



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

**EXPRESSÃO DOS GENES *MDR-1*, *TP53*, *BCL-2* E *BAX* EM
TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO E SUA RELAÇÃO
COM A AGRESSIVIDADE E RESPOSTA À TERAPIA.**

LUIS MAURICIO MONTOYA FLÓREZ

Botucatu - São Paulo-Brasil
Novembro de 2014



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

**EXPRESSÃO DOS GENES *MDR-1*, *TP53*, *BCL-2* E *BAX* EM
TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO E SUA RELAÇÃO
COM A AGRESSIVIDADE E RESPOSTA À TERAPIA.**

LUIS MAURICIO MONTOYA FLÓREZ

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a: Noeme Sousa Rocha

Botucatu - São Paulo-Brasil
Novembro de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Flórez, Luis Mauricio Montoya.

Expressão dos genes MDR-1, TP53, BCL-2 e BAX em tumor
venéreo transmissível canino e sua relação com a
agressividade e resposta à terapia / Luis Mauricio Montoya
Flórez. - Botucatu, 2014

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

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Capes: 50503006

1. Cão - Doenças. 2. Tumores venéreos veterinários. 3.
Expressão gênica. 4. Apoptose. 5. Citotoxicidade. 6.
Quimioterapia.

Palavras-chave: Apoptose; Citotoxicidade; Quimioterapia;
Toxicogenômica.

Nome do Autor: Luis Mauricio Montoya Flórez.

Título: Expressão dos genes *MDR-1*, *TP53*, *BCL-2* e *BAX* em tumor venéreo transmissível canino e sua relação com a agressividade e resposta à terapia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dra. Noeme Sousa Rocha

Presidenta e orientadora

Departamento de Clínica- Patologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira

Membro

Departamento de Clínica- Patologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Mauricio Sforcín

Membro

Depto. Microbiologia e Imunologia

IB- UNESP - Campus de Botucatu

Prof. Dr. André Schenka

Departamento de Farmacologia Faculdade de Ciências Médicas (FCM)- Patologia.

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof^a Dra. Glenda Nicioli da Silva

Escola de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto Minas Gerais.

Data de defesa 21 de novembro 2014

Nada na vida acontece por um acaso, e se acontece, DEUS quis assim, o que me resta é so correr atrás de meus objetivos, ainda mesmo que as pessoas conspirem ao contrário, DEUS estará comigo.

Eca Queiroz

Dedico este trabalho a minha namorada Marleny, a meus queridos pais, Luis Enrique e Maria De Los Angeles, a meus irmãos Carlos, Dairon e esposas, a meus sobrinhos, avos, família; e a eterna memória de meu irmão Jhon.

AGRADECIMENTOS

A Deus e o Universo que conspiraram para que ao fim tudo desse certo.

A minha namorada Marleny, eterna gratidão por tudo o que tem feito por mim.

A minha família, todos foram parte fundamental nesta fase da minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha, acredito que na vida encontramos ao nosso passo as pessoas certas e você é um exemplo disso, obrigado por seu carisma, por acreditar em mim, e por me permitir sonhar e ao fim concluir este importante objetivo.

Ao meu orientador de Mestrado, Prof. Dr. Francisco Javier Pedraza, sua ajuda foi fundamental para hoje estar aqui.

Ao Prof. Dr. Julio Ernesto Vargas e ao Dr. Edwin García Ciro, obrigado pela confiança, por me permitir iniciar este grande sonho.

Aos meus amigos, contar com vocês é bom de mais.

Aos meus companheiros de República: Paulo, João, Daniel, Leda, Luis, grandes lembranças tenho de todos vocês. Paulo e João, obrigado, nunca esquecerei de tudo o que fizeram por mim.

Aos professores, Dra. Fernanda da Cruz Ladim, Dra. Daisy Maira Fávero Salvadori, Dr. João Pessoa de Araujo Junior, Dra. Ligia Souza Lima Silveira da Mota Dra. Elenice Deffune, Dra. Cláudia Valéria Seullner Brandão, Dr. Antonio José de Araújo Aguiar por gentilmente me permitir fazer as provas do experimento em seus laboratórios.

Aos meus colegas de Pós-graduação na Patologia Veterinária: Breno, Cadú, Claudenice, Claudia, Diogo, Fabrizio, Germana, Haline, Hugo, Isamery, Leo, Luis, Priscila, Sarah, Talia, Tatiany, Talita e demais que já foram.

Aos residentes da Patologia e Ornitopatologia Juliana, Leonardo, Maíra, Tarcisio, Bruna.

Aos Pesquisadores e estudantes do Laboratório de Toxicogenômica, Nutrigenômica e Epidemiologia Molecular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Unesp Botucatu, em especial a Elaine Aparecida Camargo, João Paulo Marcondes, Maruhen Amir Datsh Silveira, André Luiz Ventura, Helenice De F. Lego.

Aos Pesquisadores e estudantes do Laboratório de Fertilização *in vitro* e Cultivo Celular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP Campus Botucatu.

Aos Pesquisadores e estudantes do Laboratório de Virologia Animal do Instituto de Biociências Unesp Botucatu, em especial ao Dr. Ricardo Seiti Yamatogi.

Aos Pesquisadores e estudantes do Laboratório de Engenharia Celular, em especial a Josy Campanhã Vicentini de Oliveira.

Aos Mestrandos e doutorandos de Anestesiologia, Cirurgia e Clínica veterinária, em especial Sharlenne Monteiro e Rômulo Nunes Rocha.

Aos professores Julio Lopes Sequeira, Renée Laufer Amorim, Alessandre Hataka, pela atenção e apoio.

Ao professor Jose Carlos Pantoja e Luzia Aparecida Trinca pela ajuda nas análises estatísticas.

À professora Dra. Glenda Nicioli Da Silva pela ajuda durante o projeto.

Ao Dr. Alaor Aparecido Almeida pela ajuda nos testes de citotoxicidade.

Aos funcionários do serviço de Patologia Maury Raul, Claudinei Domingues, Valeria Dalanezi, Sonia Maria Santi. À funcionária do setor de Genética Animal do Instituto de Biociências, Valquiria Santiloni.

Aos proprietários e os animais de companhia que fizeram parte deste projeto.

Ao Departamento de Ciência Inovação e Tecnologia da Colômbia (COLCIÊNCIAS), Fundação para o Futuro da Colômbia (COLFUTURO), Universidade Estadual Paulista (UNESP) e Associação Ibero-Americana de Pós-graduação (AUIP), pelo suporte financeiro para minha manutenção.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo FAPESP pelo suporte financeiro para o projeto. Processo: 2012/19285-2.

LISTA DE TABELAS

Tabela. 1	Painel de imunomarcção para a confirmação do TVT.....	16
Tabela. 2	Sense e Antisense dos genes utilizados na RT- qPCR.....	21
Tabela. 3	Dados Clínicos dos pacientes atendidos no Hospital Veterinário.....	23
Tabela. 4	Taxas de crescimento durante 10 dias em diferentes culturas de TVT...	28
Tabela. 5	Porcentagem de viabilidade (citotoxicidade) e sobrevivência em células de TVT após o tratamento com vincristina.....	29
Tabela. 6	Porcentagem de células de TVT viáveis, em apoptose e necrose após o tratamento com vincristina.....	31
Tabela. 7	Cinética do ciclo celular em células de TVT 48 horas após o tratamento com vincristina.....	31
Tabela. 8	Valores numéricos (QR) referentes à análise de RT-qPCR para os genes <i>MDR-1</i> , <i>TP53</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-2</i> em amostras de cultura de TVT.....	33
Tabela. 9	Valores numéricos (QR) referentes à análise de RT-qPCR para os genes <i>MDR-1</i> , <i>TP53</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-2</i> em amostras de tecidos de TVT.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1	Tumor Venéreo Transmissível Canino.....	24
Figura. 2	Marcação imunohistoquímica em tecido de TVT.....	25
Figura. 3	Isolamento de células de TVT.....	26
Figura. 4	Caracterização fenotípica da culturas primarias de TVT.....	27
Figura. 5	Cariótipo de culturas de TVT.....	27
Figura. 6	Células de TVT após tratamento com vincristina.....	30

LISTA DE GRAFICOS

Grafico. 1	Distribuição de escore de marcação em tecidos de TVT.....	26
Grafico. 2	Curva de crescimento de diferentes culturas de TVT.....	28
Grafico. 3	Porcentagem de células de TVT viáveis após 24 horas de tratamento com três concentrações de vincristina.....	29
Grafico. 4	Porcentagem de sobrevivência de células de TVT, cinco dias após do tratamento com três concentrações de vincristina.....	30
Gráfico. 5	Expressão relativa de RNAm de <i>MDR-1</i> em células de TVT após tratamento com vincristina.....	34
Gráfico. 6	Expressão relativa de RNAm TP53 em células de TVT após tratamento com vincristina.....	35
Gráfico. 7	Expressão relativa de RNAm BAX em células de TVT após tratamento com vincristina.....	35
Gráfico. 8	Expressão relativa de RNAm BCL-2 em células de TVT após tratamento com vincristina.....	36
Gráfico. 9	Expressão relativa de RNAm dos diferentes genes em tecidos de TVT.....	36

SUMÁRIO

1. ENUNCIADO DO PROBLEMA.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	1
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. 1. Resistência mediada pelo gene <i>MDR1</i> (glicoproteína-p).....	4
3.2. Resistência e agressividade tumoral mediada pela expressão do gene <i>TP53</i>	6
3.3. Resistência e agressividade tumoral mediada pela expressão dos gene da família <i>BCL-2</i>	8
3.4. Microambiente celular e suas implicações no comportamento biológico de tumor.	10
3.5. Apoptose induzida pela vincristina no tratamento do TVT.....	12
3.6. Cultura celular no TVT.....	13
4. Objetivos.....	13
5. Hipóteses do estudo.....	14
6. METODOLOGIA.....	14
6.1. Comitê de ética.....	14
6.2. Avaliação clínica dos cães com TVT.....	14
6.3. Animais e coleta do tumor.....	14
6.4. Imunofenotipagem.....	15
6.5. Cultura primária de TVT.....	16
6.6. Passagens celulares.....	17
6.7. Contagem celular.....	17
6.8. Criopreservação dos cultivos.....	17
6.9. Curva de crescimento.....	17
6.1.1. Concentração da vincristina e curva de crescimento para os tratamentos.....	18
6.1.2. Testes de citotoxicidade e sobrevivência celular.....	18
6.1.3. Avaliação do ciclo celular e apoptose.....	19
6.1.4. Congelamento das amostras para RT- qPCR.....	20
6.1.5. Extração de RNA.....	20
6.1.6. Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-qPCR) em tempo real.....	20
6.1.7. Quantificação por RT - qPCR.....	21
7. Análise estatística.....	22
8. RESULTADOS.....	22

8.1. Dados epidemiológicos e clínicos dos animais.....	22
8.2. Macroscopia dos tumores.....	22
8.3. Imunohistoquímica em tecidos de TVT.....	24
8.4. Isolamento e caracterização da cultura primária de TVT.....	24
8.5. Imonofenotipagem de células do TVT.....	24
8.6. Citogenética dos cultivos primários.....	24
8.7. Curva de crescimento.....	25
8.8. Concentração celular para os testes de citotoxicidade.....	28
8.9. Citotoxicidade e Sobrevivência em células de TVT.....	29
8.1.1. Apoptose.....	30
8.1.2. Ciclo celular.....	31
8.1.3. Expressão gênica.....	31
9. DISCUSSÃO.....	37
9.1. Frequência e caracterização do TVT.....	37
9.2. Avaliação “ <i>in vitro</i> ” da citotoxicidade, sobrevivência, apoptose e ciclo celular em TVT submetidos ao tratamento com vincristina.....	39
9.3. Expressão dos genes <i>MDR-1</i> , <i>TP53</i> , <i>BCL-2</i> e <i>BAX</i> em cultura primária e tecidos de TVT.....	44
10. CONCLUSÃO.....	48
11. REFERÊNCIAS.....	49
12. ANEXOS.....	66
13. Artigo Científico.....	72

EXPRESSÃO DOS GENES *MDR-1*, *TP53*, *BCL-2* E *BAX* EM TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO E SUA RELAÇÃO COM A AGRESSIVIDADE E RESPOSTA À TERAPIA.

Luis M Montoya, Noeme S Rocha

Resumo

O tumor venéreo transmissível – TVT é objeto de numerosas investigações, apesar disso, existem lacunas que necessitam estudos. Há TVTs com graus variados de agressividade, portanto, alguns não respondem aos protocolos terapêuticos convencionais. Dando a entender que há modificações progressivas do seu perfil biológico. Técnicas como cultura celular, citometria de fluxo e a biologia molecular oferecem subsídios para se identificar e quantificar essas modificações, inclusive prever comportamento biológico de tumor. O objetivo foi quantificar a expressão dos genes *BAX*, *BCL2*, *TP53* e *MDR1* em células de TVT primário e *in vitro* antes e depois da vincristina, a fim de identificar modificações quanto à resistência a agressividade e o tratamento. Foram obtidas 18 amostras de TVT caninos, para se estabelecer 8 culturas primárias. Logo depois se realizou testes de citotoxicidade, sobrevivência, apoptose, curva de crescimento e análise de expressão dos genes *BAX*, *BCL2*, *TP53* e *MDR1*. Quando se comparou as células de TVT tratadas com vincristina, com aquelas que não receberam o tratamento, houve diferença estatística em relação às taxas de citotoxicidade, sobrevivência, e fases do ciclo celular, G1, Sub G1 e S. Sobre a expressão do gene *MDR-1* a mesma diferença foi observada quando se comparou grupos de células tratadas e não tratadas. Nessa situação, o que se espera encontrar seria a baixa expressão do gene *TP53*, entretanto, ocorreu o oposto, qual seja alta expressão do gene *TP53*. Nessa situação acredita-se que tenha ocorrido o mecanismo regulador de apoptose. Quanto aos genes *BAX* e *BCL-2* não foram observadas diferença estatística entre os grupos. Nesse caso, parecer não ter ocorrido a regulação esperada, do *BAX* pelo *TP53*. Acredita-se que houve mutação do *TP53*. Dados pouco relatados em TVT. Apesar de dados iniciais, podem concluir que estão relacionados à malignidade do tumor e resistência a quimioterapia.

Palavras chaves: apoptose, citotoxicidade, quimioterapia, toxicogenômica

Abstract

Transmissible venereal tumor - TVT has been subject of numerous investigations, despite this, there are gaps that need studies. There TVTs with varying degrees of aggressiveness, so some do not respond to conventional treatment protocols. Implying that there is progressive alteration of their biological profile. Techniques such as cell culture, flow cytometry and molecular biology offer subsidies to identify and quantify these changes, including predicting the biological behavior of the tumor. The objective was to quantify the gene expression *BAX*, *BCL2*, *TP53* and *MDR1* in primary TVT cells and *in vitro* before and after vincristine, in order to identify changes regarding the aggressiveness and resistance to therapy. 18 samples of TVT canines were obtained to establish 8 primary cultures. After was performed cytotoxicity tests, survival, apoptosis, growth curve and analysis of expression of genes *BAX*, *BCL2*, *p53* and *MDR1*. When comparing the TVT cells treated with vincristine, with those who did not receive treatment, there was statistical difference in relation to cytotoxicity rates, survival, and cell cycle phases, G1, Sub G1 and S. About the *MDR-1* gene expression, the same difference was observed when comparing cells treated and untreated groups. In this situation, what would be expected at the low expression of the *TP53* gene, however, was the opposite, in other words high expression of *TP53* gene. In this situation it is believed that there has been a regulatory mechanism of apoptosis. In *BAX* and *BCL-2* genes were not observed statistical difference between the groups, in this case, appears to have not occurred the regulation expected of *BAX* by *TP53*. It is believed that there *TP53* mutation. Data low reported on TVT. Although initial, data may conclude that are related to tumor malignancy and chemotherapy resistance.

Key words: apoptosis, chemotherapy, cytotoxicity, toxicogen

1. Enunciado do problema

O tumor venéreo transmissível – TVT é uma neoplasia que exhibe comportamento biológico versátil. O Laboratório de Patologia Investigativa Comparada da FMVZ - Botucatu vem estudando TVTs com diferentes graus de agressividade (AMARAL, 2005; BASSANI-SILVA, 2005; GASPAR, 2005), resistência “*in vitro*” à ação antitumoral da própolis (BASSANI-SILVA et al., 2007) e “*in vivo*” ao tratamento com o sulfato de vincristina (GASPAR et al., 2009, GASPAR et al., 2010), a fim de contribuir para a melhoria do diagnóstico e terapia do tumor.

Foi observado que as células de TVT mais agressivas apresentam menor quantidade de quebras no DNA (AMARAL et al., 2011), maiores medidas nucleolares (AMARAL, 2005), aumento da proliferação celular evidenciado na alta reatividade de Ki67 (MBI-1) (GASPAR, 2005); além disso, também foi observado células de TVT que apresentam altas proporções de metástases (AMARAL et al., 2007) e aumento na expressão da glicoproteína-p (GASPAR et al., 2010), o que faz necessário empregar um maior número de doses de quimioterápicos para que haja a regressão do tumor (GASPAR et al., 2010), aumentando, assim, os custos do tratamento e seus os efeitos colaterais (anorexia, mielossupressão e nefrotoxicidade). Essas informações apontam para a existência de modificações biológicas que tornam TVTs mais agressivos e resistentes ao tratamento.

2. Introdução

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma neoplasia de origem incerta, entretanto, quanto à morfologia, é classificado como uma neoplasia de células redondas, de aspecto plasmocitóide ou linfocitóide (AMARAL et al., 2007). A literatura especializada no assunto, descreve que ele emergiu por volta de dez mil anos (SIDDLE; KAUFMAN, 2013; MURCHISON et al., 2014), sendo sua distribuição mundial (MIKAELIAN et al., 1998; FOWLER et al., 1997; ROGERS et al., 1998; MORALES; GONZÁLEZ, 1995; GONZÁLES et al., 1997; BOOTH, 1994, PÉREZ et al., 1994; FERREIRA et al., 2000; BOSCOS et al., 1999; ERÜNAL-MARAL et al., 2000, SOBRAL et al., 1998; TINUCCI-COSTA, 1999, AMARAL et al., 2004).

O tumor apresenta algumas particularidades, dentre elas afinidade pelo cão (NIELSEN; KENNEDY, 2000, OLIVEIRA et al., 2013, GANGULY et al., 2013),

geralmente não é agressivo, pois raramente esta relacionado com óbito do paciente (SIDDLE; KAUFMAN, 2013).

As células do TVT possuem a particularidade de se implantar em mucosas, quando as mesmas perdem a integridade. Assim o tumor se estabelece, se prolifera, podendo alcançar outros locais, desenvolvendo inclusive metástases; porém a transmissão venérea ainda é a mais frequente (OLIVEIRA et al., 2013, GANGULY et al., 2013).

O mecanismo pelo qual ocorre a implantação ainda é incerto, entretanto, acredita-se que a redução da defesa imunológica pode contribuir fortemente no processo. Desta forma, o desenvolvimento do TVT pode ser o resultado do êxito da neoplasia em relação ao sistema imune do hospedeiro. Nessa linha de raciocínio, a transferência tumoral só é possível entre cães que compartilham o mesmo MHC ou quando há comprometimento da imunidade, pois as células de TVT induzem resposta imune protetora (MURGIA et al., 2006).

A transplantação ocorre quando células tumorais intactas perdem a capacidade de expressar moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, permitindo a transposição da barreira tecidual em cães saudáveis, via contato entre a pele e/ou mucosa lesionadas (LIU et al., 2008; STOCKMANN et al., 2011).

Uma vez estabelecido, a expressão clínica pode variar desde uma única forma até múltiplas, preferencialmente na genitália externa, podendo ser encontrado nas cavidades do seio nasal, oral, ocular e pele (KIRCHOFF; NOHR, 1994; FERREIRA et al., 2000, SANTOS et al., 2005, GANGULY et al., 2013).

O diagnóstico da entidade é feito, a princípio pela manifestação clínica, posteriormente realiza-se o exame citológico e raramente se faz uso do exame histopatológico (DAS; DAS, 2000, GANGULY et al., 2013). O citopatológico por ser o mais sensível não importa se por punção ou exfoliação, possui diagnóstico quase sempre conclusivo, permitindo inclusive classificá-lo em células redondas, do tipo linfocitóide, plasmocitóide ou misto (AMARAL et al., 2007; MONTROYA et al., 2012). O que facilita o estabelecimento do protocolo terapêutico mais adequado.

Apesar da facilidade para sua identificação, existem animais que desenvolvem alguns TVTs que escapam da normalidade, sendo esses de difícil diagnóstico. Há na literatura indicação para análises cromossômicas (citogenética) e imunofenotipagem (VARASCHIN, 2001), neste último caso, empregasse para sua caracterização

anticorpos como anti-lisozima, anti alfa-antitripsina (ATT), anti.vimentina, e o anti-MAC1 (marcador de macrófagos) (MOZOS et al., 1996, MARCHAL et al., 1997).

O protocolo terapêutico estabelecido para o TVT, que utiliza o sulfato de vincristina como agente único, em aplicações semanais (quatro a oito aplicações via intravenosa), é o mais utilizado para a regressão do tumor (ERÜNAL-MARAL et al., 2000, OLIVEIRA et al., 2013, GANGULY et al., 2013). Dessa forma, cerca de 90% dos cães submetidos a esse tratamento, de regra, respondem, embora apresentem sinais e sintomas sugestivos de efeitos colaterais graves que levam a maioria das vezes à interrupção do tratamento (GILVIE, 1996, ATHANASIOS et al., 2013).

Apenas um pequeno percentual de tumores é resistente à vincristina (ROGER, 1997, SAID et al., 2009). Nesse caso, o fármaco de escolha é a doxorrubicina (ROGERS, 1997) e com menor frequência a vimblastina, metrotexate, prednisolona ou suas combinações (KUNAKORNSAWAT et al., 2010, SUDJAIDEE et al., 2012). Portanto, a terapia para o TVT, atualmente, restringe-se a um escasso número de drogas, que às vezes são insuficientes, pois existem tumores resistentes a elas (SOUSA et al., 2000; ANDRADE 2008, ATHANASIOS et al., 2013).

Em pesquisas desenvolvidas, no Laboratório de Patologia Veterinária Comparada da UNESP-Botucatu, têm-se evidenciado um aumento progressivo de tumores que apresentam elevados percentuais de agressividade e variável resposta à quimioterapia, inclusive resistência. Isso em parte ocorre devido à elevada expressão de glicoproteína-p pelas células tumorais o que pode acarretar a expulsão do quimioterápico (GASPAR et al., 2010). Assim, há um aumento nos custos do tratamento, além dos efeitos colaterais, tais como anorexia, mielossupressão e nefrotoxicidade.

Da mesma maneira, tem-se observado no tumor, padrões morfológicos e moleculares, que são característicos dos tumores mais agressivos (AMARAL et al., 2011; MONTROYA et al., 2013a), porém, ainda, precisa-se conhecer a associação destes, com o comportamento biológico, isto é, com a agressividade ou possível resistência ao tratamento.

A resistência à terapia e o comportamento biológico nos tumores são fenômenos multifatoriais e geralmente regulam esses processos, genes pro e antiapoptóticos da família *BCL-2*, mecanismos de detoxificação intracelular e superexpressão de moléculas que transportam as drogas para fora da célula ou para outros compartimentos celulares, encontram-se como um dos principais expoentes a glicoproteína-p, produto do gene

MDR-1. Finalmente, a resistência dos tumores se associa em último termo a sistemas de reparo do DNA, os quais estão associados com a família do TP53.

Dessa forma, considerando a importância, em aprofundar a compreensão da evolução e patogenicidade do TVT, o estudo visa descrever as possíveis implicações da expressão dos genes *MDR-1* (glicoproteína-p), *TP53*, *BCL-2*, *BAX*, quanto à resistência à quimioterapia, ou comportamento biológico do TVT.

