de células mononucleares do sangue e do tumor.

Anticorpo	Clone	Tipo	Diluição	Fluoróforo	Fabricante
Anti-CD3+	CA17.2A12	Monoclonal	1:30	FITC	AbD Serotec
Isotipo IgG1			1:30	FITC	AbD Serotec
Anti-CD4+	YKIX302.9	Monoclonal	1:60	Alexa Fluor 647	AbD Serotec
Isotipo IgG2a			1:60	Alexa Fluor 647	AbD Serotec
Anti-CD8+	YCATE55.9	Monoclonal	1:15	RPE	AbD Serotec
Isotipo IgG1			1:15	RPE	AbD Serotec
Anti-Asialo GM1			1:30		Affymetrix
F Anti-Rabitt IgG		Policlonal	1:30	FITC	Affymetrix
Anti-CD79 α	HM57	Monoclonal	1:15	RPE	AbD Serotec
Isotipo IgG1			1:15	RPE	AbD Serotec
Anti-Macrófago	MAC387	Monoclonal	1:10	APC	AbD Serotec
Isotipo IgG1			1:10	APC	AbD Serotec

Figura 5 - Gráficos mostrando estratégia de análise por citometria de fluxo das células T (CD3+ CD4+ CD8+), células B (CD79), células NK (asialo GM1) e macrófagos (MAC 387) em amostras de sangue e de tumor dos cães com TVTC. Os *Gates* foram determinados com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) da população em estudo. Os valores foram expressos em porcentagem de células positivas para os marcadores em questão. Q1 representa (Positivo CD4+), Q2 (Duplo Positivo CD4+ e CD8+), Q3 (Positivo CD8+) e Q4 (Duplo negativo CD4+ e CD8+).





APÊNDICE C

Tabela 3 – Características clínicas e demográficas dos 22 cães com TVTC genital.

SEXO	(n)	(%)
Macho	12	55
Fêmea	10	45
IDADE	(n)	(%)
Jovem (<2anos)	7	32
Adulto (2-7anos)	12	55
Idoso (>7anos)	3	13
RAÇA	(n)	(%)
Sem raça definida	19	86
Raça	3	14
TAMANHO DO TUMOR	(n)	(%)
T1 (<2cm)	1	5
T2 (2-5cm)	10	45
T3 (>5cm)	7	32
T4 (invasivo)	4	18
METÁSTASE	(n)	(%)
Sim	2	9
Não	20	91
SUBTIPO DO TUMOR	(n)	(%)
Linfocitóide	8	36
Plasmocitóide	7	32
Misto	7	32
FASE CLÍNICA	(n)	(%)
Progressão	19	86
Regressão	3	14

Tabela 4 – Distribuição e dados clínicos descritivos dos 22 cães com TVTC genital.

Caso	Sexo	Idade Anos	Raça	Castração	Massa Primária	Tamanho Massa Primária	Metástase	Linfonodo
1	Fêmea	< 2	SRD	Não	Vagina	T1	M0	N0
2	Macho	5	SRD	Não	Pênis	T2	M0	N0
3	Fêmea	< 2	Border Collie	Não	Vagina	T3	M0	N0
4	Fêmea	3	SRD	Não	Vagina	T3	M0	N0
5	Macho	3	SRD	Não	Pênis	T2	M0	N0
6	Fêmea	4	SRD	Não	Vulva	T2	M0	N0
7	Macho	5	SRD	Não	Pênis	T3	M0	N0
8	Macho	4	SRD	Não	Pênis	T2	M0	N0
9	Macho	6	SRD	Não	Pênis	T3	M0	N0
10	Macho	10	SRD	Não	Pênis	T4	M0	N0
11	Macho	3	SRD	Não	Pênis	T3	M0	N1
12	Fêmea	4	SRD	Sim	Vagina	T2	M0	N0
13	Macho	Adulto	SRD	Não	Pênis	T4	M0	N0
14	Macho	< 2	SRD	Não	Pênis	T3	M0	N0
15	Macho	< 2	SRD	Não	Pênis	T3	M0	N0
16	Macho	13	SRD	Não	Pênis	T4	M0	N0
17	Fêmea	5	Blue Heller	Não	Vagina	T4	M1	N0
18	Macho	8	SRD	Não	Pênis	T2	M0	N0
19	Fêmea	7	Pinscher	Não	Vagina	T2	M0	N0
20	Fêmea	< 2	SRD	Não	Vagina	T2	M0	N0
21	Fêmea	<2	SRD	Não	Vagina	T2	M0	N0
22	Fêmea	<2	SRD	Não	Vagina	T2	M0	N0

SRD= Sem raça definida. T1< 2cm, T2 entre 2-5cm, T3> 5cm, T4 Invasão local. N0 Ausência de metástases em linfonodo, N1 Metástase em linfonodo regional, N2 Metástase em linfonodos distantes. M0 Ausência de metástases à distância, M1 Metástases.

Tabela 5 – Distribuição e dados descritivos referentes ao subtipo citológico, fase evolutiva e reposta à quimioterapia dos 22 cães com TVTC genital.