3. Revisão de literatura

3. 1. Resistência mediada pelo gene *MDR1* (glicoproteína-p)

Normalmente, a resistência à quimioterapia é um grande obstáculo para os pacientes com câncer; para sua explicação, muitos mecanismos têm sido propostos, porém, o principal processo envolvido na resistência clínica à quimioterapia é a superexpressão da glicoproteína-p (Pgp) na membrana da célula, a Pgp reconhece diferentes agentes quimioterápicos e os transporta para fora da célula, levando as drogas a uma redução da concentração intracelular, até níveis não letais (HODGES et al., 2011, TSUJIMURA; TANAKA, 2012; BINKHATHLAN; LAVASANIFAR, 2013).

Quanto ao TVT, nos últimos anos, têm-se registrado um crescente percentual de animais resistentes à quimioterapia (GASPAR et al., 2009; 2010, ATHANASIOS et al., 2013) com severas implicações, principalmente devido a atual terapia, a qual restringe-se a um escasso número de drogas (ROGER, 1997, SAID et al., 2009).

Desta forma, na procura de explicações sobre a variável resposta terapêutica, foi sugerido que alterações na expressão da Pgp em células tumorais, tinham associação com resistência à vincristina, principal droga de escolha para o tratamento do TVT.

A expressão imunohistoquímica da glicoproteína-p foi variável no TVT; e encontrou-se maior resistência à quimioterapia em tumores com superexpressão da Pgp (GASPAR, 2005; GASPAR et al., 2009; 2010), resultado em concordância com o já descrito em tumores de humanos (HODGES et al., 2011, TSUJIMURA; TANAKA, 2012; BINKHATHLAN; LAVASANIFAR, 2013).

A Pgp, também conhecida como ABCB1 é o produto do gene *MDR-1*. Trata-se de uma proteína de 170 kDa, com 12 domínios transmembrana e dois sítios de união ao ATP; pertence as proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) que são canais de membrana dependentes de energia, e estão envolvidos na transferência de moléculas biológicas através da membrana contra gradiente de concentração, com alta expressão em tecidos tumorais previamente expostos a fármacos (SOTO, 2007; MENDELSON et al., 2008;

HODGES et al., 2011). A Pgp pode induzir multirresistência a drogas (SZÁKCS et al., 2006).

Essa proteína é expressa em células normais das adrenais, rins, fígado, cólon, cérebro, pulmões, sangue periférico e na medula óssea (ALEXANDROVA, 1998, THOMAS; COLEY, 2003). A Pgp funciona como bomba de efluxo dependente da energia gerada pela hidrólise do ATP (THOMAS; COLEY, 2003; MAIA; RUMJANEK, 2004). Em condições normais, atua defendendo a célula contra agentes citotóxicos, a Pgp transporta para o exterior da célula drogas, como a doxorubicina, dianorubicina, epirubicina, vincristina, vimblastina, vinorelbina, otoposide e topotecan entre outras (SOTO, 2007), reduzindo as concentrações a níveis não letais (THOMAS; COLEY, 2003; MAIA; RUMJANEK, 2004).

Apesar do mecanismo protetor, a sua superexpressão leva à multirresistência a drogas (TSUJIMURA; TANAKA, 2012). Além disso, a Pgp também transporta substâncias que atuam no crescimento da célula (SZÁKCS et al., 2006) e existem observações que sustentam a possibilidade da Pgp promover a sobrevida da célula por vias independentes ao efluxo de substâncias que incluem a inibição das caspases na via de apoptoses (WARR et al., 2002).

Em associação, quando existe superexpressão do *MDR-1*, é possível observar também sua expressiva influência nos mecanismos de apoptose nas células tumorais, qual seja a de prevenção, em consequência o número de células são mantidas (WANG et al., 2013). Outros pesquisadores que investigam o tal fenômeno acreditam que o *MDR-1* atua por meio de uma variedade de estímulos, dentre eles a inibição via TNF, Fas e irradiação gama (MACLEOD, 2012; BINKHATHLAN; LAVASANIFAR, 2013).

Em oncologia médica, a importância clínica da resistência a multidroga é demonstrada pelos níveis elevados de expressão de Pgp; e como consequência, ausência de resposta à quimioterapia (MENDELSON et al., 2008), prognóstico ruim e menor tempo de sobrevida (BINKHATHLAN; LAVASANIFAR, 2013). MAIA; RUMJANEK (2004) descreveram que um número significativo de pacientes que apresentavam resistência à quimioterapia expressavam altas quantidades de Pgp.

Entretanto, estudos desenvolvidos por MOCHIDA et al., 2003, demonstraram que a ausência da Pgp, suprimiu o aparecimento de neoplasia intestinal em camundongo; porém, a ausência da expressão da Pgp é controversa, pois, há a descrição que a alteração dos mecanismos mediados pela glicoproteína podem conduzir a maior exposição a agentes tóxicos, levando a incrementar o risco para desenvolver vários

tipos de câncer de diferentes graus de malignidade, porém, essa relação casual, ainda necessita ser melhor estudada (WANG et al., 2013).

Apesar desses estudos não serem atuais, eles trazem informações relevantes para a compreensão de resistência a quimioterápicos, em especial no estabelecimento de protocolo para o TVT, visto que, são escassos os estudos para esse fim. De acordo com MEALEY et al. (1998), a Pgp em cães com linfoma funciona de forma similar ao homem. Nesse caso, os autores demonstraram nas suas pesquisas que os níveis de Pgp tiveram maiores expressões na recidiva, do que no momento do diagnóstico primário. De fato, há correlação entre a expressão da Pgp e o comportamento do tumor, visto que a mesma interfere na remissão e no tempo de sobrevivência (BERGMAN et al., 1996).

LEE et al., (1996) demonstraram que a expressão inicial de Pgp nos linfomas de cão é menor do que após a recidiva do tumor e concluíram que a expressão da Pgp antes do início do tratamento é um fator preditivo independente e negativo de sobrevivência.

Diante do exposto, a extrapolação do estudo da expressão da Pgp e sua relação com possível resistência à quimioterapia, pode trazer benefícios para o animal acometido com o TVT. Além do mais promover informações relevantes para a compreensão de mecanismos de resistência, e estimular pesquisas para uma possível modulação da expressão do gene *MDR-1* em caninos.

3.2. Resistência e agressividade tumoral mediada pela expressão do gene *TP53*

O *TP53* é um dos genes que com frequência sofrem mutação, inclusive no câncer de humanos. Há relatos que aproximadamente a metade de todos os tumores tem alteração do *TP53* (SOUSSE; BEROUD, 2001). Existem evidências que a expressão de *MDR-1* (entenda-se Pgp) é regulada por certos mutantes da proteína p53, e sugere-se que a resposta à quimioterapia ou radioterapia pode depender em parte ao estado do *TP53* antes do tratamento (MORO et al., 2010).

O gene *TP53* localiza-se no braço curto do cromossomo humano 17 (17p13), contém 11 exons que compreendem a 20 Kb (OZAKI; NAKAGAWARA, 2011), codifica a formação do p53, uma fosfoproteína nuclear de 53 KDa composta por 393 aminoácido. Esta proteína foi descoberta na década de 1970, em preparados de células SV40, e têm implicações no ciclo celular, no reparo e síntese de DNA, diferenciação celular, plasticidade genômica e no programa de morte celular (HARRIS; HOLLSTEIN, 1993; SUZUKI; MATSUBARA, 2011).

A mutação do *TP53* foi descrita em cães (KANAYAN et al., 2002); no TVT, CHOI; KIM, 2002 descreveram os primeiros relatos de mutação do gene; achados posteriormente corroborados por SERVÍN et al., (2009); porém, apesar das evidências de mutação do gene no tumor, se desconhece se esta particularidade, gera alguma troca na função da proteína (VÁZQUEZ et al., 2008).

De acordo com SERVÍN et al., (2009), no TVT, ainda é preciso estabelecer a função que pode desempenhar os polimorfismos do *TP53* na patogênese e resposta à quimioterapia. Igualmente, STOCKMANN et al., (2011a) enfatizam a necessidade de avaliar os efeitos da expressão da proteína, e membros de sua família nas células do TVT, relacionando os achados com o prognóstico e possíveis alternativas terapêuticas. Além disso, ainda é preciso determinar a influência do hospedeiro sobre esta expressão.

Em regra, em tecidos normais, o nível de expressão do *TP53* é extremamente baixo, embora, em resposta a múltiplos fatores que podem afetar a célula, esse fato se pode modificar; alguns desses fatores são a ativação de oncogênes, hipóxia, desregulação de nucleotídeos e danos oxidativos; o p53 é rapidamente acumulado no núcleo por modificações químicas como fosforilação e acetilação, exercendo sua função pró-apotótica e removendo, assim, células com sérios danos no DNA (OZAKI; NAKAGAWARA, 2011).

Neste caso, a p53 ativa alvos pró-apotóticos como a Bax, PUMA, NOXA e p53AP1 que, em conjunto, contribuem para a desestabilização do potencial de membrana mitocondrial que é um passo crítico da via da apoptose (LACROIX et al., 2006, CZABOTAR et al., 2014).

Assim, o p53 é um importante regulador da apoptose, pois ele interage com proteínas pró e antiapoptóticas como a Bcl-2 (MIHARA et al., 2003; TOMITA et al., 2006, SUZUKI; MATSUBARA, 2011) e como foi dito com o Bax (OZAKI; NAKAGAWARA, 2011, SUZUKI; MATSUBARA, 2011), além de existir evidências, que também regule a apoptose independente da transcrição mitocondrial mediante os membros da família Bcl-2 (CORY; ADAMS, 2002; FRENZEL et al., 2009). Da mesma forma, o p53 pode transativar genes como *BAX*, resultando em um alto potencial para induzir apoptose em células tumorais (MENENDEZ et al., 2006).

Porém, o p53 não só induz apoptose, mas também participa nas demais fases do ciclo celular, como na fase G1 através da transativação do p21, e na fase G2/M bloqueando a entrada da célula à mitose, o mecanismo duplo do p53: comportamento protetor e indutor da apoptose, indicando que o gene, pode atuar em algumas ocasiões

como promotor de tumor, pois o p53 pode levar a maior sobrevivência de células com alguma lesão e incrementar a possibilidade de transformação maligna (SUZUKI; MATSUBARA, 2011).

Do ponto de vista clínico, a inativação ou mutação do gene *TP53* é um evento molecular frequente e grave para a maioria dos tumores; pois existem formas mutantes do *TP53* que exibem tempos de vida média mais longa, com potencial oncogênico, e efeitos negativos sobre os tipos originais levando à quimiorresistência (OZAKI; NAKAGAWARA, 2011). Inclusive, algumas que ocasionam transativação de genes como *EGFR*, *C-MYC* e o *MDR-1* (CADWEL; ZAMBETTI, 2001) demonstrando diferentes ações das formas mutantes da *TP53* (MULLER, et al., 2011; WALERYCH, et al., 2012).

Em situação de heterozigose, no qual os tipos de p53 normais e mutantes estão presentes, às últimas formas, antagonizam os tipos normais já estabelecidos. Isto é, a inativação do p53 por expressão de mutantes, pode conceder às células vantagens para crescimento e sobrevivência, incrementando sua proliferação, evadindo o mecanismo da apoptose e gerando quimiorresistência. Inclusive, a expressão das mutantes de p53 favorecem processos como a angiogênese, migração, invasão e metástase do tumor (RIVLIN et al., 2011).

Em estudos prévios, desenvolvidos em camundongos com perda do p53 nativo, foi observado que, apesar de apresentarem com maior frequência tumores, exibiam uma proporção baixa de metástase e crescimento invasivo (ATTARDI; JACKS, 1999), quando comparado com camundongos que tinham formas mutantes do p53 (HEINLEIN et al., 2008). Em estudos *in vitro* em células que apresentavam a mesma condição observou-se comportamento similar do p53 (ADORNO et al., 2009, MULLER et al., 2009).

Considerando a análise dos aspectos descritos anteriormente e do ponto de vista da oncologia comparada, é possível que no TVT, as mutações no gene também possam impactar de forma direta o comportamento clínico, agressividade, resistência e potencial de metástases do tumor, como é observado em outros tumores, assim, é preciso indagar estes aspectos.

3.3. Resistência e agressividade tumoral mediada pela expressão dos gene da família *BCL-2*.

Proteínas da família Bcl-2 foram identificadas no TVT. STOCKMANN et al., (2011a) demonstraram que no tumor, a superexpressão do Bcl-2 é independente do

estagio de desenvolvimento. Anteriormente, FRENZEL et al., (2009) sugeriram que a superexpressão da proteína Bcl-2 promoveria a aquisição de funções no tumor associadas à progressão e a sobrevida. Da mesma forma, AMARAL et al., (2011) destacam que TVT menos agressivos têm alto índice de apoptose e podem apresentar melhor prognóstico.

Os genes *BAX* e *BCL-2* pertencem a uma mesma família acerca de 25 genes, que codificam proteínas que regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria e subdividem-se conforme a sua função e seu domínio. Suas proteínas podem ser pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bak e Bok, entre outras), anti-apoptóticas (Bcl-2 propriamente dita, Bcl-xL, e Bcl-w) entre outros (CHAO et al., 1998; MENDELSON et al., 2008, CZABOTAR et al., 2014).

A regulação de proteínas da família Bcl-2 e as interações entre os membros da mesma estão bem definidos, e muitos dos mecanismos de participação em processos fisiológicos e patológicos são conhecidos. Relata-se inclusive que membros desta família, participam em processos diferentes de apoptose (CZABOTAR et al., 2014).

Os membros da família *BCL-2* são expressos em uma grande variedade de tecidos fetais, mas em adultos está restrito a células que estão em processo de divisão rápida e diferenciação. O Bcl-2 inibe a via de apoptose, principalmente preservando a membrana mitocondrial e inibindo a oligomerização de Bax/Bak, que, ao contrário, liberariam moléculas apoptóticas (KIRKIN et al., 2003). Entretanto, Bax por sua parte é proapoptótico (CZABOTAR et al., 2014).

Desde a sua identificação em neoplasias de células B, a superexpressão do Bcl-2 vem sendo observada em diferentes tipos de tumores e linhagens celulares, tanto no homem, quanto em animais (DELFINO, 1989; FETT-CONTE; SALLES, 2002; ZHOU et al., 2012); e o envolvimento dos membros da família *BCL-2* no câncer tem sido plenamente estabelecido; além disso, sua superexpressão e ausência de regulação, foram observadas em diferentes tipos de tumores (MENDELSON et al., 2008).

Entretanto, os relatos sobre a sua participação na carcinogênese, bem como a dos membros desta família, são heterogêneos. Por um lado, a superexpressão confere a muitos tipos de células resistência a diversos estímulos apoptóticos (CZABOTAR et al., 2014), conferindo a células tumorais resistência aos fármacos e radioterapia (ZHOU et al., 2012); além de acelerar a gênese do tumor pela desregulação do *MYC* e outros oncogenes (CZABOTAR et al., 2014).

Por outro lado, superexpressão, também relaciona-se com fenótipos de baixa malignidade e prognóstico favorável (STOCKMANN et al., 2011b). Em camundongos transgênicos, a superexpressão de *BCL-2* promoveu baixa incidência de linfomas, no entanto, a perda de alguns dos membros pró-apoptóticos como o Bax, também acelerou o desenvolvimento do tumor (CZABOTAR et al., 2014).

Na atualidade, os pesquisadores baseiam-se nestes e outros achados para propor estratégias terapêuticas em diversos tumores. Por exemplo, os recentes progressos na compreensão da forma de ativação de Bax/Bak, podem facilitar o desenvolvimento de compostos que regulem sua atividade, promovendo ativação para o tratamento de câncer, ou inibindo em caso de aumento na taxa de apoptoses. (CZABOTAR et al., 2014).

Do mesmo jeito, é possível tentar modular a terapia baseados nas modificações pós-traslacionais como fosforilação e ubiquitinação que sofrem membros da família Bcl-2. Em regra, a fosforilação do Bcl-2, altera a sua conformação e incrementa a união do Bcl-2 ao BAK e BID, tornando as células mais refratárias à quimioterapia (CZABOTAR et al., 2014).

Desta forma, no TVT, pesquisar a expressão de genes e proteínas desta família, poderá trazer informação importante para a abordagem clínica do tumor, assim como servir de subsídio para novas pesquisas, tanto para TVT como para os outros tumores.

3.4. Microambiente celular e suas implicações no comportamento biológico de tumor

Desde o estabelecimento dos conceitos de neoplasia, várias investigações, têm demonstrado que além das modificações progressivas do perfil biológico, como alterações de sua capacidade proliferativa, diferenciação e sobrevida, há uma expressiva interação com o ambiente com a qual ela convive. Pode ocorrer inclusive sinalização molecular com células do próprio sistema imunológico. Dessa interação, ao invés de proteção contra as células neoplásicas, as próprias células do sistema de defesa passam a facilitar a evolução do processo neoplásico (MENDELSON et al., 2008, ÁLVARO et al., 2010).

De fato, quando se busca um comparativo entre essas informações percebe-se que as células responsáveis pela resposta imunológica, a exemplo do complexo maior de histocompatibilidade tipo II (MHC II) e plasmócitos no cão com TVT estão com suas funções reduzidas, o que favorece desde o estabelecimento, até crescimento e metástase desse tumor (GANGULY et al., 2013).

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

Na fase de regressão inicial, ocorre a infiltração do tumor por linfócitos (TILs), que estão difusamente distribuídos ou associados ao estroma conjuntivo (LIAO *et al.*, 2003; MUKARATIRWA; GRUYS, 2003), enquanto que a fase final de regressão apresenta colapso do tecido neoplásico e presença frequente de figuras apoptóticas (MUKARATIRWA; GRUYS, 2003). Segundo PÉREZ *et al.* (1998), tanto os linfócitos T, como os macrófagos e os plasmócitos produtores de anticorpos IgG, IgG2 e IgG4, participam na resposta imune eficaz contra o TVT, confirmando que a modulação do crescimento do tumor está relacionado com a resposta imune do hospedeiro.

LIAO *et al.*, (2003), demonstraram que a proporção de linfócitos B do sangue periférico diminui com o crescimento do TVT, sendo sua destruição causada por proteínas citotóxicas liberadas por células tumorais que provocam apoptose desses linfócitos na fase de progressão neoplásica. HISAO *et al.*, (2008) comprovaram que as células de TVT produzem fator de crescimento tumoral- β 1 (TGF β 1) que inibe a atividade das células natural killer (NK). O efeito supressor do TGF β 1 na atividade das células NK pode ser equilibrado pelo efeito da interleucina-6 (IL-6) secretada pelos linfócitos tumorais. A IL-6 em sinergismo com interferon- γ pode induzir a expressão de MHC in vitro pelas células do TVT (HSIAO *et al.*, 2008). Já in vivo, a IL-6 pode induzir a expressão de MHC em TVTC pela presença de IL-15 (CHOU *et al.*, 2009).

Em regra, no microambiente de tumores é possível observar a presença de fibroblastos, células inflamatórias principalmente macrófagos, componentes vasculares, (BHOWMICK e NEILSON, 2004) e matriz extracelular (MEC) (ÁLVARO *et al.*, 2010). No conjunto, todos estes componentes podem auxiliar na modulação da expressão gênica, morfologia, classificação, grau de agressividade, prognóstico do tumor e consequentemente na resposta ao protocolo terapêutico preconizado (MENDELSON *et al.*, 2008, ÁLVARO *et al.*, 2010).

De fato, grande parte desse fenômeno é observado no TVT, no entanto, não se tem conhecimento de investigações nesse sentido na literatura consultada, o que torna de extrema importância o aprofundamento nessa entidade.

O mecanismo pelos quais o microambiente participa no comportamento biológico do tumor, inclusive na metástase, é complexo, entretanto, pesquisas que utilizaram como modelo a próstata, mama e osso têm apontado para os seguintes resultados: alterações gênicas em células transformadas não são suficientes para conferir o potencial maligno das células em questão, pois dependem da expressiva contribuição do microambiente (ÁLVARO et al., 2009, ÁLVARO et al., 2010).

Do mesmo jeito, pesquisas que utilizaram órgãos do trato digestórios, tais como fígado e estômago também chegaram a conclusões semelhantes aos encontrados pelos autores acima citados. Vejamos: a inflamação crônica recorrente que tem como agente causador do processo o *Helicobacter pylori* e o vírus da hepatite C desempenham importante papel no desenvolvimento de tumores.

Em ambos os casos, os macrófagos estimulam outras células inflamatórias criando um ambiente mutagênico, pois liberam espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais alteram a função do RNA, e conseqüentemente induzem lesão no DNA, desencadeando o processo neoplásico. Além do mais, no microambiente liberam citocinas e quimiocinas que favorecem a invasão tumoral (MENDELSON et al., 2008).

3.5. Apoptose induzida pela vincristina no tratamento do TVT

A apoptose em células neoplásicas pode ser induzida por estímulos como a radiação ionizante, choque osmótico, citocinas, antígenos Fas e drogas antineoplásicas (WANG et al., 1999). Os agentes despolimerizantes e polimerizantes como é o caso da vincristina induzem apoptose por meio da desorganização dos microtúbulos. Acredita-se que o efeito da ação antimicrotúbulo é o resultado da inativação da função do gene *Bcl-2* por meio de sua fosforilação (HALDAR et al., 1995). WANG et al., (1999), demonstraram que a fosforilação de *Bcl-2* é seguida pela perda da habilidade de formar heterodímeros com Bax e, como consequência, observa-se um detrimento na formação do complexo Bcl-2/Bax.

Foi também reportado que o tratamento de células com drogas cujo alvo de ação são os microtúbulos resulta na indução de p21 e p53 (WANG et al., 1999). Porém, a apoptose mediada por drogas antimicrotúbulos é um processo muito complexo que envolve vários sinais das vias de proteína quinase (VERISSIMO et al., 2012). No

entanto, ainda não é totalmente claro o papel da fosforilação do *Bcl-2* e a interação de outras proteínas inibidas ou estimuladas por estas drogas na apoptose. Além disso, já foi demonstrado que a vincristina induz apoptose no TVT (ÖZALP et al., 2012), porém há necessidade de conhecer qual é o mecanismo envolvido (GONZÁLES et al., 2002, ÖZALP et al., 2012), e se os vinca alcalóides podem induzir resistência a quimioterapia, mediante ao aumento da expressão da glicoproteína-p, como acontece em outros tumores (BURKHART et al., 2001, SULOVA et al., 2009).

3.6. Cultura celular no TVT

A cultura de célula de vertebrados teve início no começo do século XX (ALBERTS et al., 1997, FRESHNEY, 2010). As técnicas de cultivo são úteis para a preservação e acúmulo de materiais para vários estudos e tem sido observado que as características morfológicas e biológicas são mantidas na maioria das culturas em longo prazo (MISDORP, 1990).

Os estudos de cultura têm aumentado formidavelmente o entendimento da patogênese de certas neoplasias e têm fornecido bases para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e tratamento dos tumores (ATHANASOU, 1999).

Em 1951, BLOOM et al. (apud ADAMS et al., 1968) relataram o sucesso da cultura em curto período de tempo da célula do TVT. Em 1968, ADAMS et al. mantiveram as células de TVT em culturas contínuas por mais de 18 meses; após esse período, estas células tiveram o número de cromossomos e sua distribuição semelhante aos relatados nos TVTs espontâneos. MOHANTY; RAJYA (1977) e OKAMOTO et al., (1988) verificaram que a morfologia celular do tumor mantido em cultura por 56 e 7 dias respectivamente, era semelhante à do TVT. Em 1979, BESCHORNER et al., também realizaram a cultura de células do TVT com o propósito de isolar e caracterizar fatores inibitórios e bloqueadores do tumor; finalmente nossa equipe no setor de patologia veterinária de Botucatu já realizou cultura para o tratamento *in vitro* de TVT (BASSANI-SILVA et al., 2007; MONTOYA et al., 2013b).