Caso	Classificação Citomorfológica	Fase Clínica	Quimioterapia	Toxicidade Quimioterápica	Cultura
1	Misto	Progressão	#	Ausente	*
2	Misto	Progressão	RP	Hematológica	*
3	Misto	Progressão	RP	Hematológica/ Dermatológica	*
4	Plasmocitóide	Regressão inicial	RC	Ausente	*
5	Plasmocitóide	Progressão	#	Ausente	*
6	Plasmocitóide	Progressão	#	Ausente	*
7	Plasmocitóide	Progressão	RP	Hematológica	*
8	Plasmocitóide	Progressão	RC	Ausente	*
9	Linfocitóide	Regressão final	RP	Hematológica	*
10	Misto	Progressão	RP	Hematológica	*
11	Linfocitóide	Progressão	#	Ausente	*
12	Linfocitóide	Progressão	RC	Hematológica/ Dermatológica	*
13	Linfocitóide	Progressão	R	Hematológica	*
14	Linfocitóide	Progressão	RP	Hematológica	*
15	Misto	Progressão	RP	Hematológica	*
16	Linfocitóide	Progressão	#	Ausente	*
17	Misto	Progressão	R	Hematológica	*
18	Plasmocitóide	Regressão inicial	RP	Hematológica	*
19	Misto	Progressão	RC	Hematológica/ Gastrointestinal	*
20	Linfocitóide	Progressão	RP	Hematológica	*
21	Linfocitóide	Progressão	RP	Hematológica/ Gastrointestinal	*
22	Plasmocitóide	Progressão	RP	Hematológica	*

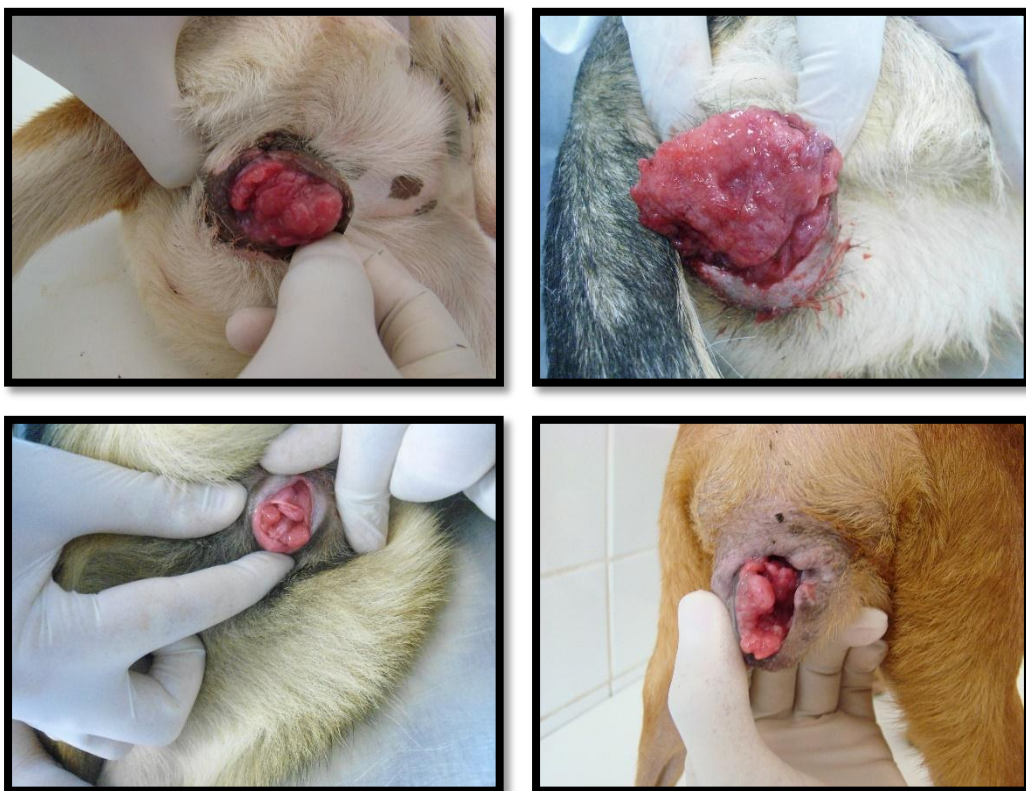
#= não tratou, R= Resistente, RC= Resposta Completa, RP= Resposta Parcial * Culturas isoladas de TVTC.

Tabela 6 - Média desvio padrão, amplitude de variação dos valores do hemograma de 22 cães com TVTC natural antes do início do tratamento quimioterápico.

Parâmetros avaliados	Média	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Valores de referência
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,09	1,787	2,74	8,7	5,5 a 8,5
Hemoglobina (g/dL)	12,58	4,082	5,6	17,8	12 a 18
Hematócrito (%)	38,66	10,221	18	54	37 a 55
VCM (fL)	64,43	5,925	51,6	78,5	60 a 77
CHCM (%)	33,47	2,518	26,5	37,2	32 a 36
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	16,78	7,761	5,7	31,5	6 a 17
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	12,99	6,801	2,5	25,2	3 a 11,5
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,62	0,811	0,2	2,8	1 a 4,8
Eosinófilos ($/\mu\text{L}$)	1065	1242,779	0	5,500	100 a 1250
Basófilos ($/\mu\text{L}$)	0	-	-	-	Raro
Monócitos ($/\mu\text{L}$)	1042,85	706,095	0	2,700	150-1350
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	212	78,827	28	389	200-500
Proteínas totais (g/dL)	8,08	1,387	6,2	11,8	6-8

APÊNDICE D

Figura 6 - Apresentação clínica do tumor venéreo transmissível canino em cão fêmea. Massas protuberantes, multilobulares, necro-hemorrágicas aderidas em mucosa vaginal.