4. Objetivos

- Avaliar o perfil de expressão dos genes *MDR-1* (glicoproteína- P), *BCL-2*, *BAX* e *TP53* em células de TVT *in vivo* e *in vitro* (cultura primária).
- Avaliar a citotoxicidade, sobrevivência celular, apoptose e alterações no ciclo celular em cultura de células TVT submetidas ao tratamento com vincristina;
- Relacionar a expressão dos genes *MDR-1*, *TP53*, *BCL-2*, *BAX* com a resposta celular ao tratamento com a vincristina.

5. Hipóteses do estudo

A expressão dos genes *MDR-1* (glicoproteína-p) e *BCL-2* são maiores em células de TVT que apresentam maior resistência após à quimioterapia. Da mesma forma, essas células apresentam baixa expressão dos genes *TP53* e *BAX*, fatos que favorecem a resistência e malignidade do tumor.

6. Metodologia

6.1. Comitê de ética

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP e obteve parecer favorável (Protocolo nº 223/2011).

6.2. Avaliação clínica dos cães com TVT

O protocolo experimental incluiu estudo epidemiológico com base em informações obtidas dos proprietários, sobre história clínica do animal, hábitos de criação, histórico reprodutivo, contato com outros cães e densidade populacional na residência. Da mesma forma, obtidas informações sobre tratamentos prévios para a neoplasia, incluindo doses e datas de aplicação.

O tempo de evolução do processo neoplásico foi estimado pela data de início da apresentação dos sinais clínicos até o momento do diagnóstico. Além disso, foi feita avaliação física geral e exame específico da área afetada pela neoplasia, com a medição do tumor em seu ponto de maior diâmetro e a avaliação de linfonodos regionais (TNM clínico).

6.3. Animais e coleta do tumor

O tamanho da amostra populacional foi de 18 animais, machos e fêmeas de diferentes raças e idades, oriundos do Hospital Veterinário da UNESP de Botucatu. O critério de seleção, para o TVT foi a suspeita clínica e confirmação do diagnóstico pelo exame citológico, qual seja o método de punção. O tamanho da amostra populacional seguiu os critérios estabelecidos por GASPAR et al., (2009; 2010), DOHOO et al., (2010) e STOCKMAN et al., (2011a).

As preparações citológicas foram fixadas e posteriormente coradas pela técnica de Giemsa (May Grünwald Giemsa a 2%) e um mínimo de 100 células por lâminas (duas) foram analisadas por microscopia óptica de luz, em aumento de 400x, para o diagnóstico e classificação do tumor de acordo com as características do tipo celular

predominante qual seja plasmocitóide, linfocitoide o mista descritas por AMARAL et al., (2007).

Uma vez confirmado o diagnóstico do TVT e após anestesia do animal e em total assepsia do local, foi feita a coleta da amostra tumoral por biópsia incisional de fragmentos de aproximadamente 1cm³. Todas as coletas foram realizadas antes que os animais receberam à quimioterapia. As amostras foram armazenadas em solução salina e fosfatada (PBS) pH 7,4, em RNA Later (Qiagen) e formol tamponado até o processamento do material.

6.4. Imunofenotipagem

As análises imunohistoquímicas foram realizadas para a determinação do imunofenótipo dos tecidos de TVT e para posterior comparação com a imunocitoquímica das culturas celulares.

Cortes de tecido de 3μ foram colocados em lâminas histológicas carregadas (Slidotech Plus Novocastra® New castle UK), posteriormente, estes tecidos foram desparafinizados e hidratados. Depois deste processo, foi feito o desmascaramento antigênico, bloqueio da peroxidase endógena e das reações inespecíficas; seguida por três incubações, a primeira com o anticorpo primário (Tabela 1), a segunda com um anticorpo secundário universal (Universal Biotinilado DAKO K0690 ® Carpintería EU) e por fim, o complexo streptoavidina Peroxidasa (DAKO K0690® Carpintería EU).

A revelação feita com Diaminobenzidina (DAB DAKO K3468® Carpintería EU) e a Contra-coloração: com Hematoxilina de Meyer. Posteriormente realizou-se a montagem das lâminas, para a análise.

Para a análise imunocitoquímica, as lâminas contendo as células foram permeabilizadas, hidratadas, a seguir foi feito o bloqueio da peroxidase endógena e as demais etapas seguiram as mesmas já descritas para a imunohistoquímica.

Serviu de controle positivo para as células tumorais o fígado para Lisozima e Alfa-antitripsina, linfonodo para CD3 e CD79α e coração para vimentina. Por outro lado, para o controle negativo do TVT foram utilizados os órgãos já citados acima e as próprias células neoplásicas nas que foi suprimida o anticorpo primário.

Para identificar e quantificar a expressão da reação às amostras foram submetidas ao método semiquantitativo da seguinte forma: 1= < 25% de células marcadas; 2 = 26-50 % ; 3= 51-75 % e 4 = >75 %; que respectivamente foram considerados como, 1= não marcado; 2= marcação levemente; 3 = marcação moderado,

e finalmente 4 = marcação intensa; para isso, 100 células foram contadas por lâmina (AMARAL et al., 2005).

As imagens foram capturadas com o microscópio óptico Carl zeiss, LAb A1, Germany, nas objetiva 10X e 40X, utilizando o software AxioVision 4.8. Em todos os casos a avaliação imunohistoquímica foi realizada de forma independente por dois patologistas e os dados apresentados com a média das observações.

Tabela 1. Pannel de imunomarcção para a confirmação do TVT

Anticorpo	Código	Reação	Diluição	Fabricante	Tipo de anticorpo
Anti - CD79a	A045201-2	Anti-Coelho	1:100	Dako, EUA	Monoclonal
Anti - CD3	A045201-2	Anti-Camundongo	1:100	Dako, EUA	Policlonal
Anti - Lisozima	A009902-2	Anti-Coelho	1:300	Dako, EUA	Policlonal
Anti - Alfa-1-antitripsina	N153330-2	Anti-Coelho	1:300	Dako, EUA	Policlonal
Anti - Vimentina	U7034	Anti-Camundongo	1:100	DAKO, EUA	Monoclonal

6.5. Cultura primária de TVT.

Os isolamentos das culturas do TVT foram feitos de acordo com o protocolo descrito por BASSANI-SILVA *et al.*, 2007. Para tal os fragmentos de TVT foram colocados em solução salina de PBS pH 7,4 e levados ao Laboratório de Fertilização *in vitro* e Cultivo Celular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP Campus Botucatu.

Nesse local, foram transferidos para uma solução de tripsina (TrypLE Select – Invitrogen 12563-029) a 37,5°C, onde foram mantidos por 60 minutos com homogenizador magnético. Feito isso, a solução foi centrifugada descartando-se o sobrenadante, ressuspensando o *pellet* e acondicionado em frascos de 25 cm² (Sarstedt – 83.1810.300) com 5 mL de meio de cultivo DMEM alta glicose (Dulbecco's modifield essential medium - Gibco 11995- 065), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco 12657- 029), e com a combinação de 100U/mL de penicilina com 100mg/mL estreptomicina (Gibco 15140) e 3µg/mL de Anfotericina B (Gibco 15290).

Posteriormente, 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 e as células ressuspensas em meio de cultivo DMEM alta glicose (Dulbecco's modified essential medium - Gibco 11995- 065).

Vale salientar que para conferir as células como sendo de TVT, estas foram submetidas à técnica de imunocitoquímica, além de serem selecionadas 5 aleatoriamente para análise citogenética no Laboratório de Genética Animal do Instituto de Biociências Unesp-Botucatu.

6.6. Passagens celulares

Para as passagens dos cultivos em novos frascos (25 cm²), foram semeadas 1x10⁶. Para tanto, inicialmente foi feita a tripsinização das células contidas nos frascos. Retirado todo meio de cultivo, foram lavadas com solução de PBS pH 7,2 e em seguida adicionados 1mL de tripsina TrypLE Select (Invitrogen 12563-029) aquecida a 37,5°C.

Posteriormente os frascos foram mantidos em estufa a 37,5°C por no máximo 5 minutos até que houvesse a ação da enzima e todas as células se soltassem do fundo do frasco. Após isto, realizou-se a neutralização com meio DMEM alta glicose acrescido de 20% de SFB (Gibco 12657- 029), Penicilina, Estreptomicina (Gibco 15140) e Anfotericina-B (Gibco 15290) e as células foram transferidas a novos frascos.

6.7. Contagem celular

Após tripsinização das células, preencheu-se a Câmara de Neubauer com estas, posteriormente com auxílio do microscópio Leica® DM IRB foi possível individualizar células viáveis e feitas as contagens.

6.8. Criopreservação dos cultivos

Para criopreservação destes cultivos, foi efetuado o procedimento de tripsinização, contagem e posteriormente ajustado o número de 1x10⁶ células por mL. Em seguida utilizando solução com 10% de dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma C6164), 20% SFB e 70% de DMEM alta glicose com Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina-B. O material obtido foi distribuído homogeneamente e acondicionado em criotubos (Sarstedt 72.694.006), por 24h em Freezer -80°C e em seguida colocados e mantidos em botijão criogênico (-196°C).

6.9. Curva de crescimento

Para determinar a curva de crescimento do TVT, as células foram tripsinizadas e diluídas a uma concentração de 2 x 10⁴ células/mL e semeadas em placas de 6 poços (costar). Foram novamente incubadas por 24 horas, quando novamente tripsinizadas e

contadas em câmara de Neubauer. Posteriormente, as células foram amostradas a cada 24 horas até que alcançaram fase de *plateau*.

6.1.1. Concentração da vincristina e curva de crescimento para os tratamentos

Inicialmente foi obtida a curva padrão de crescimento celular através da avaliação das células cultivadas em placas de 96 poços (Costar) sem aplicação do tratamento e incubadas com 200 µl de meio de cultura por 24 h a 37⁰c em 5% de CO₂. O cultivo celular foi realizado em uma sequência de 2x10³, 3x10³, 5x10³, 6x10³ células por poço, sendo cada concentração de células adicionada em 3 cavidades (triplicata).

Posteriormente o meio foi removido e substituído por 200 µl de outro enriquecido por sulfato de vincristina (Sigma-Aldrich) em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1,0 µM.L⁻¹), de forma aproximar às doses terapêuticas em estudos *“in vitro”* (DIXON et al., 1969; TANAKA et al., 2013) e às dose de pesquisas prévias que utilizaram a mesma droga (JACKSON e BENDER., 1979; MUJAGIC et al., 1983; JORDAN et al., 1991, GALÁN et al., 2012).

Conforme o peso molecular da vincristina (923,04 molar), as concentrações do composto-teste utilizadas foram 0,023 µmol.L⁻¹; 0,046µmol.L⁻¹; 0,092 µmol.L⁻¹. As análises de inibição do crescimento das culturas foram mesuradas 6,12, 24, 48 e 72 horas após a exposição ao composto teste. Para fidelidade do teste, vale ressaltar que todos os experimentos foram feitos em triplicata.

6.1.2. Testes de citotoxicidade e sobrevivência celular

Para avaliação da citotoxicidade e sobrevivência celular (5 dias) foi utilizado o *Cell Proliferation kit II* (XTT) (ROCHE). Este *kit* baseia-se na clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas (viáveis) formando uma tonalidade alaranjada. A absorbância do corante foi lida em aparelho de ELISA, Spectra Count, comprimento de onda em 450 nm e 690 nm, sendo o resultado proporcional ao número de células viáveis na amostra testada.

Para ambos os testes, as células foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações de vincristina 24 h após o cultivo, de acordo com o padrão de crescimento das células de TVT.

Foram semeadas 5×10^3 para o teste de citotoxicidade e $1,5 \times 10^3$ para o de sobrevivência celular de 5 dias (para evitar que as células entrem em confluência antes dos 5 dias).

As concentrações do composto foram adicionadas nos poços. Para o controle negativo, as células foram crescidas na ausência de qualquer composto. Também foram adicionadas em algumas cavidades somente meio de cultura (Branco) e em outras adicionadas o composto teste e meio de cultura que se denominou de Branco do composto. Em ambas as cavidades não foram colocadas as células.

Para o teste de citotoxicidade, logo após, os tratamentos com o composto-teste, as células foram lavadas com solução de Hanks 1X (0.4 g KCl, 0.06 g KH_2PO_4 , 0.04 g Na_2HPO_4 , 0.35 g NaHCO_3 , 1 g glucose e 8 g NaCl in 1 L·H₂O) e adicionado 180 µl de DEM sem fenol vermelho (Invitrogen 21041025) e 20 µl de XTT. E foi novamente incubadas por 2 h a 37°C em 5% de CO₂, posteriormente, o meio com o XTT foi retirado e levado para a leitura.

Para o teste de sobrevivência celular, após tratamento, as células foram lavadas em solução de Hanks 1X, o meio de cultura trocado e novamente incubadas a 37°C por cinco dias. Após esse período, feita a incubação com o *kit* XTT da mesma maneira já descrita para o teste de citotoxicidade.

A leitura da absorbância dos cristais de formazana é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. Desta forma, em seguida os resultados obtidos foram normalizados conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{\text{Absorbância das Células das amostras} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância de Células Controle} - \text{Absorbância do Branco}} \times 100$$

6.1.3. Avaliação do ciclo celular e apoptose

O efeito da vincristina sobre a apoptose e o ciclo celular em células de TVT, foi avaliado em citômetro de fluxo Guava easyCyte (Millipore).

Para ambos os testes, 2×10^5 células foram semeadas em placas de 6 poços, 24 horas após, as células foram tratadas com três diferentes concentrações de vincristina, e 48 horas após, foram lavadas com solução Hanks (0.4 g KCl, 0.06 g KH_2PO_4 , 0.04 g Na_2HPO_4 , 0.35 g NaHCO_3 , 1 g glucose e 8 g NaCl in 1 L·H₂O) e as células foram descoladas com tripsiniza e ressuspensas em novo médio.

Para avaliar o ciclo, as células foram centrifugadas a 1500 rpm x 10 min; e o pellet foi ressuspensionado em 200 µl de HSF (50 µg de iodeto de propídeo, 0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100), armazenadas em gelo e protegidas da luz por 30 minutos; a porcentagem de Células em G0/G1, S, G2/M foi medido utilizando o software GUAVA cytosoft version 4.2.1.

Para a apoptose as células foram ressuspensionadas em 100µl kit Guava nexin reagente (Merck Millipore), protegidas da luz por 20 minutos e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo. A anexina V foi utilizada para identificar a externalização na membrana da célula da fosfatidilserina e o 7-ADD como um indicador de integridade da membrana celular. A análise foi realizada a partir do Guava System software. Foram analisadas 5000 células por amostra.

O *status* celular foi definido como: células não coradas - viáveis; células coradas somente com anexina - apoptose inicial; células coradas com anexina e 7-AAD - apoptose tardia e células coradas somente com 7-AAD - necrose. Todas as análises foram feitas em triplicata.

6.1.4. Congelamento das amostras para RT-qPCR

As amostras tumorais e as obtidas via cultura foram armazenadas e mantidas em botijão criogênico e (-196°C) até seu processamento para RT- qPCR.

6.1.5. Extração de RNA

Para a extração de RNA foi utilizado o *kit RNeasy Mini* (Qiagen), segundo instruções do fabricante. Posterior a purificação do RNA, o mesmo foi tratado com RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA) por 30 min a 37 °C para evitar resultados falso positivos oriunda da amplificação de DNA genômico.

A qualidade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio; a quantidade foi analisada em equipamento NanoVue (GE Healthcare). As amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

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

A síntese de cDNA foi feita utilizando-se o *kit High Capacity* (Applied Biosystems) e foi confeccionado a partir de 1 µg de RNA. A reação foi realizada com 6 µL de Random Primer (10x), 6 µL de RT buffer (10x), 2,5 µL dNTPs (25x), 3 µL do Multiscribe (50u /mL) e H₂O RNase free, de acordo com o protocolo do fabricante. A reação foi incubada a 25°C por 10 min, posteriormente a 37°C por 120 min e, então, permaneceu a 4°C. As amostras foram mantidas a temperatura de - 20°C.

As etapas de PCR foram realizadas em termociclador automático (ABI Prism 7500 FAST Sequence Detection System, Applied Biosystems). Para a amplificação das sequências dos *primers* detalhados na tabela 2. O SYBR Green e o *PCR Master Mix* universal (Promega, USA) foram utilizados segundo instruções do fabricante.

6.1.7. Quantificação por RT- qPCR.

A reação da qPCR consistiu de 4 µL de cDNA da amostra, 200 nM de cada *primer*, 10 µL GoTaq *qPCR Master Mix* (Promega, USA) e água nuclease free perfazendo um volume final de 20 µL.

As condições da reação para todos os genes foram: uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguindo de 40 ciclos de amplificação (95 °C por 15 s desnaturação, 60 °C por 1 min para anelamento e extensão) e a curva de dissociação (95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s and 95 °C por 15 s). Como controle negativo utilizou-se água nuclease free no lugar da amostra. A curva estándar relativa para cada gene foi gerada utilizando de diluições seriadas do cDNA de uma amostra considerado referência. A menor diluição do padrão foi considerada valor relativo de 100 e, seguindo de diluições seriadas 1/10, os 3 pontos foram 10, 1, 0.1.

A concentração relativa dos genes estudados foi normalizada conforme LARIONOV et al., 2005, através do controle endógeno mais estável dentre os três endógenos testados (RPS5, RPS19 e ACTB). Todas as reações foram feitas em duplicata.

Considerou-se como diminuição da expressão o valor de $QR < 0,5$ e como aumento de expressão o valor de $QR > 2,00$.

Tabela 2. Sense e Antisense dos genes utilizados na RT- qPCR

Gene	Sense	Antisense
BAX ¹	GGTTGTTGCCCTCCTCTACT	GTAAGCACTCCAGCCACAAA
BCL-2 ²	TGGATGACTGAGTAGCTGAA	GGCCTACTGACTTCACTTAT
TP53 ²	CGCAAAGAAGAAGCCACTA	TCCACTCTGGGCATCCTT
MDR-1 ³	CAGTGGTTCAGGTGGCCCT	CGAACTGTAGACAAACGATGAGCT
RPS5 ⁴	GAGGCGTCAGGCTGTCGAT	AGCCAAATGGCCTGATTAC
RPS19 ⁴	GGGTCCTCCAAGCCCTAGAG	CGGCCCCCATCTTGGT
ACTB ⁴	GGCATCCTGACCCTCAAGTA	CTTCTCCATGTCGTCCCAGT

¹ SANO et al., 2005.

² KLOPFLEISCH et al., 2009.

³ CULMSEE et al., 2004.

⁴ BRINKHOF et al., 2006.

7. Análise estatística

Para a análise dos resultados, foi utilizada a estatística descritiva. Os resultados obtidos dos ensaios *in vitro* foram expressos como média da porcentagem $\pm$ desvio padrão e comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunns. Para as análises da expressão genica o teste de ANOVA foi utilizado, seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey (PAGANO & GAUVREAU, 2004), utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

8. Resultados

8.1. Dados epidemiológicos e clínicos dos animais.

Em total, foram coletadas amostras de 18 TVTs, provenientes de cães de Botucatu e cidades vizinhas, que abrange o Hospital Veterinário da FMVZ UNESP-Botucatu. Maiores detalhes sobre os animais encontram-se na Tabela 3 e Figura 1.

O exame citológico do tumor permitiu diagnosticar e classificá-los, quanto à morfologia. Nesse caso, só foi identificado o plasmocitóide. Por outro lado, o histopatológico permitiu classificá-los em diferentes estados de evolução. Para tanto, foi utilizado a relação entre a celularidade e quantidade de fibroblastos. Tabela 3.

A avaliação clínica do tumor pelo TNM refletiu em diferentes respostas ao protocolo terapêutico tradicional, pois, houve lesões que apresentaram desde redução parcial até total, inclusive com aumento no número de aplicações ou procedimento cirúrgico. Tabela 3.

8.2. Macroscopia dos tumores

Os tumores apresentavam-se como lesões tradicionais, únicas ou múltiplas, por vezes multilobuladas, com aspecto de couve-flor, aderidos ou pedunculados. Os tumores apresentavam tamanhos variados e consistência relativamente firme, além de intenso sangramento. A coloração variou desde róseo-claro ao vermelho intenso, Figura 1.

Tabela 3. Dados Clínicos dos pacientes atendidos no Hospital Veterinário da UNESP

Animal	Sexo	Idade anos	Raça	Localização massa	Classificação	Fase	Resposta Tratamento	Isolamento cultura
1	M	9	SRD	Pênis	P	Regressão inicial	R	
2	F	9	Teckel	Vagina	P	Progressão	RC	
3	M	7	SRD	Pênis	P	Regressão	RC	*
4	M	9	SRD	Pênis	P	Regressão	RC	
5	M	-	SRD	Pele-Pênis	P	Progressão	RC	
6	M	10	SRD	Pênis	P	Progressão	RC	
7	M	-	SRD	Pênis	P	Progressão	RC	
8	F	10	SRD	Vagina	P	Progressão	RP	*
9	M	5	SRD	Pênis, Pele	P	Regressão inicial	RP	*
10	M	6	SRD	Pênis	P	Progressão	RC	
11	M	-	SRD	Pênis	P	Progressão	R	
12	M	8	Poodle	Gengiva	P	Progressão	RC	*
13	M	10	SRD	Pênis	P	Progressão	RC	
14	M	10	SRD	Pênis	P	Progressão	RC	*
15	M	16	SRD	Pênis	P	Progressão	RC	*
16	M	6	Bull terrier	Pênis	P	Progressão	RC	*
17	M	-	SRD	Pênis	P	Progressão	RC	
18	M	-	SRD	Pênis	P	Progressão	RC	*

SRD= Sem raça definida, P= morfologia Plamocitóide, R=resistente, RC=Resposta Completa, RP= Resposta Parcial * Culturas isoladas TVT.



Figura 1. Tumor Venéreo Transmissível Canino. Cão, French Poodle, 8 anos de idade. Massa avermelha, localizada na gengiva (seta), forma atípica do tumor.

8.3. Imunohistoquímica em tecidos de TVT.

Os TVTs apresentaram imunorreatividade intensa para vimentina, superior a 90% das células. Para lisozima o total de tecidos marcados foi de 78 %; de forma leve 28 % e moderada em 50%. Para alfa-antitripsina, 55% dos tecidos apresentaram marcação leve. Por fim, obteve-se marcação negativa para CD3, CD79 α , Figuras 2: de A até D; Gráfico 1.

8.4. Isolamento e caracterização da cultura primária de TVT

Do total de TVTs coletados, foram isolados 8 tumores (Figura 3), após o estabelecimento da subcultura as células foram caracterizadas conforme segue:

8.5. Imonofenotipagem de células do TVT.

As células apresentaram marcação positiva para lisozima, alfa-antitripsina, vimentina e negativa para CD3 e CD79 α . Figura 4: de A até D.

8.6. Citogenética dos cultivos primários

Do total de oito culturas analisadas, cinco foram selecionadas para contagem do número de cromossomos. Todas as células apresentaram número variável, de 56 a 70. Nenhum deles exibiu número igual às células somáticas do cão, conforme, demonstrada na Figura 5.

8.7. Curva de crescimento

As culturas de células foram identificadas em 3, 8, 9, 12, 14, 15, 16, 18. Posteriormente foram estabelecidas nas placas de 6 poços e amostradas a cada 24 horas até que alcançaram fase de *plateau* que ocorreu ao final do dia dez após o estabelecimento. Tabela. 4. As células apresentaram morfologia que variou de oval a fusiforme, e crescimento variável. Observou-se diferença estatística, nas taxas de crescimento entre as culturas 3, 9, 12, 15 e 16 em relação à célula 8 ($P < 0,05$) Figuras 3 e 4, Gráfico 2.

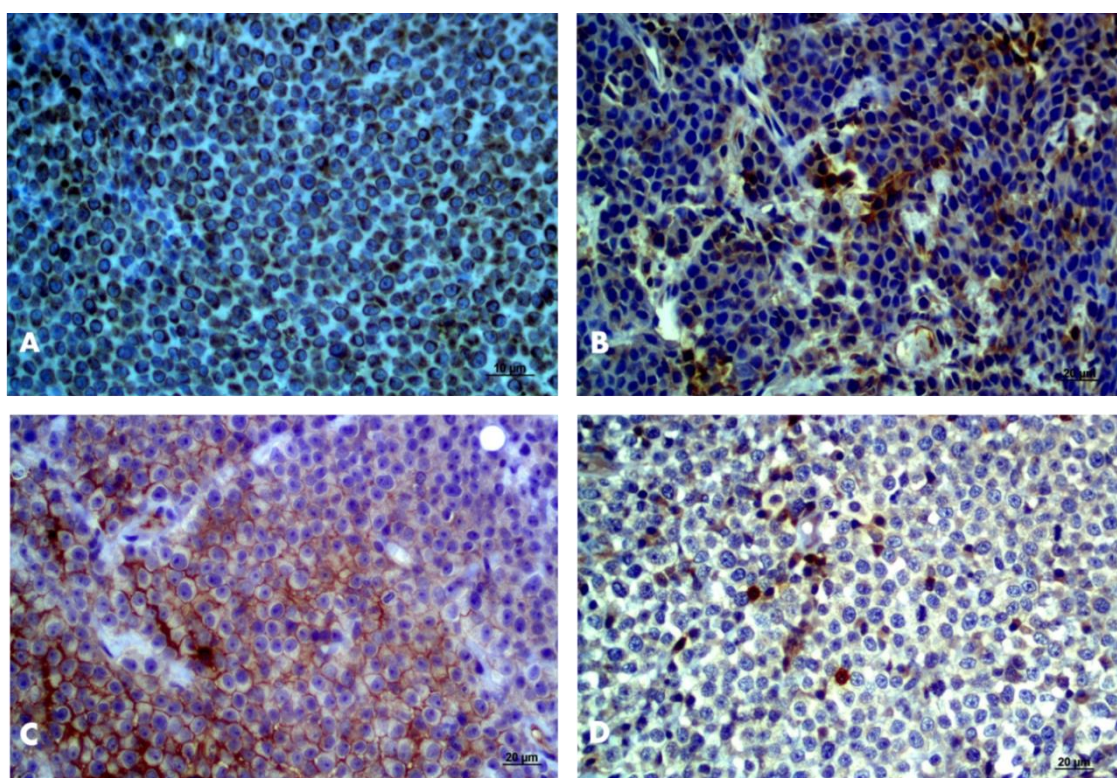


Fig 2. Marcação imunohistoquímica em tecido de TVT. **A.** Positivo para anti-vimentina, superior a 90% das células marcadas. 20x, bar 10 μm . **B.** Moderada positividade para anti-lisozima. 40x, bar 20 μm . **C.** Modera positividade para anti-alfa-antitripsina. 40x, bar 20 μm . **D.** Ausencia de positividade das células tumorais para CD3, note-se a marcação de linfócitos infiltrantes, Obj 40x, bar 20 μm . Cromógeno 3'3 diaminobenzidina (DAB), contracoloração nuclear com hematoxilina de Harris.

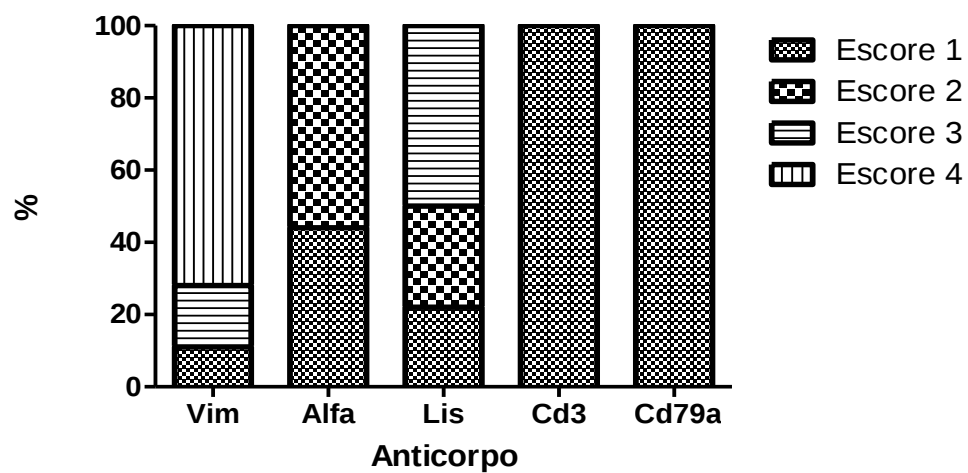


Gráfico 1. Distribuição da marcação para o painel de anticorpos utilizados para caracterizar tecidos de TVT.

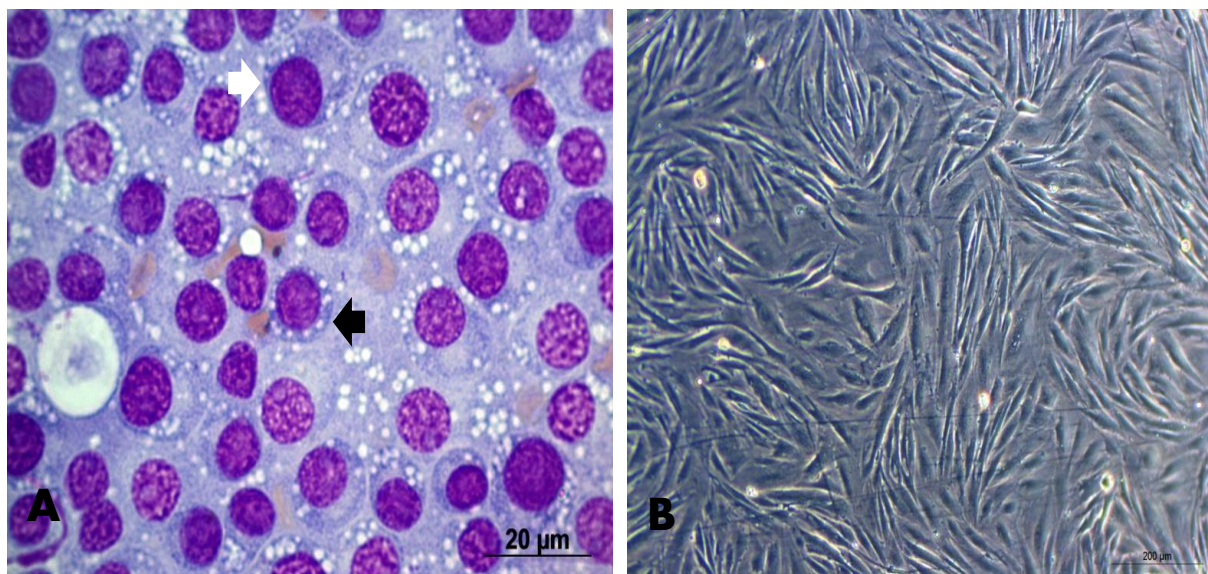


Fig 3. Isolamento de células de TVT. **A.** Obj 40x. citologia em TVT, padrão linfocitóide (células redondas, citoplasma escasso e alta relação núcleo:citoplasma) seta preta. Padrão plasmocitóide (células ovóides, citoplasma amplo e núcleo excêntrico) seta branca. **D.** Cultura celular de TVT, terceira *passagem*, forma que varia de fusiforme a oval. bar 200µm.

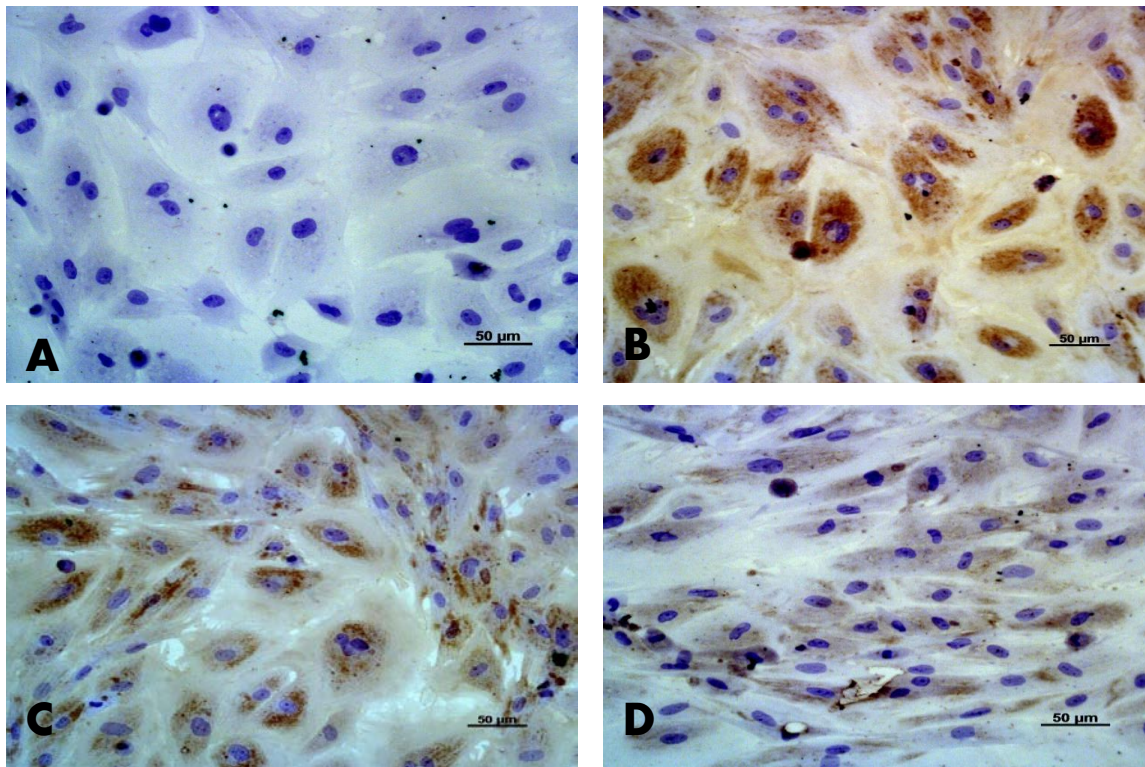


Fig 4. Caracterização fenotípica da culturas primarias de TVT. **A.** Obj 20x culturas de células de TVT. **CD3 (-)**, **B.** Obj 20x, **Lisozima (+)**, **C.** Obj 20x, **vimentina (+)**. **D.** Obj 20x, **alfa antitripsina (+)**. cromógeno 3'3 diaminobenzidina (DAB), contracoloração nuclear com hematoxilina de Harris. bar 50µm.

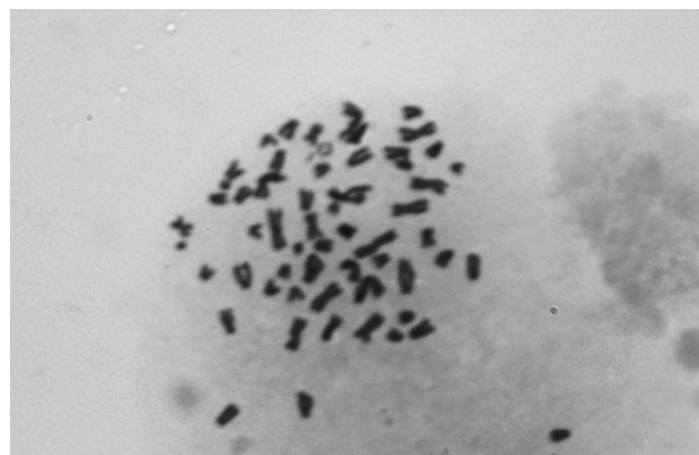
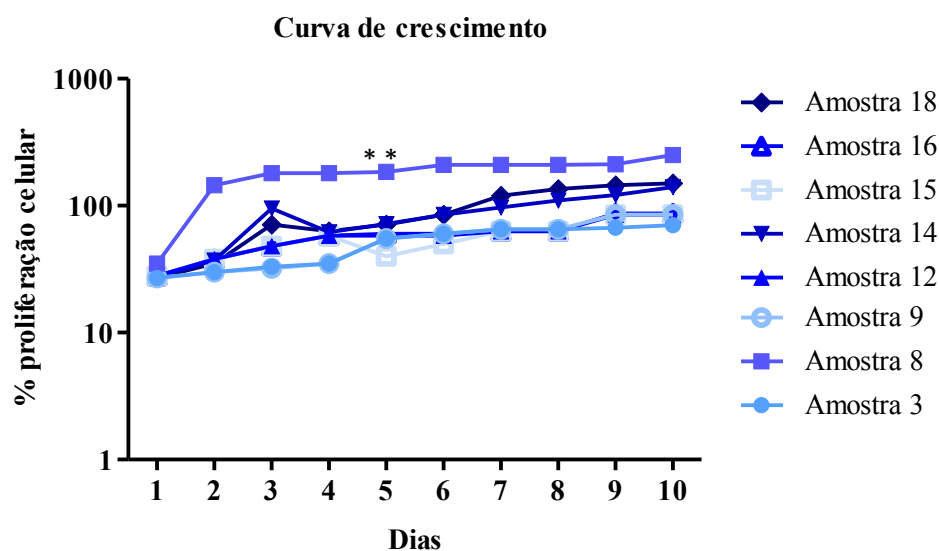


Fig. 5. Cariótipo de culturas de TVT. Metáfases em cultura de células de TVT. 56 foi a contagem do número de cromossomos, inferior a 78 das células somáticas do cão.

Tablea 4. Taxas de crescimento celular durante 10 dias em diferentes culturas de TVT.

Dia	Célula (Taxa de crescimento x 10 ³)							
	3	8	9	12	14	15	16	18
0	20	20	20	20	20	20	20	20
1	27	35	27	28	24	28	28	25
2	30	145	30	38	27	38	38	27
3	33	180	32	48	55	48	48	54
4	35	180	35	58	62	58	58	63
5	55	185	55	58	72	40	60	71
6	60	210	60	58	85	50	60	85
7	65	210	65	63	97	63	63	120
8	65	210	65	63	110	63	63	135
9	67	212	85	85	121	85	87	145
10	70	250	85	85	140	85	87	150

**Gráfico 2.** Crescimento de culturas de TVT durante 10 dias (escala logarítmica). A célula 8 apresentou crescimento estatisticamente diferente ******($P<0,05$) em relação as células 3. 9.12.15 e 16.

8.8. Concentração celular para os testes de citotoxicidade.

Através do teste de padrão de crescimento celular em placas de 96 poços, constatou-se que a melhor concentração para a realização dos testes citotoxicidade foi 5×10^3 células, 24 h após o cultivo. Vale ressaltar que para a obtenção da curva de viabilidade, as células plaqueadas foram submetidas à avaliação através do ensaio com XTT nos períodos de 6h, 12h, 24h e 72 horas.

8.9. Citotoxicidade e Sobrevivência em células de TVT.

Para as análises de citotoxicidade e sobrevivência, os resultados obtidos foram comparados entre células com e sem tratamento.

Para a prova de citotoxicidade, os resultados revelaram citotoxicidade maior e altamente significativa nas células tratadas 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M ($p < 0,01$) quando se comparou com o controle. Por outro lado, quando a comparação foi realizada entre os tratamentos, houve maior citotoxicidade no tratamento 1 μ M respeito do 0,25 μ M ($p < 0,05$). Quando analisadas individualmente foi observado, significativamente ($p < 0,05$) menor porcentagem de citotoxicidade nas células 12 e 18 frente à 16. (Tabela. 5; Gráfico 3; Figura. 6).

Das análises de sobrevivência, foi menor e altamente significativa nas células tratadas ($p < 0,01$), e não houve diferença entre células ($p > 0,05$) (Tabela 5; Gráfico 4).

Tabela 5. Porcentagem de viabilidade (citotoxicidade) e sobrevivência em células de TVT após o tratamento com vincristina.

Teste	Controle	0,25 μ M	0,5 μ M	1 μ M
% células viáveis (citotoxicidade)	100 ^a	55,3 $\pm$ 14 ^b	48,1 $\pm$ 18 ^{b,c}	39,8 $\pm$ 17 ^c
% Sobrevivência	100 ^a	40,7 $\pm$ 16 ^b	35,8 $\pm$ 18 ^b	33,5 $\pm$ 17 ^b

Dados expressos em media $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística a,b ($p < 0,01$); b,c ($p < 0,05$).

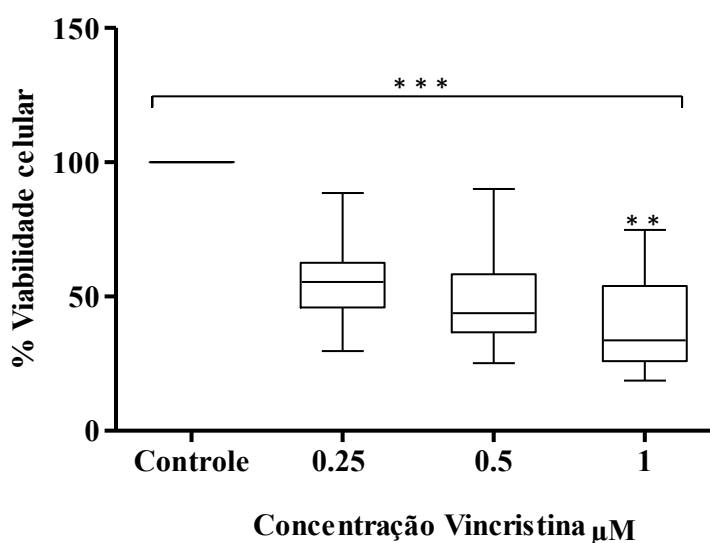


Gráfico 3. Porcentagem de células de TVT viáveis após 24 horas de tratamento com vincristina. Destaca-se a diferença estatística entre o controle e os tratamentos ***($p < 0,01$); entre o 0,25 μ M e 0,5 μ M **($p < 0,05$).

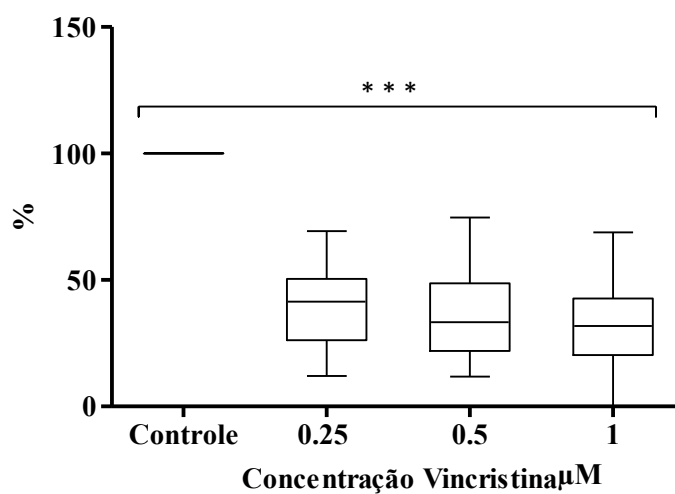


Gráfico 4. Porcentagem de sobrevivência de células de TVT, cinco dias após o tratamento com Vincristina. Detalha-se a diferença estatística entre o controle e os tratamentos ***($p < 0,01$).

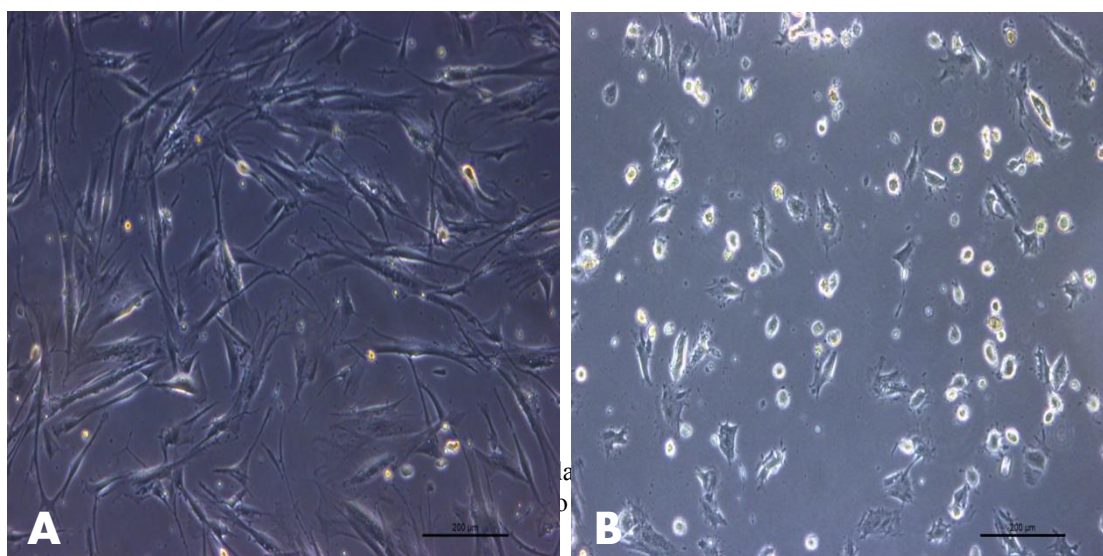


Figura 6. Células de TVT após tratamento com vincristina. **A.** Obj 10x células de TVT control. **B.** Obj 10x célula de TVT 48 horas após tratamento com vincristina; bar 200µm.

8.1.1. Apoptose

Para a avaliação da apoptose, os resultados foram comparados entre células com e sem o tratamento (grupos). Nesse caso os parâmetros avaliados foram células viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose, não foram verificadas diferenças dentre estes ($p > 0,05$) (Tabela. 6).

Tabela 6. Porcentagem de células de TVT viáveis, em apoptose e necrose após o tratamento com vincristina.

Estado da Célula	Controle	0,25 μ M	0,5 μ M	1 μ M
Viáveis	80,96 $\pm$ 10,57	72,41 $\pm$ 15,41	73,80 $\pm$ 16,08	69,60 $\pm$ 22,17
Apoptose inicial	12,17 $\pm$ 10,02	19,10 $\pm$ 15,82	18,83 $\pm$ 17,11	18,53 $\pm$ 18,54
Apoptose tardio	5,37 $\pm$ 3,46	6,56 $\pm$ 3,85	5,19 $\pm$ 2,46	8,26 $\pm$ 11,79
Necrose	1,5 $\pm$ 2,32	1,92 $\pm$ 2,61	2,17 $\pm$ 3,12	3,56 $\pm$ 4,83

Dados expressos em media $\pm$ desvio padrão. As comparações estatísticas não evidenciaram diferença ($p>0,05$).

8.1.2. Ciclo celular

Para a avaliação do ciclo celular, os resultados foram comparados entre células com e sem o tratamento (grupos). Para tanto, levou-se em consideração as fases do ciclo celular, G1, G2, S, Sub G1.

As análises evidenciaram decréscimo significativo nas fases G1 e S de células tratadas. Na G1 em todos os tratamentos e na S apenas no T3 (1 μ M), respectivamente ($p<0,01$), ($p<0,05$).

Na fase sub G1 houve um incremento significativo ($p<0,01$) nas células que foram tratadas e também se detalhou diferença entre T3 em relação ao T1 ($p<0,05$). Por outro lado, não houve diferença na fase G2 em nenhum dos tratamentos ($p>0,05$), (Tabela 7).

Tabela 7. Cinética do ciclo celular em células de TVT 48 horas após o tratamento com vincristina.