Fonte: Elaborado pelo autor. Hospital Veterinário – FMVZ.

Figura 7 - Apresentação clínica do tumor venéreo transmissível canino em cão macho. Massas vegetantes, multilobulares, necro-hemorrágicas em pênis.



Fonte: Elaborado pelo autor. Hospital Veterinário – FMVZ.

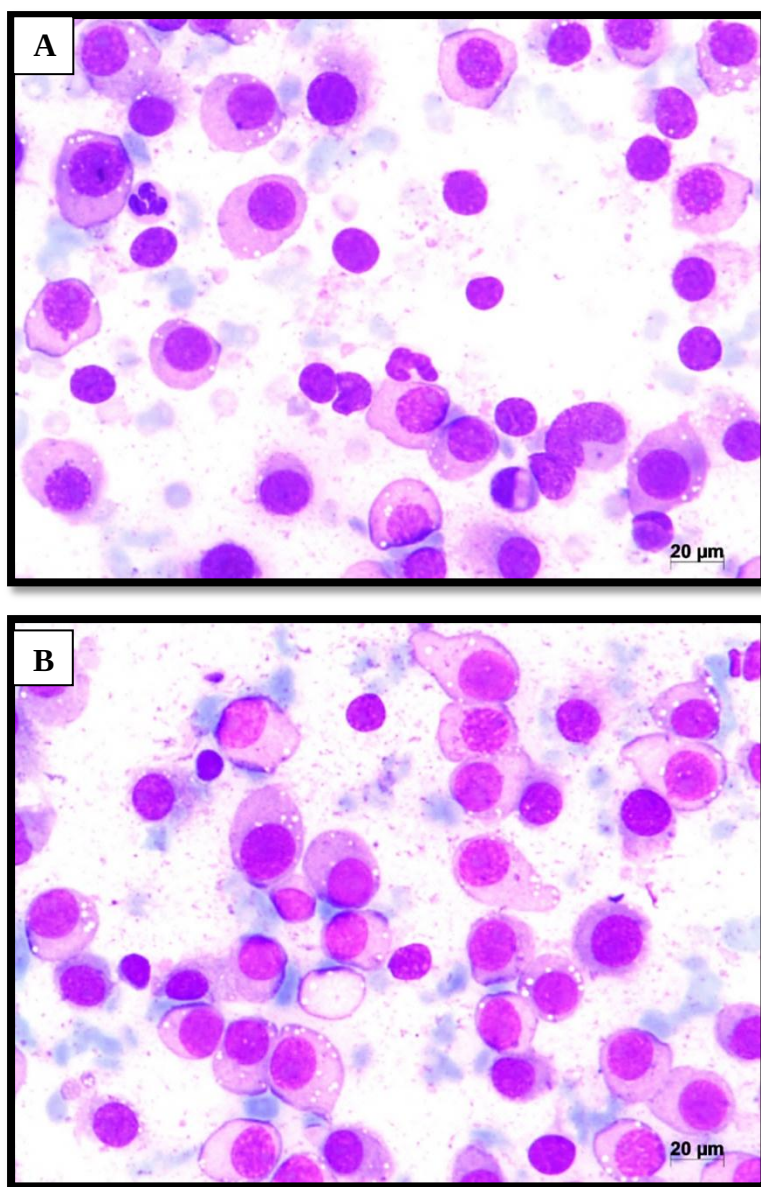
Figura 8 - Imagem ultrassonográfica demonstrando o parênquima esplênico alterado, com presença de estrutura heterogênea predominantemente ecogênica com áreas cavitárias em permeio, medindo aproximadamente 5,2 x 7,4cm, causando deslocando cápsula e alteração do contorno normal do órgão. Ao exame de Doppler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



Fonte: Elaborado pelo autor. Hospital Veterinário – FMVZ.

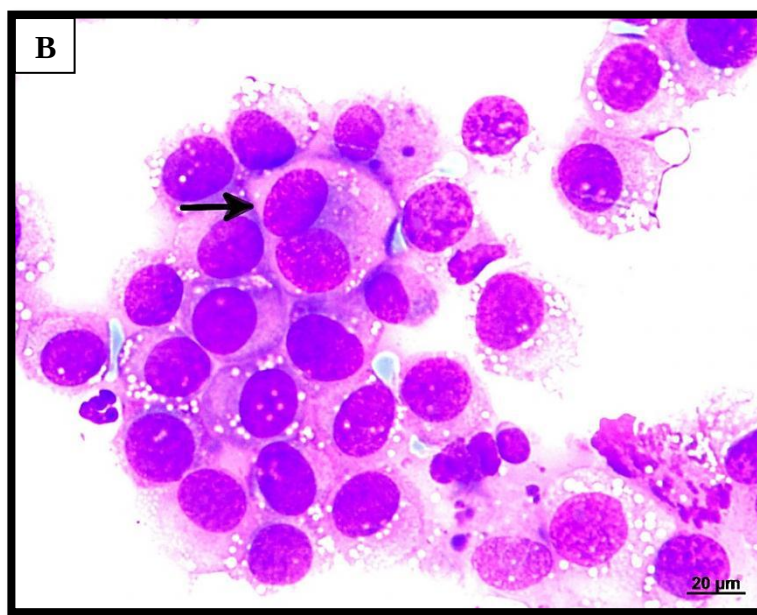
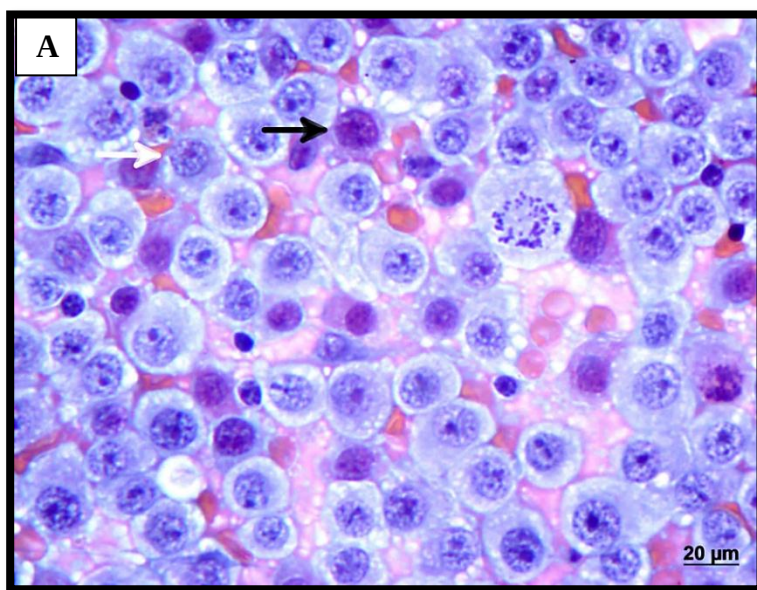
APÊNDICE E

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



Fonte: Elaborado pelo autor.

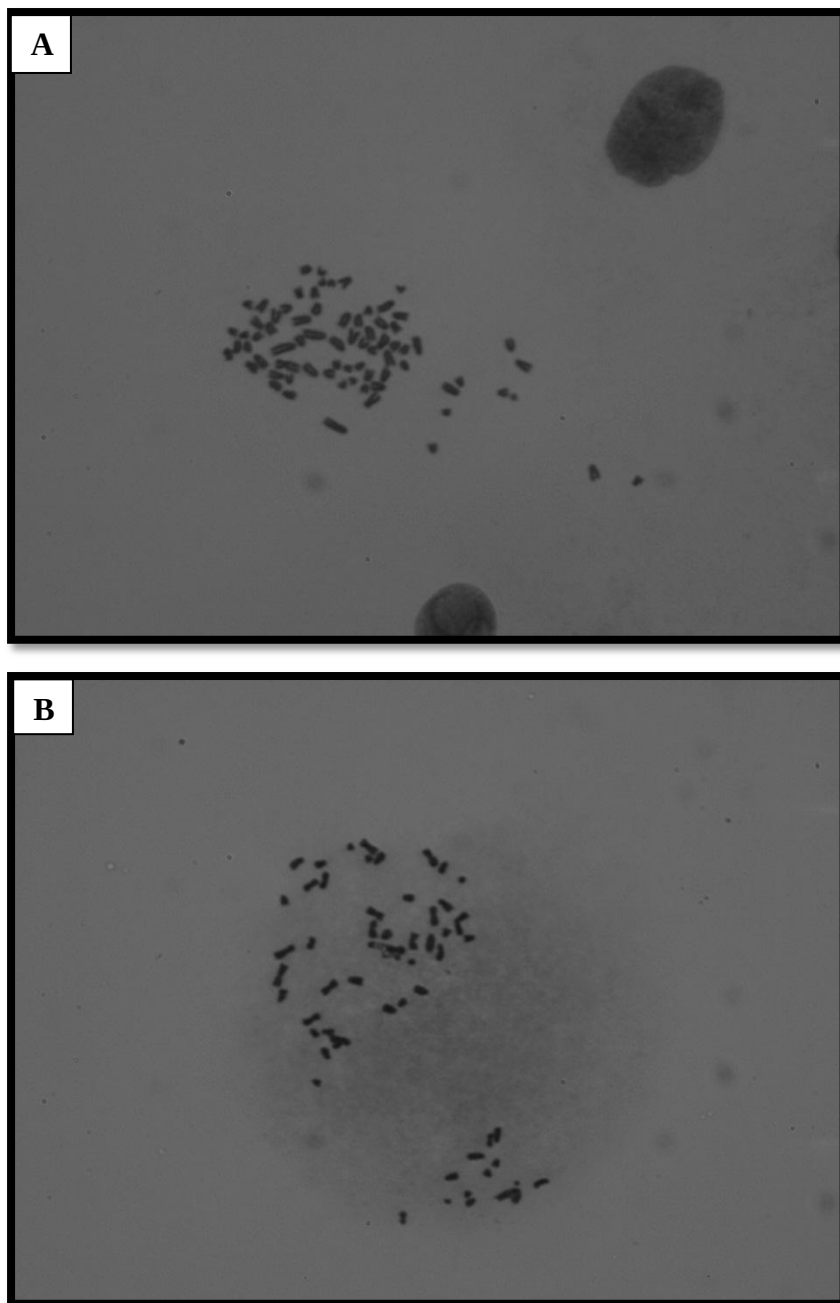
Figura 10 - Tumor venéreo transmissível canino. Expressão de critérios de malignidade. (A) Notar oncócitos maduro (seta preta) e imaturo (seta branca); células em raquete; célula fantasma; mitose; padrão grosseiro da cromatina; ranhura nuclear e nucléolo angular. Coloração pelo Papanicolau, 600x. (B)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



Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNCICE F

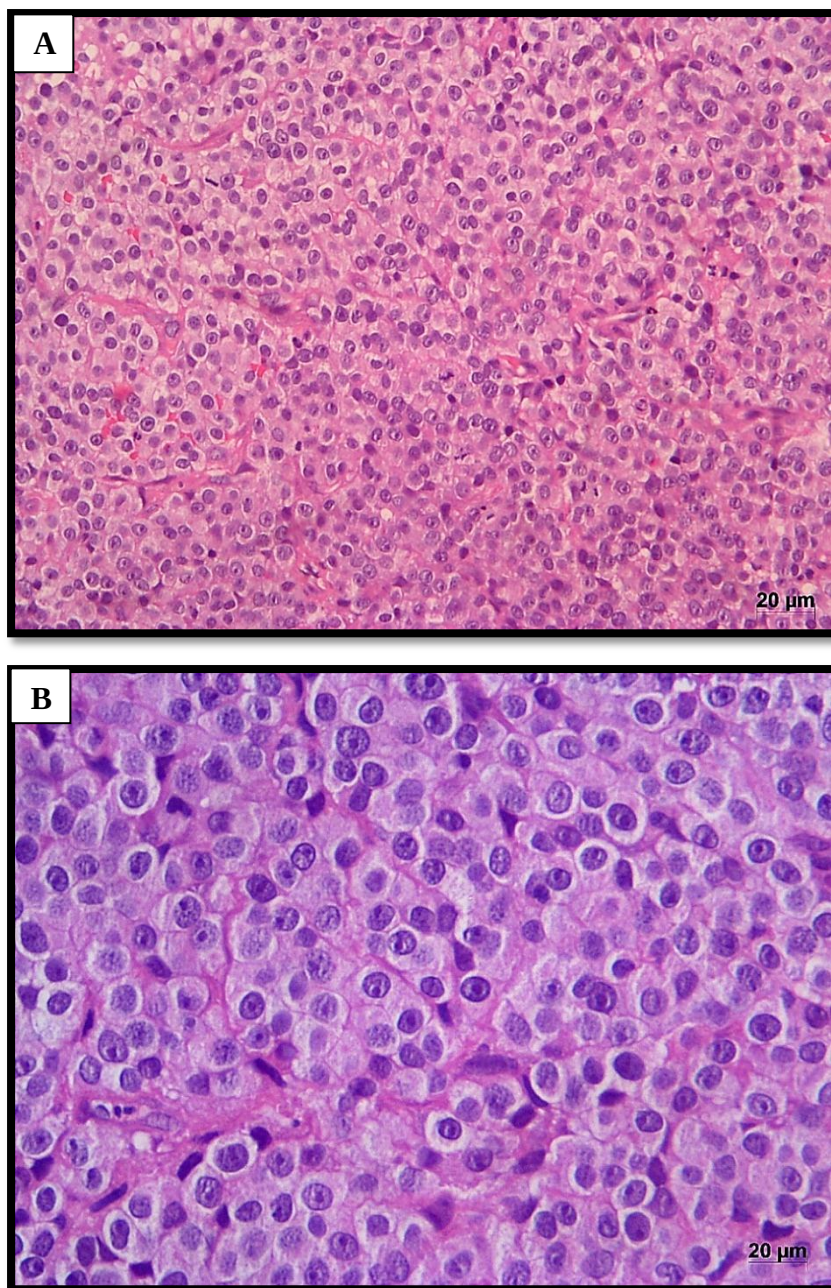
Figura 11 - Cariótipo de célula em cultura primária de TVTC. (A) Contagem de 72 cromossomos. (B) Contagem de 54 cromossomos. Números inferiores a 78 das células somática do cão.



Fonte: Elaborado pelo autor.