Estado da Célula	Controle	0,25 μ M	0,5 μ M	1 μ M
G1 (%)	63,7 $\pm$ 15,17 ^a	43,39 $\pm$ 15,8 ^b	41,94 $\pm$ 16,74 ^b	39,50 $\pm$ 14,69 ^b
S(%)	2,9 $\pm$ 1,51 ^a	2,15 $\pm$ 0,69 ^{ab}	2,4 $\pm$ 1,07 ^{ab}	1,67 $\pm$ 0,6 ^b
G2 (%)	19,98 $\pm$ 12,08 ^a	23,28 $\pm$ 11,94 ^a	19,07 $\pm$ 7,74 ^a	16,34 $\pm$ 7,59 ^a
Sub G1 (%)	13,42 $\pm$ 7,91 ^a	31,17 $\pm$ 13,52 ^b	36,59 $\pm$ 15,17 ^{bc}	42,49 $\pm$ 17,29 ^c

Dados expressos em media $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes evidenciam diferença ($p<0,05$).

8.1.3. Expressão gênica

Do total de 18 tecidos do tumor se obteve expressão gênica de RNAm em apenas 13 amostras. Em gel de agarose, elas apresentaram boa integridade do RNA ribossômico 18s e 28s. Os valores numéricos referentes à análise pela RT-qPCR dos genes estão apresentados nas Tabelas 8 e 9.

As análises do gene *MDR-1* revelou expressão elevada (QR = 2,19 a 4,48) da célula 15, tanto aquelas que receberam tratamento bem como o controle, já no grupo da célula 12, somente aqueles que receberam tratamento, e no grupo de célula 9, o controle, T1 e T2. Apresentaram diminuição da expressão (QR= 0,006 a 0,1), todos os

grupos das células 3, 14 e 16 e o grupo controle da célula 8. Sendo que as demais células apresentaram expressão normal. Encontrou-se diferença estatística entre células que receberam tratamento e os controles ($p < 0,05$), porém não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, e entre células e tecidos ($p > 0,05$) (Gráfico 5 e 9).

Nas análises do *TP53*, apresentaram expressão normal todos os grupos da célula 12. Das células 14, as que receberam os tratamentos T2 e T3, e nas células 3 e 15 só aquelas que receberam o tratamento T2. Finalmente apresentaram elevada expressão (QR= 2,1 a 4,1) os demais grupos de células.

Já no que diz respeito aos tecidos, o tumor 1 e 2 apresentaram baixa expressão. Os demais apresentaram alto nível de expressão (QR= 2,7 a 7,6). As análises estatísticas não evidenciaram diferenças significativas entre grupos com e sem tratamento, entre células e tecidos ($P > 0,05$) (Gráfico 6 e 9).

Para *BAX* o controle, T1 e T2 das células 18, o T1 da célula 14 e o T2 da célula 3, apresentaram baixa expressão (QR= 0,05 a 0,49). Enquanto que os demais grupos apresentaram expressão normal. Em relação aos tecidos, 6 apresentaram expressão elevada (QR= 2,3 a 3,7), sendo que os demais tiveram expressão normal. As análises estatísticas não evidenciaram diferenças entre grupos, com e sem tratamento, entre células e tecidos ($P > 0,05$) (Gráfico 7 e 9)..

No que diz respeito ao gene *BCL-2* só o controle da célula 15 apresentou expressão elevada (QR= 2,5). Apresentaram baixa expressão (QR= 0,03 a 0,46) todos os grupos da célula 18 e 14. Todos os tratamentos das células 16, os tratamentos T2 e T3 das células 3, 8, e finalmente, o T3 da célula 9. Nas demais, foi observada expressão normal. Quanto aos tecidos, apenas um se mostrou com expressão elevada (QR=2,3), e em três, baixa expressão (QR= 0,44 a 0,46). As análises estatísticas não evidenciaram diferenças entre grupos, com e sem tratamento, entre células e tecidos ($P > 0,05$) (Gráfico 8 e 9).

Tabela 8. Valores numéricos (QR) referentes à análise de RT-qPCR para os genes *MDR-1*, *TP53*, *BAX*, *BCL-2* em amostras de cultura de TVT.

Célula	Tratamento	<i>MDR1</i>	<i>TP53</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>
3	0	0,01	3,18	0,89	0,71
3	0,25µM	0,04	2,38	0,72	0,62
3	0,5µM	0,02	2,00	0,49	0,45
3	1µM	0,02	2,40	0,88	0,33
8	0	0,20	2,47	0,84	1,64
8	0,25µM	0,79	2,55	0,66	0,54
8	0,5µM	0,86	2,71	1,05	0,49
8	1µM	1,14	2,91	1,18	0,43
9	0	2,20	3,56	0,80	0,89
9	0,25µM	2,80	3,22	0,66	0,59
9	0,5µM	2,43	4,10	0,82	0,51
9	1µM	1,89	3,36	0,66	0,29
12	0	1,66	2,39	0,66	1,39
12	0,25µM	3,40	1,93	0,66	1,89
12	0,5µM	3,04	1,42	0,74	1,13
12	1µM	3,98	1,54	0,59	1,60
14	0	0,03	2,17	0,56	0,32
14	0,25µM	0,14	0,00	0,31	0,32
14	0,5µM	0,11	1,06	0,16	0,12
14	1µM	0,18	1,29	0,17	0,17
15	0	2,84	2,84	1,22	2,58
15	0,25µM	4,24	2,47	1,13	1,66
15	0,5µM	4,48	1,58	0,50	0,66
15	1µM	2,89	2,42	0,99	1,27
16	0	0,12	2,70	0,90	0,77
16	0,25µM	0,08	2,97	1,06	0,46
16	0,5µM	0,08	4,06	1,53	0,42
16	1µM	0,09	2,64	0,92	0,32
18	0	0,58	3,18	0,05	0,09
18	0,25µM	0,71	3,79	0,32	0,04
18	0,5µM	0,98	4,09	0,45	0,19
18	1µM	1,15	3,87	0,91	0,27

Tabela 9. Valores numéricos (QR) referentes à análise de RT-qPCR para os genes *MDR-1*, *TP53*, *BAX*, *BCL-2* em amostras de tecidos de TVT.

Amostra	MDR-1	TP53	BAX	BCL-2
1	0,31	0	1,03	0
2	0	0,215	0	0
3	0,47	5,247	2,38	1,84
5	0,03	3,86	1,65	0,44
8	0,02	2,94	1,29	0,44
9	0,06	7,69	2,84	1,91
10	0,06	3,25	2,00	0,46
11	0,06	4,11	0,93	0,533
13	0,07	3,23	1,67	0,82
14	0,03	6,63	2,59	1,04
15	0,039	7,48	3,79	1,12
16	0,115	4,72	3,11	2,32
17	0,036	2,75	2,85	0,88

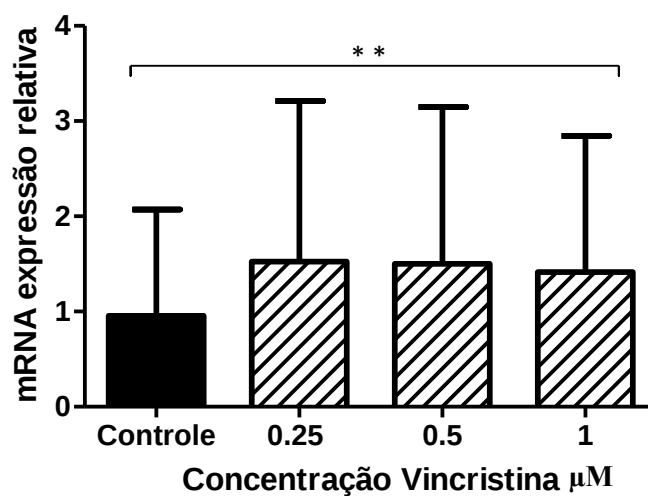


Gráfico 5. Expressão relativa de RNAm de *MDR-1* em células de TVT após tratamento com vincristina, Controle endógeno RPS5 e RPS19. Evidência de diferença estatística entre células tratadas e controle $p < 0,05$.

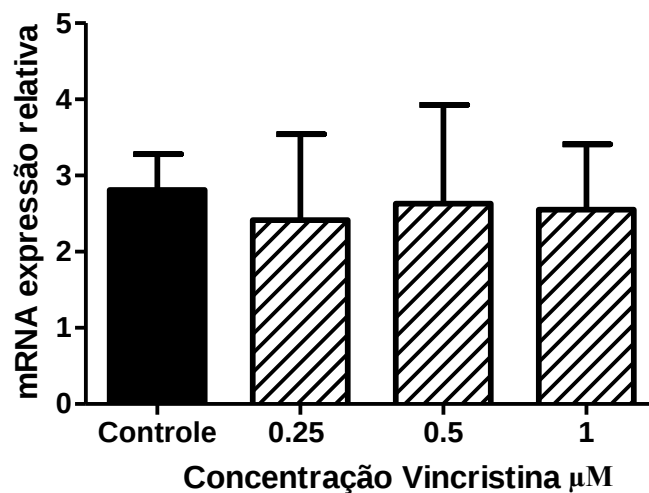


Gráfico 6. Expressão relativa de RNAm TP53 em células de TVT após tratamento com vincristina, Controle endógeno RPS5 e RPS19. Não houve evidência de diferença estatística entre células tratadas e controle $p>0,05$. Concentração Vincristina

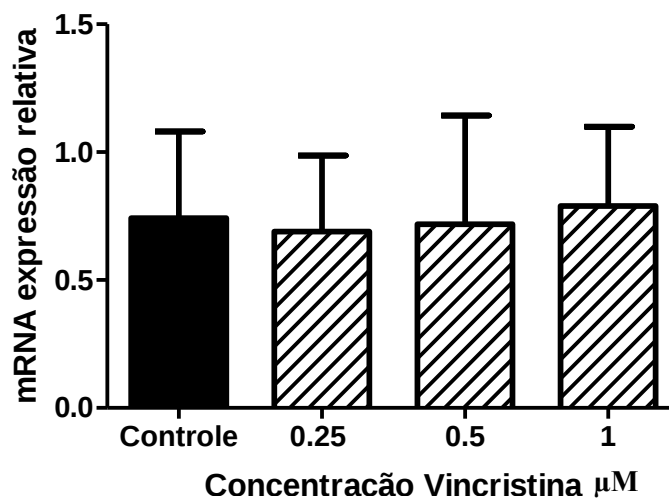


Gráfico 7. Expressão relativa de RNAm BAX em células de TVT após tratamento com vincristina, Controle endógeno RPS5 e RPS19. Não houve evidência de diferença estatística entre células tratadas e controle $p>0,05$.

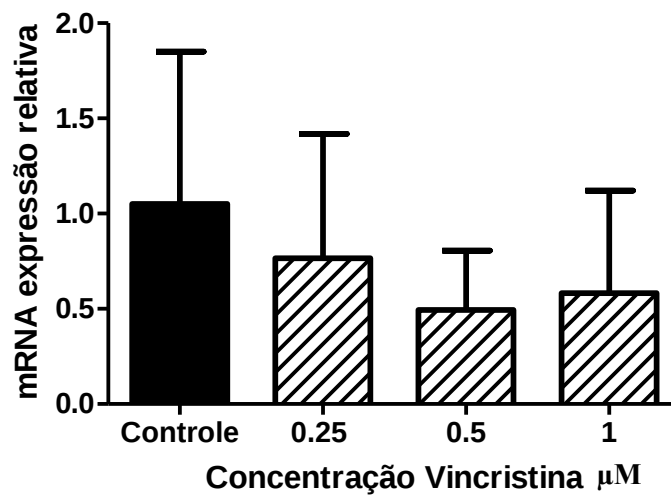


Gráfico 8. Expressão relativa de RNAm *BCL-2* em células de TVT após tratamento com vincristina, Controle endógeno RPS5 e RPS19. Não houve evidência de diferença estatística entre células tratadas e controle $p > 0,05$.

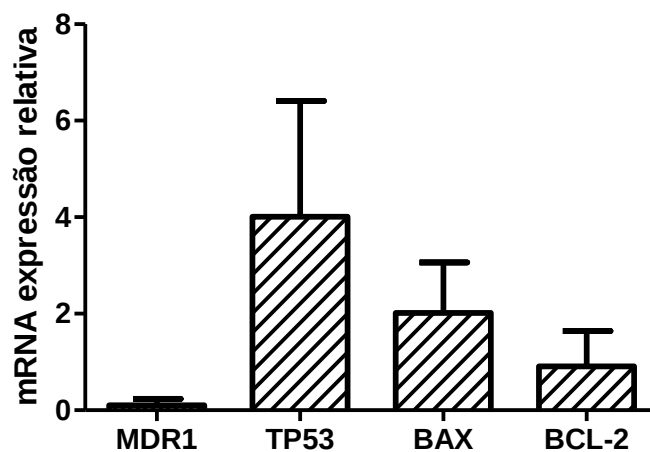


Gráfico 9. Expressão relativa de RNAm dos diferentes genes em tecidos de TVT. Controle endógeno RPS5 e RPS19.

9. Discussão

9.1. Frequência e caracterização do TVT.

Na literatura científica relacionada com TVT, descreve-se que não há predileção por sexo e raça (NIESLSEN; KENNEDY, 2000; COWELL; TYLER, 1999; DAS; DAS, 2000). No presente trabalho, não foi possível fazer este tipo de comparação, porque amostragem foi pequena e baseou-se na casuística do atendimento do Hospital no período da coleta das amostras.

Quanto a idade para apresentação do tumor, descreve-se que os animais são susceptíveis para implantação e desenvolvimento da neoplasia, a partir de 1 ano de idade, ou seja, quando entram na puberdade (NIESLSEN; KENNEDY, 2000; COWELL; TYLER, 1999; DAS; DAS, 2000). Apesar da população reduzida, os animais da pesquisa em questão apresentaram o tumor com idade entre 5 a 10 anos, isto é, mais velhos.

Com relação aos trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, bem como de outros grupos, também diagnosticaram o TVT em animais com idades semelhantes (BRANDÃO et al., 2002; AMARAL et al., 2004; LEFEBVRE et al., 2007; FONSECA et al., 2012; MONTOYA et al., 2013a; JAVANBAKHT et al., 2014). Apesar de serem dados que precisam de investigação mais profunda, o TVT pode estar acometendo animais em faixa etária mais velha. Possivelmente devido a melhor qualidade de vida dos animais que vem acontecendo nos últimos anos e/ou modificação no comportamento biológico do tumor.

No que diz respeito à topografia do tumor, seu principal predomínio é na genitália externa, tanto no macho como na fêmea (ROGERS, 1997, NIESLSEN e KENNEDY, 2000; DAS; DAS, 2000; NAK et al., 2005; AMARAL et al., 2007; FONSECA et al., 2012; MONTOYA et al., 2013a, JAVANBAKHT et al., 2014). Resultados semelhantes foram encontrados na pesquisa em questão. De fato a principal via de transmissão é a sexual.

A classificação morfológica do tumor em plasmocitoide, linfocitoide e misto padronizada e bem estabelecida pelo nosso grupo, foi aplicada nessa pesquisa. Entretanto, o predomínio foi do subtipo plasmocitóide o qual chegou a 100% em todos os casos. Essa morfologia vem se repetindo ao longo dos estudos, principalmente em TVTs com maior tempo de evolução. Nesses casos, o plasmocitóide predominou entre 74% a 95% (AMARAL et al., 2004; AMARAL, 2005, FONSECA et al., 2012, MONTOYA et al., 2013a). De fato, o padrão citológico parece ter papel importante no

comportamento biológico do tumor, do ponto de vista da agressividade. Portanto, investigações a respeito devem ser realizadas.

Nesta pesquisa, os 18 animais foram submetidos ao protocolo terapêutico. Dentre estes, quatro apresentaram resposta clínica não satisfatória ao tratamento, porque em dois deles foi necessária a prolongação do protocolo e os outros dois inclusive tiveram que ser submetidos à cirurgia. Isso correspondeu a aproximadamente 22%. Dados compatíveis com os encontrados por GASPARG et al., (2010); AMARAL et al., (2011). Os autores acreditam na possibilidade de ocorrência na alteração de comportamento biológico do tumor, como se fosse instabilidade tumoral para se librar do sistema de defesa do hospedeiro.

As células de TVT ao longo dos anos foram caracterizadas com marcadores para vimentina, lisozima e alfa-antitripsina (MOORE; ROSIN 1986; SANDUSKY et al., 1987; MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997; PEREIRA et al., 2000; MORRIS et al., 2002; MUKARATIRWA; GRUYS, 2003; ARAUJO et al., 2012; MASCARENHAS *et al.*, 2014). Neste trabalho, perfil semelhante foi realizado e não houve incompatibilidade de resultados. De fato, o perfil fenotípico apresentado pelos autores para identificar as células de TVT podem ser consideradas como método auxiliar no diagnóstico definitivo do tumor.

Descreve-se que a expressão de vimentina, lisozima e alfa-antitripsina permitem identificar as células como pertencendo ao TVT, pois, estes marcadores em alto número de casos ajudam a estabelecer um diagnóstico diferencial (MUKARATIRWA; GRUYS, 2003; MOZOS et al., 1996). A utilização destes exclui outros tumores de células redondas, como linfomas, melanomas amelanótico, carcinomas pouco diferenciados e mastocitomas. Porém, alguns autores tem descrito imunomarcção similar em histiocitomas, e neste caso, o diagnóstico diferencial deve ser baseado em critérios clínicos e histopatológicos (MOZOS et al., 1996; RAMOS et al., 2008).

Finalmente, os TVTs analisados, não apresentaram imunorreatividade para CD3 e para CD79 α , porém, observou-se imunomarcção de linfócitos que se encontravam infiltrando o tumor. Dados já observados em outros trabalhos também suportam esse fato (MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997, MUKARATIRWA; GRUYS, 2003, ARAUJO et al., 2012).

Cultivo *in vitro* de tecidos tumorais, principalmente o primário é um modelo interessante para avaliar a resposta de drogas. Porque às células preservam determinadas características do tecido *in vivo*. Além disso, o sistema confere acesso rápido à

informação da eficácia de drogas e apresenta relevância para identificar o potencial da resposta anticâncer a drogas no complexo microambiente do tecido tumoral (VANDER KUIP et al., 2006).

Seguindo esta linha de raciocínio, nesta pesquisa realizou-se modelo semelhante para estudar comportamento biológico do tumor, bem como sua resistência à quimioterapia. Uma vez estabelecidas às culturas, foi preciso identifica-las como pertencendo a TVT; para este fim, foram caracterizadas com o mesmo painel de anticorpos utilizado nos tecidos.

Ao final foi possível observar que todas as células apresentaram padrão semelhante ao do tecido do TVT, conforme dados descritos pelo nosso grupo de pesquisa (MONTROYA et al., 2013b). Esses resultados, por serem inéditos não foram discutidos com outros autores. Por essa razão, fica registrado o ineditismo do trabalho, no que diz respeito à importância na identificação e diferenciação das células do TVT. Dados esses que irão contribuir para as pesquisas em oncologia veterinária.

Para validar os resultados obtidos da imunomarcação, foram selecionadas aleatoriamente cinco culturas de células do TVT para identificar o seu cariótipo. Ao final obteve-se em todos os casos, número de cromossomos inferior a 78, que caracterizou as células como do TVT.

Esses dados corroboram como o descrito por diferentes autores, que descreveram que a contagem do número de cromossomos em culturas de células de TVT pode apresentar uma ampla variação entre 46 a 67 (ADAMS et al., 1969; OSHIMURA et al., 1973; MUKARATIRWA; GRUYS, 2003, MURCHINSON et al., 2014). Desta forma diante dos nossos resultados, podemos concluir que as células isoladas pertencem ao TVT.

9.2. Avaliação “*in vitro*” da citotoxicidade, sobrevivência, apoptose e ciclo celular em TVT submetidos ao tratamento com vincristina.

Quanto à avaliação da citotoxicidade e sobrevivência, estes são essenciais na fase inicial de desenvolvimento de drogas, uma vez que, permitem determinar a princípio, a concentração a ser utilizada. Além de fornecer as informações quanto aos danos celulares (ROGERO et al., 2003). Neste estudo, a vincristina foi utilizada para responder como as células de TVT comporta-se em ambiente desprovido do sistema imune e da matriz extracelular.

Nesse caso, as células reduziram seu metabolismo e exibiram altos níveis de citotoxicidade e baixos níveis de sobrevivência. No que diz respeito aos resultados ~~in~~

vitro” semelhantes para cultura de TVT não se tem conhecimento na literatura especializada. Entretanto, resultados encontrados para outras neoplasias, concluem que tal situação está relacionada com o mecanismo de ação dos vinca alcalóides, que inibem a proliferação celular causando bloqueio da mitose e do metabolismo celular (MOUNDI et al., 2013; SILVERMA; DEITCHER, 2013). Portanto, acredita-se que mecanismos semelhantes devam acontecer com as células de TVT, visto que, a vincristina é o quimioterápico de uso universal.

Autores como GIDDING et al., 1999; MORALES et al., 2014, descreveram respectivamente que quando a vincristina é utilizada para tratamento de tumores *in vitro*, a porcentagens de resposta varia de 8 a 100% Dados que estão em conformidade ao encontrado neste trabalho.

Da mesma forma, quando comparados os dados obtidos do tratamento *in vitro* e *in vivo* em células de TVT, estão em concordância, pois de forma geral os TVTs são altamente sensíveis ao composto (ERÜNAL-MARAL et al., 2000, OLIVEIRA et al., 2013, GANGULY et al., 2013).

A diferença encontradas na pesquisa entre o nível de citotoxicidade nas concentrações 0,25µM e 1 µM; na qual, o tratamento com maior concentração do fármaco registrou os maiores níveis de citotoxicidade, é possível que tenha relação com o potencial antitumoral da vincristina, a qual age, conforme seus níveis de concentração e da duração da exposição (MUJAGIC et al., 1983; SILVERMA; DEITCHER, 2013).

O uso da droga em baixa concentração estabiliza o fuso mitótico, previne a segregação de cromossomos, que resulta em parada da metáfase e inibição da mitose; porém, em alta concentração interrompe totalmente a despolimerização dos microtúbulos (MUJAGIC et al., 1983; PEDERSEN et al., 2007; SILVERMA; DEITCHER, 2013). Por outro lado, altas concentrações da vincristina, resultam em citotoxicidade letal (TAKANO et al., 1993, SILVERMA; DEITCHER, 2013), assim, para este trabalho, é possível dizer que maiores doses, tiveram como resultado menor metabolismo celular, fato que pode explicar os resultados.

Na mesma esteira, é importante destacar, que com uma única dose da droga, algumas das células mantiveram sua atividade mitocondrial evidenciado nas taxas de transformação do XTT. Este resultado está em concordância com que acontece com o tumor *in vivo* que precisa receber mais de uma dose para sua completa regressão (GILVIE, 1996, ATHANASIOS et al., 2013).

Embora os testes que avaliam a citotoxicidade *in vitro* possam não ter uma correlação direta com os *in vivo*, é possível que uma substância que induz comprovadamente uma reação citotóxica em teste envolvendo cultura de células, também desenvolva toxicidade quando aplicado a nível *in vivo* (OSORIO et al., 1998). Neste trabalho, os resultados destes testes, estão em conformidade com o que acontece *in vivo* em cães com TVT (ATHANASIOS et al., 2013; GANGULY et al., 2013). Aspecto relevante para utilizar o cultivo *in vitro* de TVT como modelo em pesquisas posteriores.

A Prova do XTT feita nas análises é um dos indicadores colorimétrico de viabilidade celular mais utilizado, sendo capaz de avaliar a função celular mitocondrial de acordo com a redução enzimática do sal de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais nas células viáveis (MOSMANN, 1983). Ainda assim, mediante a prova, é difícil diferenciar entre atividade citocida ou citostática de um composto. A respeito, do trabalho em questão, a vincristina utilizada nos testes, é uma droga de comprovado efeito citostáticos (JORDAN et al., 1991, RIXE; FOJO, 2007) e induz apoptose ou morte celular depois de exercer parada prolongada do ciclo celular (RIXE; FOJO, 2007; GALÁN et al., 2012; SILVERMA; DEITCHER, 2013).