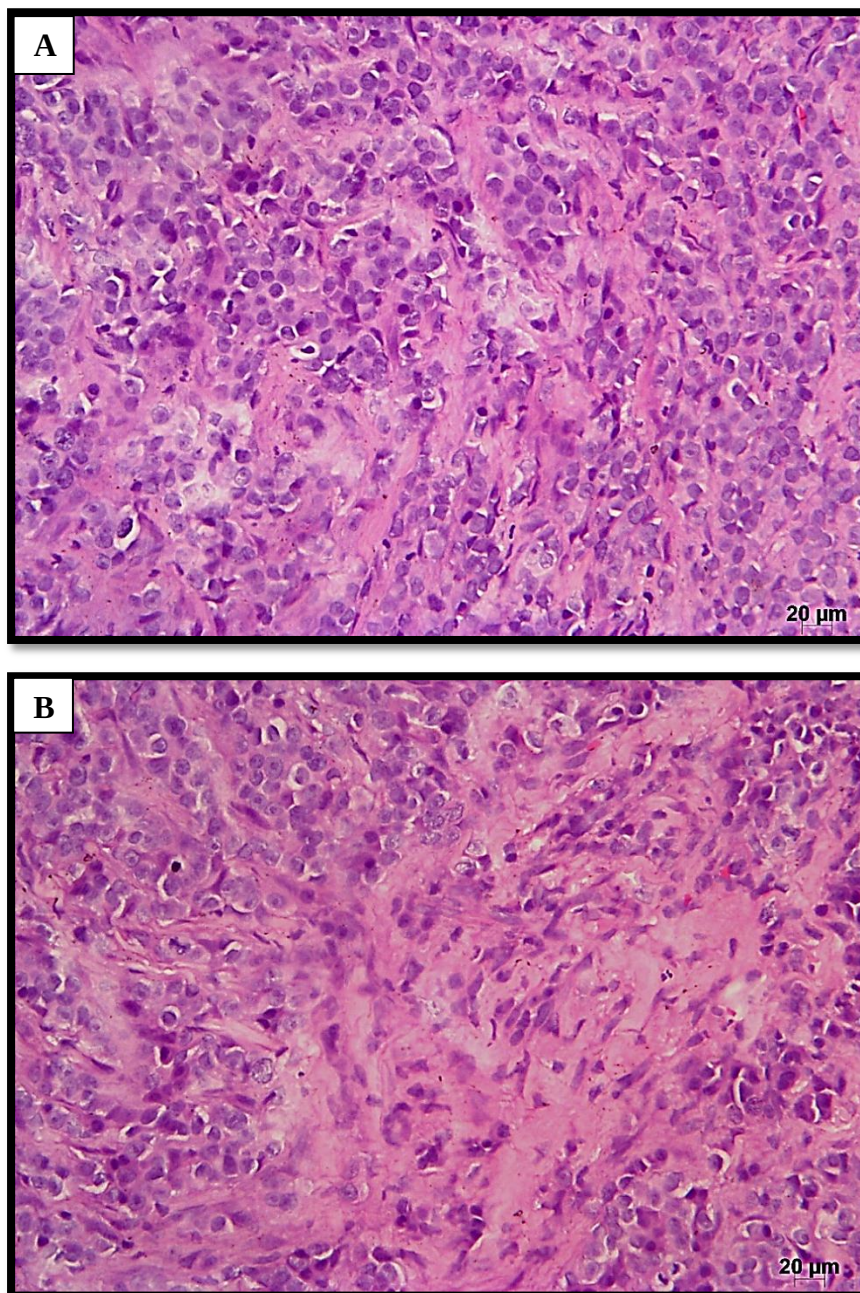
APÊNDICE G

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



Fonte: Elaborado pelo autor.

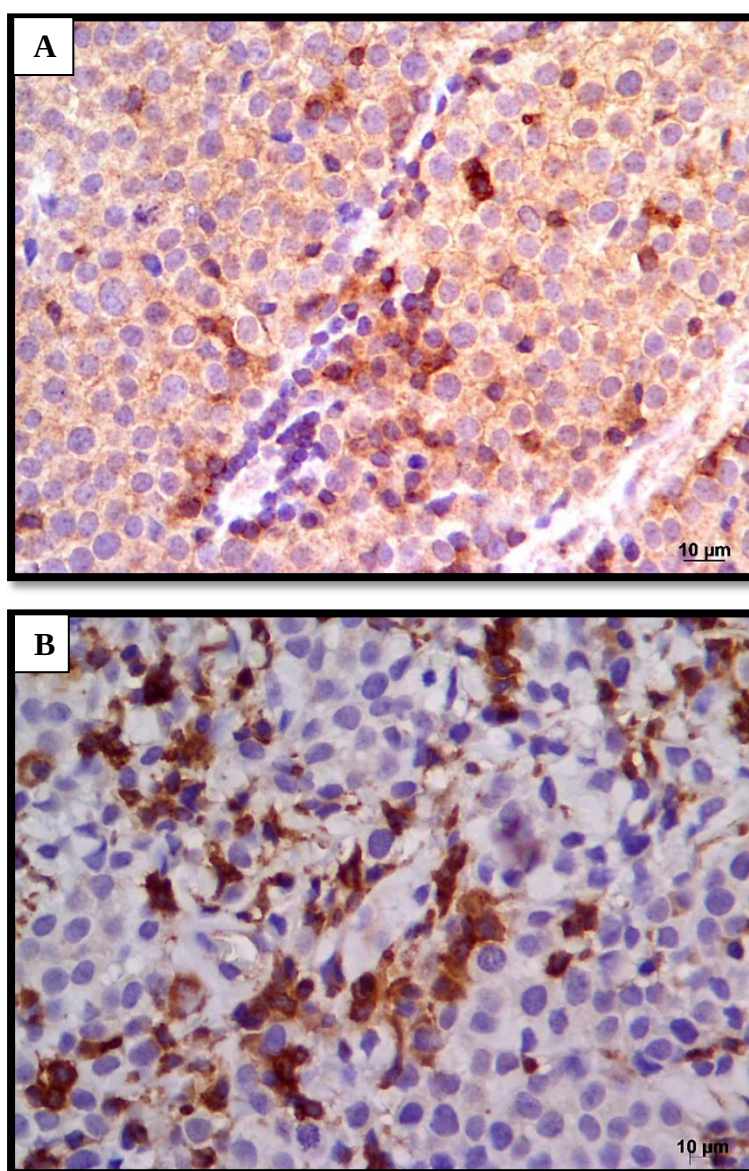
Figura 13 - Tumor venéreo transmissível canino. (A) Fase de regressão inicial. Presença de infiltrado inflamatório e moderado estroma. (B) Fase de regressão final. Colapso do parênquima tumoral devido intensa proliferação de tecido estromal. Coloração pelo H.E, 200x.