Apesar de essa evidencia a respeito da droga, nas análises de apoptose do experimento, não foram observadas diferenças entre células que receberam tratamento e o controle. Porém, ao detalhar as análises do ciclo celular nas células que receberam tratamento, evidenciou-se uma diminuição da porcentagem de células em fase G1 e um aumento significativo da fase Sub G1, sendo a última dependente da concentração; ou seja, houve um efeito anti-proliferativo. Finalmente, não se evidenciou diferenças no número de células com capacidade proliferativa (fase G2). Resultados que em conjunto demonstram a sensibilidade das células ao composto em teste.

Vale ressaltar que no trabalho, as concentrações de vincristina, estiveram próximos às doses terapêuticas “*in vitro*” (DIXON et al., 1969; MUJAGIC et al., 1983; JORDAN et al., 1991; TANAKA et al., 2013), e utilizou-se o tempo no que espera-se que a vincristina desenvolva o seu potencial citostático (JACKSON; BENDER., 1979; JORDAN et al., 1991; PEDERSEN et al., 2007). Dessa forma, os resultados são o devido ao comportamento da célula frente ao agente antitumoral.

Abordando os dados anteriores, há descrição sobre o potencial antitumoral da vincristina varia conforme a sua concentração, duração da exposição (SILVERMA; DEITCHER, 2013) e número de células em fase de mitoses, durante o período de

exposição (EHRHARDT et al., 2013, SILVERMA; DEITCHER, 2013). Pesquisadores que utilizaram a droga para o tratamento de tumores sólidos e outros de linhagens de células diferentes do TVT, já descreveram altas porcentagens de apoptose (SILVERMA; DEITCHER, 2013; EHRHARDT et al., 2013; HE et al., 2014). Ao passo que, SHI *et al.*, 2008, ao comparar várias linhagens de células cancerígenas observaram que a morte em resposta ao tratamento com antimitóticos varia amplamente.

No TVT, também se descreve resposta variável ao tratamento. HSIAO et al., (2002) e MUTZAN et al., (2005), reportaram apoptoses em TVTs, tanto em aqueles que regrediram de forma espontânea quanto nos que recebem tratamento; porém em ambos os casos, associaram a condição com a presença de células T citotóxicas. Por outro lado, STETTNER et al., (2005), descreveram condição oposta, pois observaram apoptoses em tumores com escassa presença deste tipo de células; diante do qual, questionam se uma atividade residual de células T citotóxicas também é suficiente para gerar apoptoses.

Em fase disso, para as células de TVT não se tem esclarecido se a apoptose é o principal mecanismo de morte induzida pela vincristina. Da mesma forma, devido às evidências na nossa pesquisa outros mecanismos de morte por esta droga parecem acontecer pelo que é preciso indagar a respeito.

Em pesquisas relacionadas ao assunto em medicina humana, descreve-se que, quando as células detectam perturbação da mitose por agentes anti-mitóticos, ativam mecanismos complexos tais como parada da mitose, apoptose, catástrofe mitótica ou evasão da mitose (JACKSON et al., 2007; FAN et al., 2001; GALÁN et al., 2012).

Pesquisadores como GASCOIGNE; TAYLOR, (2009); THOPAM; TAYLOR, (2013), descreveram que células que sofrem uma prolongada parada da mitose por drogas, podem seguir de forma geral duas vias, ao princípio entrarem em um processo típico de apoptose ou passar a um processo de evasão –slippage” no qual se afasta da mitose e voltam para fase G1, mantendo-se no estado tetraplóide.

A respeito da discussão acima, pesquisadores que têm descrito tal mecanismo, diferem quanto a possibilidade da evolução destas células, por exemplo, JORDAN et al., (1996) reportam que as células que passam por este processo, morrem na seguinte interfase ou depois de um ou mais ciclos; outros pesquisadores como PANVICHIAN et al., (1998) indicam que a morte pode ocorrer durante a mitose. Entretanto, CHEN; HORWITZ, (2002), descrevem que estas células continuam com a divisão anormal.

Por sua vez, ORTH et al., 2012, ao tratar células MCF7 resistentes à apoptose, encontraram que depois do processo de –slippage” as células apresentaram danos no

DNA que induziram o p53 e p21, bem como outros tipos de inibidores do ciclo, que privavam as células a entrarem em uma nova mitose. Estes resultados levaram a propor que algumas células que apresentam tipos de apoptoses parciais dependem da combinação com danos no DNA, para induzir sua morte.

Considerando essas diferentes hipóteses é possível que os resultados encontrados em nossa pesquisa, com relação a apoptose e ao ciclo celular, sejam consequência de alguns desses mecanismos. O que caracteriza resultados inéditos ao trabalho. Assim, é preciso pesquisar a influência de outros tipos de morte diferente da apoptose em células de TVT, fato que pode ajudar na busca de novas opções terapêuticas.

Quanto aos resultados da fase G2 do ciclo, pesquisadores como MUJAGIC et al., 1983, ao tratar sarcomas com vincristina, descreveram uma acumulação transitória de células em fase G2, atingindo seu ponto máximo 4 e 8 horas depois do tratamento. Depois desse período os níveis decresceram, inclusive na presença da droga. Relata-se ainda que as células sejam mais susceptíveis aos efeitos letais da vincristina conforme elas progridem da fase S a G2 (JORDAN et al., 1991; MUJAGIC et al., 1983; HUANG et al., 2004). Diante de nossos resultados, mesmo tratando-se de outro tipo de tumor, é possível que fatos similares ocorram nas células do TVT.

Por fim, algumas das células apresentaram diferenças quanto à citotoxicidade, sobrevivência, apoptose e ciclo celular. Trabalhos desenvolvidos por JORDAN et al., 1991; PEDERSEN et al., 2007 com outro tipo de células, evidenciaram diferentes tipos de respostas de células ao tratamento com vinca alcalóides.

A parada do ciclo celular gerado pelos vinca alcalóides pode ser mais completo ou persistente em algumas células, e podem existir diferenças na habilidade específica das células durante a citocinese de progredir ou não para interfase (JORDAN et al., 1991; GASCOIGNE; TAYLOR, 2009). Além do mais, outra possibilidade é que as células expressem isoformas de tubulina que possuem baixa afinidade pela vincristina (JACKSON et al., 2007; PEDERSEN et al., 2007). Fatos que implicariam diferença na eficácia da droga e pode explicar parcialmente os nossos resultados.

Diante do exposto, para sedimentar os resultados de nosso experimento; ainda é preciso avaliar uma ampla faixa de tempo de exposição, para melhor entender o comportamento destas células frente à terapia.

9.3. Expressão dos genes *MDR-1*, *TP53*, *BCL-2* e *BAX* em cultura primária e tecidos de TVT.

Em regra, elevada expressão da glicoproteína-p (*MDR-1*) em tumores é relacionada com diminuição da sensibilidade à terapia em humanos (HODGES et al., 2011, TSUJIMURA; TANAKA, 2012, BINKHATHLAN; LAVASANIFAR, 2013) e em cães (BERGMAN et al., 1996; LEE et al., 1996; STEINGOLD et al., 1998; HONSCHA et al., 2009, ZANDVLIET et al., 2014). Portanto, pacientes que apresentam este tipo de alteração, necessitam de maior número de doses ou concentração mais elevada de uma droga durante o tratamento.

Na pesquisa, os resultados obtidos dos testes *in vitro* foram evidenciados em diferentes grupos de células, desde baixa até elevada expressão do *MDR-1*. Esses resultados são relevantes, primeiro porque permite demonstrar que ao nível *in vitro* em células de TVT, existe variabilidade da resposta à terapia. Segundo, porque os resultados são um indicio de que existe um efeito modulador da vincristina sobre a expressão do *MDR-1*.

Nessa linha de raciocínio pesquisadores como BREIER et al., 1994; BURKHART et al., 2001; AMBUDKAR et al., 2003; SULOVA et al., 2009, relataram a associação do uso de vinca alcalóides com aumento da expressão da glicoproteína-p, que de forma paralela, leva ao desenvolvimento de resistência a drogas. Da mesma forma, em pesquisas anteriores feitas pelo nosso grupo de pesquisa, se detalhou que TVTs que apresentavam uma imunorreatividade significativamente maior à marcação com o anticorpo antiglicoproteína-p, tinha relação direta com a resposta parcial à quimioterapia (GASPAR et al., 2009; 2010).

Diante de nossos resultados, é possível que em algumas culturas de TVT, a expressão de *MDR-1* seja modulada pelo uso da vincristina, além ser um importante mecanismo de regulação de resistência à droga. Tal posição com base nos mecanismos ação do *MDR-1*. Como estabelecido, a Pgp (*MDR-1*) transporta para o exterior da célula agentes citotóxicos como a vincristina (BINKHATHLAN; LAVASANIFAR, 2013), reduzindo as concentrações a níveis não letais (THOMAS; COLEY, 2003; MAIA; RUMJANEK, 2004) pelo que sua superexpressão está associada com resistência a drogas (TSUJIMURA; TANAKA, 2012). Além do mais, sob esta condição, também é possível observar uma expressiva influência nos mecanismos de apoptose nas células tumorais, qual seja, a de prevenção, consequentemente o número de células são

mantidas (WANG et al., 2013). Dessa forma, é preciso desenvolver novas provas para melhor sedimentar a hipótese.

Por outra parte, baixa expressão de *MDR-1* já foi relatada, porém esta condição é ainda controversa, descreve-se que pode conduzir a maior exposição a agentes tóxicos, levando a aumentar o risco para desenvolver alterações no genoma da célula, o que conduziriam a diferente grau de malignidade (WANG et al., 2013). Essa condição também foi observada, tanto em tecidos quanto em células neste trabalho, e ainda é preciso de outros estudos para identificar função dessa condição nas células de TVT.

Apesar da relevância dos resultados obtidos *in vitro*, é importante destacar que todos os tecidos do tumor, tiveram baixa expressão do *MDR-1*. Essa condição pode ser o reflexo da expressão de células não neoplásicas, nas quais a expressão pode estar ausente. Também por que existem tumores que apresentam baixos níveis de expressão da Pgp, os quais só aumenta após a quimioterapia (AMBUDKAR et al., 2003).

Outra explicação para os nossos resultados é a possibilidade da multiclonalidade das células do TVT, devido a sua origem primária ou uma seleção clonal no momento de fazer as culturas. Porém, ainda se fazem necessárias novas pesquisas para elucidar estes aspectos, visto que este é o primeiro trabalho em oncologia veterinária, no qual se identificou em TVT a expressão do gene *MDR-1* pela RT- qPCR tanto *in vivo* como *in vitro*.

A expressão de *TP53* nas células e tecidos foi de forma geral elevada. Expressão de *TP53* é relacionada com pobre prognóstico em linfomas (VELDHOEN et al., 1998) e mama (LEE et al., 2004), porém, em outros tumores descreve-se comportamento variável devido as suas funções. O *TP53* induz ativação do p53 que conduz a apoptoses ou autofagia (SUI et al., 2011) e participa em diferentes fases do ciclo celular, na fase G1 por meio da transativação do p21, e na fase G2/M bloqueando a entrada da célula à mitose (SUZUKI; MATSUBARA, 2011).

O p53 pode ter um duplo mecanismo nas células, é dizer, protetor e indutor de apoptose (SUZUKI; MATSUBARA, 2011). Diante dos resultados, é possível que esses mecanismos possam também acontecer nas células do TVT. No primeiro caso, podem acarretar uma maior sobrevivência das células e incrementar a possibilidade de transformação maligna.

Em nosso trabalho, dois tecidos 1 e 2, apresentaram-se com ausência e baixa expressão do *TP53* respectivamente. COLLAVIN et al., (2010), já relataram que a perda funcional ou expressão desregulada da *TP53* é frequente em tumores primários e que

estas alterações podem ter grande impacto no efeito regulatório comum às proteínas da família p53.

Por outro lado, os nossos dados diferem de (MORO et al., 2010) que identificaram maior quantidade de células que expressavam a proteína p53 em TVT transplantados em fase de regressão, quando comparado com TVT de ocorrência natural; e descrevem relação direta entre *TP53* e o índice apoptótico em TVT em regressão.

A superexpressão de *TP53* tem sido considerada como um marcador de presença de mutações (MORO et al., 2010); no TVT, VÁZQUEZ et al., 2008; CHOI; KIM, (2002), SERVÍN et al., (2009) já tem descrito mutações do gene; desta forma, os resultados da presente pesquisa referente a *TP53* podem ser o produto deste tipo de situação, e ainda é preciso indagar mais a respeito.

Finalmente, referente à expressão de genes da família *BCL-2*, os nossos resultados não tem referente comparativo no TVT, pois este é o primeiro trabalho no que se determinou a expressão do RNAm do *BCL-2* e *BAX* em tecido e em cultura de do tumor. No TVT, até o momento só tem-se evidenciado a expressão da proteína, ao respeito STOCKMANN et al., (2011b), relataram alta expressão da proteína Bcl-2 ao utilizar a técnica imunohistoquímica porém ainda é necessário identificar as implicações desta condição no tumor.

Em outros trabalhos nos que se analisaram a expressão dos mesmos genes em outros tipos de tumor, tanto no homem, quanto em outros animais. Detalharam superexpressão do *BCL-2* (DELFINO, 1989; FETT-CONTE; SALLES, 2002; MENDELSON et al., 2008; LLAMBI; GREEN, 2011; ZHOU et al., 2012, FERNALD; KOROKAWA, 2013). Essa condição, confere às células, resistência a estímulos apoptóticos (CZABOTAR et al., 2014) e previne a morte de células induzida por fármacos, radioterapia (ZHOU et al., 2012, THOPAM; TAYLOR, 2013); além de acelerar a gênese do tumor pela desregulação do *MYC* e outros oncogênes.

Porém, a tal condição também está associada com fenótipos de baixa malignidade e prognóstico favorável (CZABOTAR et al., 2014). Baseados em nossos resultados, não é possível identificar as tais implicações no TVT.

Por outro lado, podem ocorrer interações entre *MDR-1* e *TP53* (MORO et al., 2010) e entre as proteínas da família Bcl-2 e p53 (COLLAVIN et al., 2010). No trabalho os dados foram variáveis, como particularidade, foi visto que algumas células que apresentavam baixos níveis de expressão de *MDR-1* tinham expressão elevada de *TP53*

(células 3 e 16). E variou de normal a elevada em células com aumento da expressão do *MDR-1* (célula 12 e 9 respectivamente). Em razão disso, ainda é preciso indagar se o associao entre estes genes é pressente em células de TVT tanto a nível *in vitro* e *in vivo* com descrito em outros tumores (COLLAVIN et al, 2010)

De outro lado, aumento do Bcl-2 esta relacionada com aumento do *TP53* (KUMARAGURUPARAN et al.,2006), em o nosso trabalho, houve aumento do *TP53*, porém sem significância de *BCL-2*. Divergências na expressão de *BCL-2* e *TP53* têm sido descritas em outras pesquisas (BASU; HALDAR, 1998). Em tecidos de TVT, STOCKMANN et al., (2011b), também reportaram divergências porém os estes autores, descreveram aumento do Bcl-2 e não do *TP53*.

Em nosso trabalho o aumento da expressão de *TP53* e diminuição da expressão do *BCL-2* observado em algumas células, pode-se relacionar ao uso da vincristina. A respeito, SENOVILLA et al., (2009) e GALÁN et al., (2012), descreveram que a morte de células em período de interfase é facilitada pela ativação do *TP53*. Além disso, os autores descrevem que a indução da expressão do *TP53* em células pode determinar o seu destino ORTH et al., (2012). Por outro lado, UPRETI et al., (2008), relataram aumento do nível do Bcl-_{XL}, mas não do *BCL-2* em células KB-3, após receber tratamento com vincristina.

Outras vias apoptóticas estimuladas por *TP53* é a do *BAX* (LACROIX et al., 2006, CZABOTAR et al., 2014). Na pesquisa, esperava-se elevada expressão deste gene em todas as células e tecidos que apresentaram elevada expressão do *TP53*; posto que este último promovem apoptose através da regulação positiva do *BAX* e regulação negativa de *BCL-2* (HAUPT et al., 2003). Porém, esta condição só foi encontrada em seis tecidos. Diante desta situação, é possível acreditar em mutações do *TP53* em TVT, pois a perda da atividade de *TP53* em células cancerígenas tem sido associada com limitação da produção do *BAX* e a ativação do apoptose por via mitocondrial (SHING et al., 2009; FERNALD; KOROKAWA, 2013).

Por fim, os resultados *in vitro* em células de TVT, também diferem de relatos na literatura que descrevem que vincristina induz expressão de *BAX* no processo de ativação dos mecanismos de morte celular (PEDERSEN et al., 2007).

A tal divergência ainda deve ser pesquisada, para determinar se essas interações têm alguma relação com o comportamento biológico do tumor.

10. Conclusão

Diante das condições em que o trabalho foi desenvolvido pode-se concluir:

1. A expressão dos genes *MDR-1* (glicoproteína-p) foi maior em células de TVT que apresentam menores taxas de citotoxicidade, maiores de sobrevivência após à quimioterapia com vincristina. Porém, essas células apresentam alta expressão do gene *TP53*. Os genes *BAX* e *BCL-2* não apresentaram câmbios importantes quanto a sua expressão após o uso do tratamento, fatos que precisam ser mais sedimentados para identificar o associao com resistência a quimioterapia e malignidade do tumor.
2. A morte celular de culturas de TVT após o tratamento com vincristina, pode ser uma associao entre mecanismos de apoptoses e outros tipos de morte celular como catástrofe mitótica, além de existir a possibilidade que estas células possuíam mecanismo que favoreçam a de evasão da mitose.

11. Referências¹

- ADAMS, E.W.; CARTER, L.P.; SAPP, W.J. Growth and maintenance of the canine venereal tumor in continuous culture, *Cancer. Res. Baltimore.*, v. 28, p753-757, 1968.
- ALENXANDROVA R. Multidrug resistance and p-glycoprotein. **Exp. Path. Parasitol.**, v.1, p.62-66, 1998.
- ADORNO, M.; CORDENONSI, M.; MONTAGNER, M.; WONG, C.; HANN, B.; SOLARI, A.; BOBISSE, S.; RONDINA, M.; IGUZZARDO, V.; PARENTI, A.; ROSATO, A.; BICCIATO, S.; BALMAIN, A.; PICCOLO, S. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. **Cell.**, v.137, n.1, p.87-98, 2009.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWUIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Como as células são estudadas.** In: ALBERTS B, BRAY D, LEWUIS, et al. (Eds) **Biologia molecular da célula.** 3 ed. Porto Alegre: Artes médicas, 1997, p156-162.
- ÁLVARO, T.; LEJEUNE, M.; ESCRIVA, P.; PONS, L.E.; BOSCH, R.; JAÉN, J.; LÓPEZ, C.; SALVADÓ, M.; DE SANJOSÉ, S. Appraisal of immune response in lymphoproliferative syndromes: a systematic review. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 70, p.103–13, 2009.
- ÁLVARO, T.; NOGUERA-SALVA, R.; FARIÑAS-GUERRERO, F. La matriz extracelular: de la mecánica molecular al microambiente tumoral (parte II). **Rev Esp. Patol.**; v.43, n.1, p.24–32. 2010.
- AMARAL, A.S.; FERREIRA, I.; COLODEL, M.M.; FÁVERO, D.M.; ROCHA, N.S. DNA damage in canine transmissible venereal tumor. **Rev. Lus. Ciên. Med. Vet.**, v. 4, p. 1-5, 2011.
- AMARAL, A.S.; GASPAR, L.F.; BASSINI-SILVA, S.; ROCHA, N.S. Cytological diagnostic of transmissible venereal tumor in the Botucatu region, Brazil (descriptive study: 1994-2003). **Rev. Port. Ciên. Vet.**, v.99, n.551, p.167-171, 2004.
- AMARAL, A.S. **Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA.** 2005, 228p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

¹ Bibliografia organizada de acordo com as normas vigentes da ABNT.

- AMARAL, A.S.; BASSANIL-SILVA, S.; FERREIRA, I.; FONSECA, L.S.; ANDRADE, F.H.; GASPAR, L.F.; ROCHA, N.S. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. **Rev. Port. Ciên. Vet.**, v.103, p.563-564, 2007.
- AMBUDKAR, S.V.; KIMCHI-SARFATY, C.; SAUNA, Z.E.; GOTTESMAN, M.M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene.*, v. 22, p. 7468–7485, 2003.
- ANDRADE, S.M.F. Antineoplasicos In: ANDRADE, S.M. F. **Manual de terapêutica veterinária**, 3 ed, São Paulo: ROCA, 2008.
- ARAÚJO, M.R.; PREIS, I.S.; LAVALLE, G.E.; CASSALI, G.D.; ECCO, R. Histomorphological and immunohistochemical characterization of 172 cutaneous round cell tumours in dogs. **Pesq. Vet. Bras.** 32, n.8, p. 772-780, ago. 2012.
- ATHANASIOS, E.C.; KENE, R.O.; ANYANWU, H.C. Comparative efficacy of surgery, vincristine sulphate and combined therapy of levamisole and Bacille Calmette Guerin vaccine in the treatment of transmissible venereal tumour-infected dogs. **Comp. Clin. Pathol.**, p.1-5, 2013.
- ATHANASOU, NA. **Cell and organ culture in the understanding of bone and its neoplasms**. In: HELLIWELL TR. **Pathology of bone and joint neoplasms**. Philadelphia: W.B Saunders, 1999, p. 34-58.
- ATTARDI, L.D.; JACKS, T. The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v.55, p.48-63 1999.
- BASSANI-SILVA, S.; SFORCIN, J.M.; AMARAL, A.S. SOUSA N.R. Propolis effect in vitro on canine transmissible venereal tumour cells. **Rev. Port. Ciên. Vet.**, v.102, p. 261-265, 2007.
- BASU, A.; HALDAR, S. The relationship between Bcl-2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. **Mol. Hum. Repr.**, v.4 n.12, 1099-1109, 1998.
- BERGMAN, P.J.; OGILVE, G.K.; POWERS, B.E. Monoclonal antibody C219 immunochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma. **J. Vet. Inter. Med.**, v.10, n.6, p.354-359, 1996.
- BESCHORNER, W.E.; HESS, A.D.; NERENBERG, S.T. Isolation and characterization of canine venereal tumor-associated inhibitory and blocking factors. **Cancer. Res.** Baltimore., v, 39, n.10, p.3920-3927, out. 1979.
- BHOWMICK, N.A.; NEILSON, E.G. Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature.**, p.432-332, 2004.

- BINKHATHLAN, Z.; LAVASANIFAR. A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: Current status and future perspectives. **Curr. Cancer. Drug. Targets.**, vol. 13, n3, p 326-346, 2013.
- BOOTH, M.J. Canine transmissible venereal tumour and ovarian papillary cystadenocarcinoma in a bitch. **J. Small. Anim. Pract.**, v.35, n.1, p.39-42, 1994.
- BOSCOS, C.M.; TONTIS, D.K.; SAMARTZI, F.C. Cutaneous involvement of TVT in dogs: a report of two cases. **Canine Pract.**, v.24, n.4, 6-11, 1999.
- BREIER, A.; ŠTEFANKOVÁ, S.; BARANCÍK, M.; TRIBULOVÁ. N. Time Dependence of [3H]-Vincristine Accumulation by L1210 Mouse Leukemic Cells. Effect of P-Glycoprotein Overexpression. **Gen. Physiol. Biophys.**, v. 13, p. 287—298, 1994.
- BRINKHOF, B.; SPEE, B.; ROTHUIZEN, J.; PENNING, L.C. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. **Anal. Biochem.**, v.356, n.1, p. 36-43, 2006.
- BRUMBY, A.M.; RICHARDSON, H.E. Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways. **Nat. Rev. Cancer.**, v.5, p. 626–639, 2005.
- BURKHART, C.A.; KAVALLARIS, M.; BAND; HORWITZ, S. The role of α -tubulin isoforms in resistance to antimitotic drugs. *Biochim. Biophys. Acta*; v.1471, p.1-9, 2001.
- CADWEL, C.; ZAMBETTI, G.P. Effects of wild-types p53 tumour suppressor activity and mutant p53 gain-of function on cell growth. **Gene.**, v. 277, n.1-2, p. 15-30, 2001.
- CALVERT, C.A.; LEIFER, C.E; MacEWEN, E.G. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.181, p.163-164, 1982.
- COLLAVIN, L; LUNARDI, A.; DEL SAL, G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell. Death. Differ.*, v.17, p. 901-911, 2010.
- CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 2, p. 647–656, 2002.
- COUSSENS, L.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature.**, p.420:860, 2002.
- CULMSEE, K.; GRUBER, A.D.; HIMMELSTJERNA G.S.; NOLTE, I. Quantification of MDR-1 gene expression in canine tissues by real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. **Res. Vet. Sci.**, v.77, p.223–229, 2004.
- CZABOTAR, P.E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, M.J. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 15, p 49-63, jan. 2014.

- CHAO, D.T.; KORSMEYER, S.J. BCL-2 family: regulators of cell death - Review. **Annu. Rev. Immunol.**, v.16, p.395-419, 1998.
- CHEN, J. G.; HORWITZ, S. B. Differential mitotic responses to microtubule stabilizing and -destabilizing drugs. **Cancer. Res.**, v. 62, p.1935-1938, 2002.
- CHOI, Y.K.; KIM, C.J. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 in canine transmissible venereal tumor. **J. Vet. Sci.**, v. 3, p. 285–292. 2002.
- CHOU, P.; CHUANG, T.; JAN, T.; GION, H.; HUANG, Y.; LEI, H.; CHEN, W.; CHU, R. Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. **Vet. Immunol. Immunopath.**, v. 130, p. 25-34, 2009.
- DAS, U.; DAS, A.K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Vet. Res. Commun.**, v.24, p.545-556, 2000.
- DELFINO, A.B. O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose – carcinogênese. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 43, n.3, p.173-186, 1997.
- DIXON, G. J.; DULMADGE, E. A.; MULLIGAN, L.T.; MELLETT L. B. Cell culture bioassay for vincristine sulfate in sera from mice, rats, dogs, and monkeys. **Cancer Res.**, v. 29, p. 1810-1813, 1969.
- DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. Veterinary Epidemiologic Research. Segunda Edição. VER Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, Canadá, 2010.
- ERÜNAL-MARAL, N.; FINDIK, M.; ASALAN, S. Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. **Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.**, v.107, n.5, p.175-180, 2000.
- EHRHARDT, H.; PANNERT, L., PFEIFFER S.; WACHTER, F.; AMTMANN, E.; JEREMIAS, I. Enhanced anti-tumour effects of Vinca alkaloids given separately from cytostatic therapies. **British J. Pharm.**, v.168, p1558–1569, 2013.
- FAN, M.; GOODWIN, M.E.; BIRRER, M.J.; CHAMBERS, T.C. The c-Jun NH(2)-terminal protein kinase/AP-1 pathway is required for efficient apoptosis induced by vinblastine. **Cancer Res.**, v. 61, p. 4450–4458, 2001.
- FERNALD, K.; KUROKAWA, M. Evading apoptosis in cancer. **Trend. Cell. Biol.**, v. 23, n.12, p. 620-633, 2013.
- FETT-CONTE, A.; SALLES, A.B. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 24, n.2, p.85-89, 2002.
- FERREIRA, A.J.; JAGGY, A.; VAREJÃO, A.P.; FERREIRA, M.L.; CORREIA, J.M.; MULAS, J.M.; ALMEIDA, O.; OLIVEIRA, P.; PRADA, J. Brain and ocular

metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. **J. Small Anim. Pract.**, v.41, n.4, p.165-168, 2000.

FONSECA, L.S.; MOTA, L.S.; COLODEL, M.M. FERREIRA, I.; ROCHA, N.S. Spontaneous Canine Transmissible Venereal Tumor: association between different phenotypes and the insertion LINE-1/c-myc. **Rev. Col. Cien. Pec.**, v.25, p.402-408, 2012.

FRENZEL, A.; GRESPI, F.; CHMELEWSKI WAND, VILLUNGER, A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. **Apoptosis.**, v. 14, 584–596, 2009.

FRESHNEY RI, **Culture of animal cell**. Newyork, Wiley-Liss, 2010, 577p

FOWLER, K.A.; DIRCK, L.D.; WEBB, S.K.; HAUGHTO, C.L. Diagnostic exercise: neoplastic mass of the vagina and vulva in a dog. **Lab. Anim. Sci.**, v. 47, n.5, p.534-536, 1997.

GALÁN-MALO, P.; VELA, L.; GONZALO, O.; CALVO-SANJUÁN, R.; GRACIA-FLETA, L.; NAVAL, J.; MARZO, I. Cell fate after mitotic arrest in different tumor cells is determined by the balance between slippage and apoptotic threshold. **Toxicol. Appl. Pharm.**, v. 258, p. 384–393, 2012.

GANGULY, B.; DAS, U.; DAS, K. Canine transmissible venereal tumour: a review. **Vet. Comp. Onc.**, v. 11, n 4, p 1-12, 2013.

GASCOIGNE, K.E.; TAYLOR, S.S. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? **J. Cell. Sci.**, v.122, p. 2579-2585, 2009.

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

GASPAR, L.F. AMARAL, A.S.; BASSANI-SILVA, S.; ROCHA, N.S. Imunorreatividade à glicoproteína-p nos diferentes tipos citomorfológicos de tumor venéreo transmissível canino. **Vet. em Foco.**, v.6, n.2, 2009.

GASPAR, L.F.; FERREIRA, I.; COLODEL, M.M.; BRANDÃO, C.V.; ROCHA, N.S. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: cell morphology and influence on p-glycoprotein expression. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v.34, p 447-454, 2010.

- GASPAR, L.F.; BASSINI-SILVA, S.; ROCHA, N.S. Cytological diagnostic of transmissible venereal tumor in the Botucatu region, Brazil (descriptive study: 1994-2003). **Rev. Port. Ciênc. Vet.**, v.99, n.551, p.167-171, 2004.
- GERARDI, D.G.; TINUCCI-COSTA, M.; SILVEIRA A.C.; MORO, J. Expression of P-glycoprotein, multidrug resistance associated protein, glutathione-S-transferase pi and p53 in canine transmissible venereal tumor. **Pesq. Vet. Bras.**, v.34, n.1, p.71-78, 2014.
- GIDDING, C.E.; KELLIE, S.J.; KAMPS, W.A.; GRAAF, S.S. Vincristine revisited. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 29, n.3, p.267-287, 1999.
- GONZÁLES, G.; SANCHÉZ, B.C.; VÉLEZ, H.M.; BUEN, A.N. Neoplasias en aparato reproductor en perras: estudio retrospectivo de 6 años. **Vet. Méx.**, v.28, n.1, p.31-34, 1997.
- GONZÁLES, C.; CEPEDA, R.; FLORES, E.; CATTANEO, G.; REYES, S. Apoptosis en tumor venéreo transmisible del canino en fase de crecimiento progresivo y durante regresión inducida por vincristina. **Avances em ciências veterinárias**, v.18, n.1,2, p.54-62, 2003.
- HALDAR S, JENA N, CROCE CM. Inactivation of bcl-2 by phosphorylation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**; v.92, n.10, p. 4507-4511, 1995.
- HARRIS, C.; HOLLSTEIN, M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. **N. Engl. J. Med.**, v.329, p.1318-1327, 1993.
- HAUPT, S.; BERGER, M.; GOLDBERG, Z.; HAUPT, Y. Apoptosis—the p53 network. **J. Cell. Sci.**, v.116, p.4077-85, 2003.
- HE, D.; WU, H.; DING, L.; LI, Y. Combination of BCL11A siRNA with vincristine increases the apoptosis of SUDHL6 cells. **European J. Med. Res.**, v. 19, n. 34, 2014.
- HEINLEIN, C.; KREPULAT, F.; LOHLER, J.; SPEIDEL, D.; DEPPERT, W.; TOLSTONOG, G.V. Mutant p53(R270H) gain of function phenotype in a mouse model for oncogene-induced mammary carcinogenesis. **Int. J. Cancer.**, v. n.122, p.1701-9, 2008.
- HSIAO, Y.W.; LIAO, K.W.; HUNG, S.W.; CHU, R.M. Effect tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. **Vet. Immunol. Immunop.**, v 87, p. 19-27, 2002.
- HSIAO,Y.; LIAO, K.; CHUNG, T.; LIU, C.; HSU, C.; CHU, R. Interactions of host IL-6 and IFN- γ and cancer-derived TGF- β 1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. **Cancer. Immunol. Immunother.**, v. 57, p1091-1104, 2008.

- HODGES, L.M.; MARKOVA, S.M.; CHINN, L.W.; GOW, J.M.; KROETZ, D.L.; KLEIN, T.E.; ALTMAN, R.B. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, Pglycoprotein). **Pharmacogenet. Genomics.**, v.21, n.3, p.152–161, 2011.
- HONSCHA, K.U.; SCHIRMER, A.; REISCHAUER, A.; SCHOON, H.A.; EINSPANIER, A.; GABEL, G.; Expression of ABC-transport proteins in canine mammary cancer: consequences for chemotherapy. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 44 (Suppl 2), p. 218–223, 2009.
- HUANG, Y.; FANG, Y.; WU, J. Regulation of *Vinca* alkaloid-induced apoptosis by NF- κ B/I κ B pathway in human tumor cells. **Mol. Cancer. Ther.**, v.3, p. 271-277, 2004.
- JACKSON, D.V.; RICHARD A. B. Cytotoxic Thresholds of Vincristine in a Murine and a Human Leukemia Cell Line *in Vitro*. **Cancer Res.**, v. 39, p. 4346-4349, 1979.
- JACKSON, J.R; PATRICK, D.R.; DAR, M.M.; HUANG, P.S. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents?. **Cancer.**, v.7, p. 107-117, 2007.
- JAVANBAKHT, J. B.; PEDRAM, M. R.; TAHERIYAN F.; KHADIVAR, S. H.; HOSSEINI, F. S.; ABDI, E.; HOSSEINI, M.; MOLOUDIZARGARI, S. H.; AGHAJANSHAKERI, S.; JAVAHERYPOUR, R.; SHAFIEE, R.; EMRANI, BIDI. Canine transmissible venereal tumor and seminoma: a cytohistopathology and chemotherapy study of tumors in the growth phase and during regression after chemotherapy. **Tumor. Biol.**, v 35, p.5493–5500, 2014.
- JORDAN, M.A; THROWER, D.; WILSON, L. Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by *Vinca* Alkaloids., **Cancer Res.**, v.51, p. 2212-2222,1991.
- JORDAN, M. A.; WENDELL, K.; GARDINER, S.M.; DERRY, W. B.; COPP, H.; WILSON, L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. **Cancer Res.**, v. 56, p. 816-825,1996.
- KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A.D. Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. **Res. Vet. Sci.**, v. 87, p. 91–96, 2009.
- KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. **Res. Vet. Sci.**, v. 81, n. 218–224, 2006.
- KUNAKORNSAWAT, S.; YIPPADITR, W.; JAMJAN, N.; BOOTCAH, R.; NETRAMAI, S.; VIRIYARUMPA, J.; KORNKAEWRAT, K. **Surgical correction of transmissible venereal tumor with vincristineresistance using episiotomy and vulvo**

vagino plasty in female and subtotal penile amputation and scrotal ablation in male dogs. In Proceeding of 48th Kasetsart University Annual Conference: Veterinary Medicine. Feb 3-5, Bangkok, Thailand. p 191-200, 2010.

KANAYAN, N.; OKUDA, N.; TOYAMA, N.; OIKAWA, T.; INOKUMA, H.; MORIMOTO, M.; HAYASHI, T.; UNE, S.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y.; TSUJIMOTO, H.; ONISHI, T. Detection of the anti-P53 antibodies in dogs with tumors. **J. Vet. Med. Sci.**, v.64, p. 973–979, 2002.

KIRCHOFF, N.; NOHR, B. Spinal metastasis of a canine transmissible venereal tumor. **Kleintierpraxis.**, v.39, n.11, p.797- 798, 1994.

KIRKIN, V.; JOOF, S.; ZORNING, M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. **Biochem. Bioph. Act.**, v.16, n.44, p. 229–249, 2003.

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

LACROIX, M.; TOILLON, R.A.; LECLERCQ, G. “p53 and breast cancer, an update,” **Endocr-Relat. Cancer.**, v. 13, no. 2, p. 293–325, 2006.

LLAMBI, F.; GREEN, D.R. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 21, p. 12–20. 2011.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics.**, v6, n 62, 19 p, 2005.

LEE, J.J.; HUGHES, C.S.; FINE, R.L.; PAGE, R.L. P-glycoprotein expression in canine lymphoma. **Cancer.**, v.77, p.1892-1898, 1996.

LEE, C.H.; KIM, W.H.; LIM, J.H.; KANG, M.S.; KIM, D.Y.; KWEON, O.K. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **J. Vet. Sci.**, v. 5, n.1, p.63-69, 2004.

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

LIU, C.C.; WANG, Y.S.; LIN, C.Y.; CHUANG, T.F.; LIAO, K.W.; CHI, K.H.; CHEN, M.F.; CHIANG, H.C.; CHU, R.M. Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an in vivo canine model of transmissible venereal tumor. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 57, n. 4, p. 479-491, 2008.

MACLEOD, R.J. MDR-1, Bcl-xL, H. pylori, and Wnt/b-catenin signalling in the adult stomach: how much is too much?. **Lab. Invest.**, v. 92, p. 1670–1673, 2012.

- MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; KAPLANSKI, C.; RIGAL, D.; MAGNOL, J.P. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. *Vet. Immunol. Immunop.*, v. 57, p.1-11, 1997.
- MASCARENHAS, M.B.; PEIXOTO, P.V.; RAMADINHA, R.R.; YAMASAKI, E.M.; COSTA, S.Z.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L.; FRANÇA. Immunohistochemical study of genital and extragenital forms of canine transmissible venereal tumor in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.34, n.3, p.250-254, 2014.
- MAIA, R.C.; RUMJANEK, V.M. **Mecanismos moleculares de resistência a múltiplas drogas** In: FERREIRA, C.G., ROCHA, J.C. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. 469p. Cap. 11, p.113-122.
- MEALEY, K.L.; BARHOUMI, R.; ROGERS, K.; KOICHEVAR, D.T. Doxorubicin induced expression of P-glycoprotein in a canine osteosarcoma cell line. **Cancer Let.**, v.126, n.2, p.187-192, 1998.
- MENENDEZ, D.; INGA, A.; RESNICK, M.A. The biological impact of the human master regulator p53 can be altered by mutations that change the spectrum and expression of its target genes. **Mol. Cell. Biol.**, v. 26, n.6, p. 2297-308, 2006.
- MENDELSON, J.; HOWLEY, I.; THOMPSON, G. **The molecular basis of cancer**. 3rd ed. Saunders, imprint of Elsevier Inc. p 33- 35, 230-240, 2008.
- MIKAELIAN, I.; GIRARD, C.; IVASCU, I. Transmissible venereal tumor: a consequence of sex tourism in a dog. **Can. Vet. J.**, v.39, p.591, 1998.
- MIHARA, M.; ERSTER, S.; ZAIKA, A.; PETRENKO, O.; CHITTENDEN, T.; PANCOSKA, P.; MOLL, U.M. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. **Mol. Cell.**, v.11, p. 577–590, 2003.
- MISDORP, W. General consideration. In: MOULTON JE. (ed). **Tumors in domestic animals**. 3 ed. London: University of California Press, 1990. p .1-22.
- MIZUTANI, H.; SAEKO T.O.; HIRAKU, Y.; KOJIMA, K.; KAWANISHI, S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sci.**, v. 76, p. 1439–1453, 2005.
- MOCHIDA, Y.; TAGUCHI, K.; TANIGUCHI, S.; TSUNEYOSHI, M.; KUWANO, H.; TSUZUKI, T.; MICHIIHIKO, K.; MORIMASA, W. The role of P-glycoprotein in intestinal tumorigenesis: disruption of mdr1 suppresses polyp formation in Apc (Min/+)mice. **Carcinogenesis**, v. 24, p.1219–1224, 2003.

- MOHANTY, G.C.; RAJYA, B.S. Growth and morphological characteristics of canine venereal tumor cell in vitro. **Vet. Path.** . v. 14, n.4, p420-425, jul. 1977.
- MONTOYA, F.L.; PEDRAZA, F.J.; GRANDI, F.; ROCHA, N. Cytologic subtypes of canine transmissible venereal tumor. **Vet. Clin. Pathol.**, v 41, n.1, p 4–5, 2012.
- MONTOYA, F.L.; PEDRAZA, F.J.; MONTEIRO, S.; BRANDÃO, C.V.; ROCHA, N.S. Cytological and clinical staging of transmissible venereal tumour at the Veterinary Hospital of Botucatu. **Rev.Vet. Zoot.**, v.7, n2, p1-17, 2013a.
- MONTOYA, F.L.; BERSANO, O. P.; FERREIRA, L. J.; PEDRAZA, F.J.; ROCHA, N. Caracterización inmunofenotípica de cultivos primarios de tumor venéreo transmisible canino. **Rev. Col. Cienc. Pec.**, 23 supl, p 380, 2013b.
- MOORE PF, ROSIN A. Malignant histiocytosis of Bernese mountain dogs. **Vet. Pathol.**, v. 23, n, 1, p. 1–10, 1986.
- MORALES, E.; GONZÁLEZ, C. Frecuencia de tumor venéreo transmisible en perros de la ciudad de México entre 1985 y 1993. **Vet. Méx.**, v.26, n.3, p.173-275, 1995.
- MORALES, R.P.; VALLARINO, T.K.; CRUZ, V.T. Kinetics of micronucleus induction and cytotoxicity caused by distinct antineoplastics and alkylating agents in vivo. **Toxicol. Lett.**, v. 224, p.319– 325, 2014.
- MORRIS, J.S.; MCINNES, E.F.; BOSTOCK, D.E.; HOATHER, T.M.; DOBSON, J.M. Immunohistochemical and histopathologic features of 14 malignant fibrous histiocytomas from flat-coated retrievers. **Vet. Path.**, v.39, p.479-499, 2002.
- MOSMANN, T. Rapid colormetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 65, p.55-63, 1983.
- MOUDI, M.; RUSEA, GO.;YONG, S.Y.; NAZRE, M. Vinca Alkaloids. **Int. J. Prev. Med.**, v. 4, n.11, p. 1231–1235, 2013.
- MOZOS, E.; MÉNDEZ, A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; MARTÍN DE LAS MULAS, J.; PÉREZ, J. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. **Vet. Path.**, v.33, p.257-263, 1996.
- MORO, J.V.; TINUCCI-COSTA, M.; SILVEIRA, A.C.; GERARDI, D.G.; ALESSI, A.C. Reactivity of p53 protein in canine transmissible venereal tumor. **Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.**, v.62, n.2, p.318-323, 2010.
- MOZOS, E. Primary extragenital occurrence of transmissible venereal tumors: three case reports. **Canine Pract.**, v.19, n.1, p.7-10, 1994.

- MUJAGIC, H.; CHEN, S.; GEIST, R. Effects of Vincristine on Cell Survival, Cell Cycle Progression and Mitotic Accumulation in Asynchronously Growing Sarcoma 180 Cells. **Cancer Res.**, v. 43, p.3591-3597, 1983.
- MUKARATIRWA, S.; GRUYS, E. Canine transmissible venereal tumour: Cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. **Vet. Quart.**, v. 25, n.3, p.101-111, 2003.
- MULLER, P.A.; CASWELL, P.T.; DOYLE, B.; IWANICKI, M.; TAN, E.; KARIM, S.; LUKASHCHUK, N.; GILLESPIE, D.; LUDWIG, R.; GOSSELIN, P.; CROMER, A.; BRUGGE, J.; SANSOM, O.; NORMAN, J.; VOUSDEN, K. Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. **Cell.**, v.139, p.1327-41, 2009.
- MULLER, P.A.; VOUSDEN, K.H.; NORMAN, J.C. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. **J. Cell. Biol.**, v.192, n.2, p 209-18, 2011.
- MURCHISON, P.E.; WEDGE, D.C.; ALEXANDROV, L.B.; FU, B.; MARTINCORENA, I.; NING, Z.; TUBIO, J.; WERNER, E.; ALLEN, J.; BARBOZA DE NARDI, A.; DONELAN E.; MARINO, G.; FASSATI A.; CAMPBELL P.; YANG F.; BURT A.; WEISS, R.; STRATTON, M., Transmissible Dog Cancer Genome Reveals the Origin and History of an Ancient Cell Lineage. **Sci.**, v. 343, n. 6169, p. 437-440, 2014.
- MURGIA, C.; PRITCHARD, J.K.; KIM, S.Y.; FASSATI, A.; WEISS, R.A. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. **Cell**, v. 126, n. 3, p.477-487, 2006.
- NAK, D.; NAK, Y.; CANGUL, I. T.; TUNA, B. A clinic-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumor in dogs. **J. Vet. Med.**, v. 52, p. 366-370, 2005.
- NIELSEN, S.W.; KENNEDY, P.C. Tumors of the genital systems. In: **Tumors in domestic animals**. 3a edição Editor: Moulton, J.E. University of California Press (Berkeley, Los Angeles, London) (2000)p. 479-517.
- OKAMOTO, Y.; FUJINAGA, T.; TAJIMA, M. Isolation and cultivation of canine transmissible sarcoma cells. **Jap. J. Vet. Sci.**, v.50, n.1, p.9-13, 1998.
- OLIVEIRA, D.K.; QUESSADA, A.M.; MEDEIROS, S.M.; LIMA, C.F.; DOS SANTOS, L.S.; ALVES DE PINHO, F.; BARBOSA, L.R. Transmissible Venereal Tumor Treated with Autochemotherapy. **Acta Sci. Vet.**, v. 41, p.1107, 2013.
- OSHIMURA, M.; SASAKI, M.; MAKINO, S. Chromosomal banding patterns in primary and transplanted venereal tumors of the dog. **J Natl. Cancer. Inst.**, v. 51, p.1197-1203, 1973.

- OSORIO, R.M.; HEFTI, A.; VERTUCCI, F.J., SHAWLEY, A.L. Citotoxicity of endodontic materials. *J. Endodont.*, 24, 91-96, 1998.
- ORTH, J.D.; LOEWER, A.; LAHAV, G.; MITCHISON, T.J. Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in DNA damage and p53 induction. *Mol. Biol. Cell.*, v.23, p-567-576, 2012.
- OZAKI, T.; NAKAGAWARA, A. p53: The Attractive Tumor Suppressor in the Cancer Research Field. *J. Biomed. Biotechnol.*, p13, 2011.
- ÖZALP, G.R.; ZIK, B.; BASTAN, A.; PEKER, S.; ÖZDEMİR-SALC.; BASTAN, I.; DARBAZ, I.; SALAR, S.; KARAKAS, K. Vincristine modulates the expression of Ki67 and apoptosis in naturally occurring canine transmissible venereal tumor (TVT). *Biotech. Histochem.*, v.87, n.5, p. 325–330, 2012.
- PANVICHIAN, R.; ORTH, K.; DAY, M. L.; DAY, K. C.; PILAT, M. J.; PIENTA, K. J. Paclitaxel-associated multimicronucleation is permitted by the inhibition of caspase activation: a potential early step in drug resistance. *Cancer Res.*, v. 58, p.4667-4672, 1998.
- PEDERSEN, L.G; OSTENFELD, M.S.; HANSEN M.H. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. *Cancer Res.*, v.67, n. 5, p. 2217-2225, Mar. 2007.
- PEREIRA, J.S.; SILVA, A.B.; MARTINS, A.L. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumor. *Veterinary Ophthalmology.*, v.3, n.1. p.43-47, 2000. *Cancer Res.*, v.67, p. 2217-2225, 2007.
- PÉREZ, J.; BAUTISTA, M.J.; CARRASCO, L.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; PUPA, S.M.; MENARD, S.; FORTI, S.; TAGLIABUE, E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J. Cell. Physiol.*, v.192, p.259–67, 2002.
- PÉREZ, J.; DAY, M.J.; MOZOS, E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 64, n. 2, p. 133-147, 1998.
- RAMOS-VARA, J.A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B.; CHELACK, B.; CZUB, S.; PIERO, F.D.; DIAL, S.; EHRHART, E.J.; GRAHAN, T.; MANNING, L.; PAULSEN, D.; VALLI, V.E.; WEST, K. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.20, p. 393-413, 2008.