Fonte: Elaborado pelo autor.

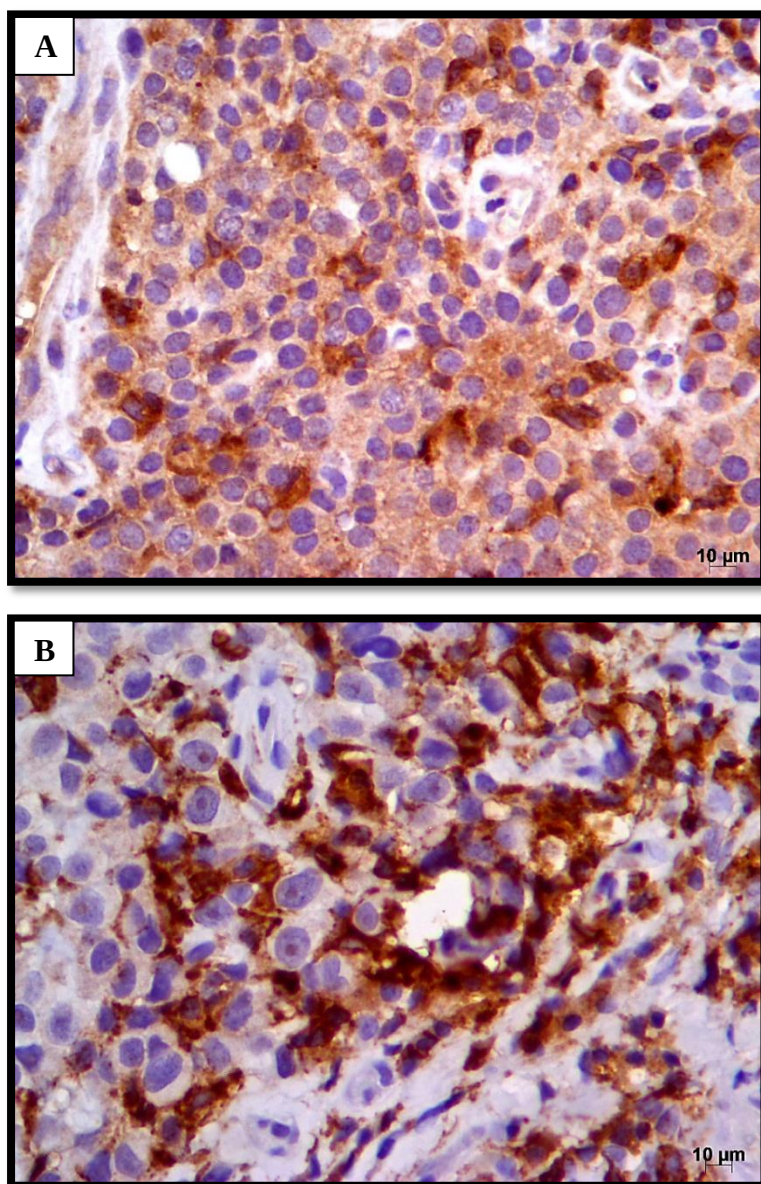
APÊNDICE H

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



Fonte: Elaborado pelo autor.

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



Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE I

Tabela 7 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes às diferentes fases clínicas do TVTC.

Sangue						
Fase do tumor	CD3	CD4	CD8	Monócito	CD79	NK
Progressão	69,5±23,4	53±9,8	16,5±15	48,5±32	20±19,9	8±6,6
Regressão	64,3±25,7	50±4	29,4±6,4 ^a	56,6±21 ^a	27±21	2,1±1
Tumor						
Fase do tumor	CD3	CD4	CD8	Macrófago	CD79	NK
Progressão	32±21,7	54,9±22,4	11±14	29,6±32,5	16,6±14,1 ^a	6±8,1
Regressão	29±16,9	63±10,7 ^a	15,1±9,6 ^a	54,4±58,6 ^a	5,7±6,1	9±8,2 ^a

^a(>0,05) diferença biológica ^b(≤0,05) diferença significativa

Tabela 8 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes aos diferentes subtipos citológicos do TVTC.

Sangue						
Subtipo citológico	CD3	CD4	CD8	Monócito	CD79	NK
Linfocitóide	77,3±14,3	45±9,3	18,1±22,1	34,7±21,9	14,9±12,5	10,6±9,7
Plasmocitóide	66,3±26,1	53,3±6,1	17,3±14,3	53±35,9	15,4±15,3	6,3±3,6
Misto	63±27,8	60±5,6 ^b	17,9±6,3	62,1±37,6	31,1±26,1 ^a	7,1±4,3
Tumor						
Subtipo citológico	CD3	CD4	CD8	Macrófago	CD79	NK
Linfocitóide	41,4±21,3	54,9±20,2	15,1±17,7	19,1±28	14,2±11,2	6,3±9,1
Plasmocitóide	21,9±15,3	53,7±24,6	11,9±15,4	36,2±34,4	16±20,7	4,3±5,3
Misto	31,2±23,1	58,3±23	9,8±6,9	41,7±40,8	16,4±10,7	8,8±9,5 ^a

^a(>0,05) diferença biológica ^b(≤0,05) diferença significativa

Tabela 9 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes ao sexo dos cães com TVTC.

Sangue						
Sexo	CD3	CD4	CD8	Monócito	CD79	NK
Fêmea	78,8±14,1 ^b	55,9±8,6 ^a	24,7±12,2 ^b	47,5±34,6	29,1±25,3 ^a	5,5±3,9
Macho	63,9±25,2	51,6± 9,5	13,3±14,3	50,7±32	14,9±12,8	8,5±7,9 ^b
Tumor						
Sexo	CD3	CD4	CD8	Macrófago	CD79	NK
Fêmea	36±19,9 ^a	65,5±11,2 ^b	8,2±7,9	43,2±39 ^a	20,3±18,8 ^a	9,7±10,1
Macho	28,7±22,1	47,74±24,8	15,6±16,4	23,11±28,2	11,56±6,3	4,7±5,4

^a(>0,05) diferença biológica ^b(≤0,05) diferença significativa

Tabela 10 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes à raça dos cães com TVTC.

Sangue						
Raça	CD3	CD4	CD8	Monócito	CD79 ¹	NK
Com raça	81,1±17,5 ^a	61,3±6,2 ^b	23,7±5	48,9±45,4	49±21,1	5,6±5,4
Sem raça	66,8±23,6	51,2±9,1	16,8±15,8	49,6±32,3	17±16,6	8,6±6,9
Tumor						
Raça	CD3	CD4	CD8	Macrófago	CD79	NK
Com raça	34,7±29,4	74,1±8,4 ^b	8,5±5,1	47,4±46,8	12,2±7,8	8,3±9,3
Sem raça	31,5±20,3	52,5±21,5	12,9±14,5	29,4±32,9	16,1±14,7	6,3±8,1

^a(>0,05) diferença biológica ^b(≤0,05) diferença significativa

Tabela 11 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes à idade dos cães com TVTC.

Sangue						
Idade	CD3	CD4	CD8	Monócito	CD79	NK
Jovem	70,2±22	55±8,7	16,9±14,1	42,5±24,3	27,6±21,6 ^a	7±4,2
Adulto	70,8±26,7	51,6±9,5	14,7±14,4	48,9±36,3	16,75±20,1	7,9±5
Idoso	60±14,9	51,1±13,3	30,3±16,9 ^a	60,9±37,2	21,4±17,7	11,75±14,9

Tumor						
Idade	CD3	CD4	CD8	Macrófago	CD79	NK
Jovem	31,4±14,4	63,6±10,8	6,5±4,7	38,7±37,2	27,8±17 ^b	6,4±9,9
Adulto	27,2±21,6	53,5±27,6	10,6±12,3	26,1±31,2	8,7±4,8	7,6±7,9
Idoso	49,2±29,6 ^a	44,7±12,8	31,7±16,5 ^a	37±48,8	9,5±3,8	3,3±2

Jovem (>2anos), Adulto (2-7anos), Idoso (>7anos)

^a(>0,05) diferença biológica ^b(≤0,05) diferença significativa

Tabela 12 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares em amostras de sangue e de tumor referentes à resposta ao tratamento quimioterápico dos cães com TVTC.

Sangue						
Tratamento	CD3	CD4	CD8	Monócito	CD79	NK
RC	64±21	51,2±7,2	28±9,2	66,6±24,4 ^a	15,9±9	7±3,9
RP	60±19,8	54±5,9	15,9±10,8	56±27,7	17,1±12,3	6,7±3,2
R	86,6±10 ^a	60,5±3,3 ^a	11,3±9,4	16±1	35±28	11±6

Tumor						
Tratamento	CD3	CD4	CD8	Macrófago	CD79	NK
RC	26±15	56±23,4	9,8±7,1	48±33 ^a	8±5,4	9,6±6 ^a
RP	24,2±11,1	59,5±13	9±6,1	36±32	19±11,4	3,2±2,7
R	53,6±13,5 ^a	70,8±4,6 ^a	10±3,5	3,4±0,3	12,9±1,4	1,5±1

^a(>0,05) diferença biológica ^b(≤0,05) diferença significativa

Tabela 13 - Valores percentuais da análise de citometria de fluxo para as células mononucleares comparando os resultados obtidos em amostras de sangue e de tumor.

Análise comparativa	CD3	CD4	CD8	Macrófago	CD79	NK
Sangue	69±18,8 ^b	52,7±7,5	18±12 ^a	49,5±29,4 ^b	20,7±15,8 ^a	8,1±4,6 ^a
Tumor	32±15,7	56±16,5 ^a	12,3±9,9	32,1±29	15,5±9,7	6,5±6

^a(>0,05) diferença biológica ^b(≤0,05) diferença significativa