- REIXE, O.; FOJO, T. Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient? *Clin. Cancer Res.*, v. 13, p. 7280–7287, 2007.
- RIVLIN, N.; BROSH, R.; OREN, M.; ROTTER, V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Gene Cancer*, v. 2, n. 4, p. 466-474. 2011.
- ROGERS, K.S. Transmissible venereal tumour. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v.19, n.9, p.1036-1045, 1997.
- ROGERS, K.S.; WALKER, M.A.; DILLON, H.B. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.34, n.6, p.463- 470, 1998.
- ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat. Res.*, v. 6, n. 3, p.317-320, 2003.
- SANDUSKY, G.E.; CARLTON, W.W.; WIGHTMAN, K.A. Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. *Vet. Path.*, v.24, n.6, p.495-499, 1987.
- SAID, R.A.; SILVA, L.F.; ALBUQUERQUE, AROL.; SOUSA- NETA, E.M.; LAVINSKY, M.O. **Efficacy and side effects of vincristine sulfate treatment on canine transmissible venereal tumor**. In Proceeding of the 34th World Small Animal Veterinary Association, July 21-24, Sao Paulo, Brazil. 2009. [Online]. Available from: <http://s.plx?CID=WSAVA2009&Category=&PID=53794&0=Generic> [Jul 10, 2014].
- SANO, J.; OGUMA, K.; KANO, R.; YAZAWA, M.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. High expression of Bcl-xL in delayed apoptosis of canine neutrophils induced by lipopolysaccharide. *Res. Vet. Sci.*, v. 78, p. 183–187, 2005.
- SANTOS, F.G.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, J.E.; CASSALI, G.D.; PAIXÃO, T.A.; MORO, L. O tumor venéreo transmissível canino - aspectos gerais e abordagens moleculares (revisão de literatura). *Bioscience J.*, v. 21, n.3, p.41-53, 2005.
- SERVÍN, S.A.; MARTÍNEZ, S.; ALARCON, E.C.; FAJARDO, R. TP53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor. *J. Vet. Sci.*, v.10, n.4, p. 353-355, 2009.
- SENOVILLA, L.; VITALE, I.; GALLUZZI, L.; VIVET, S.; JOZA, N.; YOUNES, A.B.; RELLO-VARONA, S.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. p53 represses the

polyploidization of primary mammary epithelial cells by activating apoptosis. **Cell Cycl.**, v. 8, p. 1380–1385, 2009.

SHI, J.; ORTH, J. D.; MITCHISON, T. Cell type variation in responses to antimetabolic drugs that target microtubules and kinesin-5. **Cancer Res.**, v. 68, p.3269-3276. 2008.

SHING, F. L.; JEE, Y.J.; RU, C. L.; FANG, N.T.; HSING, C.L.; JUNG, M.H.; TING, Y.H; CHING, L.C. Expression Analysis of Apoptosis-related Markers TP53, BCL-2, BAX and c-MYC in Female Genital Tract Sarcomas. **J. Chin. Med. Assoc.**, v.71, n. 12, p. 628-634, 2009.

SIDDLE, H.V.; KAUFMAN, J. A tale of two tumours: Comparison of the immune escape strategies of contagious cancers. **Mol. Immunol.**, v. 55, p. 190– 193, 2013.

SILVERMAN, J.A.; STEVEN R. MARQUIBO (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. **Cancer Chem. Pharm.**, v. 71, p.555–564, 2013.

SOBRAL, R.A.; TINUCCI-COSTA, M.; CAMACHO, A. Ocorrência do tumor venéreo transmissível em cães na região de Jaboticabal, Brasil. **Ars. Veterinária.**, v.14, n.1, p.110, 1998.

SOTO, C.V. **Caracterización del efecto anticanceroso e identificación de dianas moleculares de principios activos procedentes de *serrata marcescens***. 2007, p. 252. (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

SOUSSI, T.; B'EROUD, C. –Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. **Nat. Ver. Can.**, v.1, n.3, p. 233–240, 2001.

SOUSA, J.; SAITO, V.; NARDI, B.; RODASKI, S.; GUERIOS, S.; BACILA, M. Características e incidência do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães e eficiência da quimioterapia e outros tratamentos. **Arch. Vet .Sci.**, v.5, p.41-48, 2000.

STETTNER, N.; BRENNER, O.; EILAM, R.; HARMELIN, A. Pegylated liposomal doxorubicin as a chemotherapeutic agent for treatment of canine transmissible venereal tumor in murine models. **J. Vet. Med. Sci.**, v.6, n.11, p. 1133-1139, 2005.

STEINGOLD, S.F.; SHARP, N.J.; MCGAHAN, M.C.; HUGHES, C.S.; DUNN, S.E.; PAGE, R.L. Characterization of canine MDR1 mRNA: its abundance in drug resistant cell lines and in vivo. **Anticancer Res.**, v.18, p. 393–400, 1998.

STOCKMANN, D.; FERRARI, H.; ANDRADE, A.; CARDOSO, T.; LUVIZOTTO, M. Detection of the tumour suppressor gene *TP53* and expression of p53, Bcl-2 and p63 proteins in canine transmissible venereal tumor. **Vet. Comp. Oncol.**, v.9, n.4, p. 1-9, 2011a.

- STOCKMANN, D.; FERRARI, H.; ANDRADE, A.; LOPES, A.; CARDOSO, T.; LUVIZOTTO M. Canine Transmissible Venereal Tumors: Aspects Related to Programmed Cell Death. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v.4, n.1, p. 67-75, 2011b.
- SUDJAIDEE, P.; THEEWASUTRAKUL, P.; TECHARUNGCHAIKUL, S.; PONGLOWHAPANL, S.; CHATDARONG, K. Treatment of Canine Transmissible Venereal Tumor Using Vincristine Sulfate Combined with L-Asparaginase in Clinical Vincristine-resistant Cases: A Case Report. *Thai. J. Vet. Med.*, v. 42, n.1, p.117-122, 2012.
- SUI, X.; JIN, L.; HUANG, X.; GENG, S.; HE, G.; HU, X. p53 signaling and autophagy in cancer A revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. *Autophagy*, v 7, n. 6, p. 565-571, 2011.
- SULOVA, Z.; MISLOVIC-OVA, D.; GIBALOVA, L.; VAJC-NEROVA, Z.; POLAKOVA, E.; UHRIK, B.; TYLKOVA, L.; KOVAROVA, A.; SEDLAK, J.; BREIER, A. Vincristine-induced overexpression of P-glycoprotein in L1210 cells is associated with remodeling of cell surface saccharides. *J. Proteome Res.*, v.8, p.513-520, 2009.
- SUZUKI, K.; MATSUBARA, H. Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. *J. Biomed. Biotechnol.*, p 2-7, 2011.
- SZAKÁCS, G.; PATERSON, J.; LUDWIG, J.; BOOTH-GENTHE, C.; GOTTESMAN, MICHAEL. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev.*, v. 5, p. 219-234, 2006.
- TANAKA, M.N.; CASTILHO DE FARIA, M.S.; PEREIRA, L. S.; ARAÚJO, C.R.; KEMPER, B.; GONÇALVES, R.C.; DA SILVA, R.C.; PADILHA, F.N.; TRAPP, S. M.; HEADLEY, A.S. Atividade do sulfato de vincristina em cultivos primários de tumores mamários caninos. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.*, v. 11, n. 1, p. 87-96, 2013.
- TINUCCI-COSTA, M. Canine transmissible venereal tumor. *Rev. Educ. Cont. CRMV-SP.*, v.2, n.3, p.46-52, 1999.
- THOMAS, H.; COLEY, H. Overcoming multidrug resistance in cancer: An update on the clinical strategy of inhibiting p -glycoprotein. *Canc. Cont.*, v.10, p.159-165, 2003.
- TOMITA, Y.; MARCHENKO, N.; ERSTER, S.; NEMAJEROVA, A.; DEHNER, A.; KLEIN, C.; PAN, H.; KESSLER, H.; PANCOSKA, P.; MOLL, U. WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J. Biol. Chem.*, v.281, p. 8600–8606, 2006.

- TOPHAM C.H.; TAYLOR, S.S. Mitosis and apoptosis: how is the balance set? **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.25, p.780–785, 2013.
- TSUJIMURA, S.; TANAKA, Y. Treatment strategy based on targeting P-glycoprotein on peripheral lymphocytes in patients with systemic autoimmune disease. **Clin. Exp. Nephrol.**, v. 16, p.102–108, 2012.
- UPRETI, M.; CHU, R.; GALITOVSKAYA, E.; SMART, S.K.; CHAMBERS, T.C. Key role for Bak activation and Bak-Bax interaction in the apoptotic response to vinblastine. **Mol. Cancer Ther.**, v.7, p. 2224–2232, 2008.
- VANDER, K. H; MÜRDTER T.E.; SONNENBERG,M.; MCCLELLAN, M.; GUTZEIT, S.; GERTEIS, A.; SIMON, W.; FRITZ, P.; AULITZKY, W. E. Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact environment. **BMC Cancer**, v. 6, n. 86, p. 1-11, 2006.
- VARASCHIN, M.; WOUTERS, V.; SOARES, T.; TOKURA, V.; DIAS, M. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais: formas de apresentação clinicopatológicas. **Rev. Clín. Vet.**, v.32, p.40- 48, 2001.
- VÁZQUEZ, M.; MARTÍNEZ, S.; ALARCON, C.; LAGUNES, L.; FAJARDO, R. The T963C mutation of TP53 gene does not participate in the clonal origin of canine TVT **Vet. Res. Commun.**, v. 32, p.187–191, 2008.
- VERISSIMO, C.S.; CHENG, J.C.; PUIGVERT, Y.Q.; VROON, A.; DEUTEKOM, J.; PRICE, L.S.; DANEN, H.J.; WATER, B.; FITZSIMONS, C.P.; VREUGDENHIL, E. Combining Doublecortin-Like Kinase Silencing and Vinca Alkaloids Results in a Synergistic Apoptotic Effect in Neuroblastoma Cells. **J. Pharm. Exp. Therap.**, v. 342, n.1 p.119-130.
- VELDHOEN, N.; STEWART, J.; BROWN, R.; MILNER J. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene.**, v.16, n.2, p. 249-255, 1998.
- WALERYCH, D.; NAPOLI, M.; COLLAVIN, L.; DEL SAL, G. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. **Carcinogenesis.**, v.33, n.11, p.2007-17, 2012.
- WANG, L.G.; LIU, X.M.; KREIS, W.; BUDMAN, D.R. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. **Cancer Chemoth. Pharm.** v. 44, n 55, p.355-361, 1999.
- WARR, J.R.; BAMFORD, A.; QUINN, D.M. The preferential induction of apoptosis in multidrug resistant B cells by 5-fluouracil. **Cancer Lett.**, v.175, p. 39–44. 2002.

WANG, L.; SONG, Y.; ZHENG, W.; JIANG, L.; MA, L.; The association between polymorphisms in the MDR1 gene and risk of cancer: a systematic review and pooled analysis of 52 case–control studies. **Cancer Cell Int.**, v. 13, n.46, 2013.

ZANDVLIET, M.; TESKE, E.; FINK-GREMMELS, J., SCHRICKX, J.A. Multi-drug resistance in a canine lymphoid cell line due to increased P-glycoprotein expression, a potential model for drug-resistant canine lymphoma. **Toxicol. in Vitro.**, v. 28, n 8, p 1498–1506, 2014.

ZHOU, H.; CHEN, J.; MEAGHER, J.; YANG, C.; AGUILAR, A.; LIU, L.; BAI, L.; CONG, X.; CAI, Q.; FANG, X.; STUCKEY, J.; WANG, S. Design of Bcl-2 and Bcl-xL Inhibitors with Subnanomolar Binding Affinities Based upon a New Scaffold. **J. Med. Chem.**, v. 55, p. 4664–4682, 2012.

12. ANEXOS

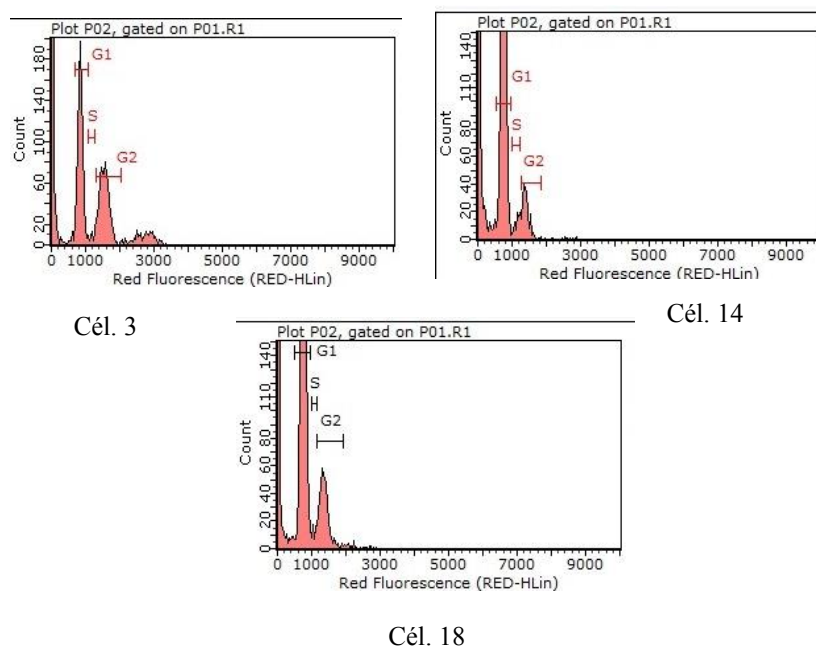
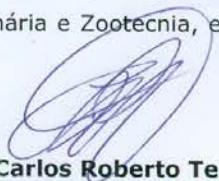


Gráfico 7. Histogramas representativos das populações celulares em G0/G1, S, G2/M.

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa **"Identificação de mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento do tumor venéreo transmissível em cães: Brasil e Colômbia"**, Protocolo nº 223/2011-CEUA, de **Luís Maurício Montoya-Flórez**, aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Doutorado, desta Faculdade, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 07 de outubro de 2011.

**Prof. Ass. Dr. Carlos Roberto Teixeira**

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do procedimento de anestesia geral, citologia e biopsia, referente ao Projeto de Pesquisa titulado: **Expressão dos genes *MDR-1*, *TP53*, *Bcl-2* e *BAX* em tumor venéreo transmissível canino e sua relação com a agressividade e resposta à terapia. Proc 2012/19825-2**; de responsabilidade de Noeme Sousa Rocha-Luis Mauricio Montoya Flórez.

Nome do animal: _____

Nome do Responsável: _____

RG: _____ Data: ____ / ____ / ____

Assinatura: _____

PROTOCOLO SEMIOLÓGICO.

Proyecto: Tumor venéreo transmissível			
Nome do proprietário:		* Caso No:	
Endereço :		Fecha:	
Telefone:			
Dados Animai			
Sexo:	Raça:	Idade:	Peso:
Antecedentes del paciente		observaciones	
Acesso à rua? Sim_ Não_			
Teve contato com outros caes? Sim_ Não_			
Controle reprodutivo? Sim_ Não_			
Emagrecimento progressivo? Sim_ Não_			
Massa hemorrágica? Sim_ Não_			
Massa friável? Sim_ Não_			
Tratamento anti-neoplásico prévio Sim_ Não_			
Crecimiento: Lento__ Rápido __ Estável__			
Tiempo de crecimiento: < 3 semanas_ 3 a 8 semanas_ más de 8 semanas _			
Localização da massa:		Massa única Sem_ Não _	
Tamanho de tumor em cm:			
Valoração de linfonodos Locais:			
Aplicar graduação TNM**			

* Histórico do paciente.

**** Parâmetros TNM em tumor venéreo transmissível.**

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

Descrição de massas adicionais

Antecedentes	Observações
Massa hemorrágica? Sem_ Não_	
Massa friável? Sem_ Não_	
Ordem de aparecimento.	
Crescimento: Lento__ Rápido __ Estabel__	
Tempo de crescimento: < 3 semanas_ 3 a 8 semanas_ más de 8 semanas_	
Localização da massa:	Massa única Sem_ Não_
Tamanho tumor em cm:	
Valoração gânglios locais:	

Seguimiento paciente.

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

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvh.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvh.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvh.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto PV; Franklin Riet-Correa Amialar escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores.

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvh.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvh.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margem (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Insert" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corriqueiramente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priest & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krammer-Froetscher et al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas. Não há traço vertical. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Trabalho a ser enviado para à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Immunocytochemical characterization of primary cell culture in transmissible venereal tumor.

Luis M.M. Flórez^{1,2}, Haline F. Ballesteros¹; Paulo R.O. Bersano^{3,4}; Joao F. Lima⁴,
Fernanda L. Cruz⁵, Ligia S. Mota⁶ and Noeme S. Rocha¹

ABSTRACT- Flórez L.M.M., Ballesteros H.F., Bersano P.R.O., Lima J.F., Cruz F.L. Mota L.S., Rocha N.S. 2014. **Immunocytochemical characterization of primary cell culture in transmissible venereal tumor.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: maomontoya53@yahoo.es

Immunocytochemistry for anti- vimentin, anti-lysozyme, anti-alpha 1 antitrypsin, anti-CD3 and anti-CD79 α has been used for the characterization of primary cell culture in transmissible venereal tumor (TVT). Samples for primary cell culture and immunohistochemistry analyses were taken from 8 dogs with cytological and clinical diagnosis of TVT. To validate immunocytochemical results on primary cell culture of TVT, a chromosome count was made. For statistical analysis Mann-Whitney test at level of $p < 0.05$ was used. TVT tissues and culture cell showed intense immunoreactivity to anti- vimentin, being lightly moderate for anti-lysozyme and anti-alpha-antitrypsin, had mild marking. Finally, negative marking was obtained for CD3 and CD79 α . All culture cells showed chromosomes variable number of 56 to 68. Is the first report on the use of immunocytochemistry characterization in cell culture of TVT. Significant statistical difference between immunocytochemistry in tissue and culture cell was not established, which suggests that the use of this technique may provide greater certainty in the confirmation of tumor in primary culture.

INDEX TERMS: Alpha 1 antitrypsin, cytogenetic, lysozyme, vimentin.

RESUMO.- [Caracterizacão imunocitoquímica de culturas primárias de Tumor venéreo transmissível canino.] Os anticorpos anti-vimentina, anti-lisozima, anti-alfa 1 antitripsina, anti-CD3 e anti-CD79 α foram empregados para a caracterização de culturas primárias de TVT. Amostras para cultura primária e imunohistoquímica foram coletadas de 8 cães com diagnóstico clínico e citológico de TVT. Para validar o resultado imunocitoquímico nas culturas de TVT, foi realizada a contagem de cromossomos. Para análises estatística o teste de Mann-Whitney foi empregado a um nível de significância de $p < 0.05$. As culturas e tecidos de TVT apresentaram intensa reatividade para vimentina, de moderada a leve para Lisozima, moderada para alfa-antitripsina e não houve marcação para CD3 e CD79 α . Finalmente, todas as culturas apresentaram número de cromossomos que variaram de 56 a 68. Este é o primeiro reporte que apresenta o uso da imunocitoquímica para a caracterização de culturas de TVT. Assim, e devido a que não

foi observada semelhança entre a imunomarcção em células e tecidos, sugere-se que o uso desta técnica possa auxiliar a confirmação de culturas primarias do tumor.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: alfa 1 antitripsina, citogenetica, lisozima, vimentina.

Introduction

Transmissible venereal tumor (TVT) is a contagious and sexually transmissible neoplasia of unknown origin. In natural conditions, TVT only affects dogs. However, other species can be infected by its experimental induction. It was primarily studied in 1876 by Novinsky, and later by Smith & Washbourn (Marchal et al. 1997, Rogers, 1997, MacEwen, 2001, Oliveira et al. 2013). Since that time, TVT has been described as a transmissible and transplantable tumor (Booth, 1994, Hasler & Weber, 2000).

This neoplasia has spread worldwide. Nevertheless, a major prevalence is located in tropical and subtropical climates (Ferreira et al. 2000, Varaschin et al. 2001), mainly in countries with large populations of mongrel street dogs (Papazoglou et al. 2001, Strakova & Murchison 2014).

The transference of TVT among dogs has been equally found, no matter gender, either by implantation of viable tumor cells in mucous membranes during coitus, or by scratching, licking, biting or smelling of a carrier animal (Varaschin et al. 2001, Ganguly et al. 2013). Besides genital contact, TVT also may have an extra-genital localization (Pereira et al. 2000, Rodrigues et al. 2001, Albanese et al. 2002, Siddle & Kaufman 2013). TVT usually is restricted to disease points of origin and implantation, except in rare cases, around 2,5 % (Pandey et al. 1989) where invades adjacent tissues, lymphatic and/or blood circulation, and reaches distant areas such as lungs, liver, spleen, brain and other organs as metastatic deposits (Meuten 2000, Jubb et al. 2007, Ganguly et al. 2013).

Moreover, multiple subcutaneous masses have been reported (Kroger et al. 1991). The tumor has a unique behavior showed by the usual occurrence of spontaneous regression in adults. However, in newborns and immunocompromised dogs, it becomes metastatic and, consequently, fatal (Cohen 1973, Yang & Jones 1973, Ganguly et al. 2013).

In previous studies conducted at the Laboratory of Investigative Pathology FMVZ Botucatu, some TVTs presented fewer DNA breaks (Amaral et al. 2011), larger nucleolar sizes (Amaral 2005), a high reactivity of Ki67 (MBI-1) (Gaspar 2005), higher proportion of metastases (Amaral et al. 2007), and increased expression rates of p-glycoprotein (Gaspar et al. 2010).

According to Bassani-Silva et al. (2007), at exposing TVT cells to extracts of propolis in vitro, some became resistant. Likewise, when comparing malignant cell response to chemotherapy, those from TVT was significantly less sensitive to this treatment (Gaspar et al. 2009, Gaspar et al. 2010).

In this case, such features could be an indication of different forms of TVT presentation (Fonseca et al. 2012), which makes to conclude that it has varying degrees of aggressiveness and unlike cellular lineages (Roger et al. 1998, Montoya et al. 2012), with variable biological behavior (Roger et al. 1998). This also

demonstrates the need for a specific treatment for each tumor, which would minimize cost and collateral effects by avoiding an excessive application of chemotherapy.

Thereby, a direct consequence of the above mentioned is the higher number of chemotherapy applications required to obtain initial regression (Gaspar et al. 2010). This results in increasing costs for owners and of side effects in animals such as anorexia, myelosuppression and nephrotoxicity. Thus, further research is required to confirm the hypothesis related to this condition.

Primary cell culture is one of the fast ways to study TVT behavior. Studies based on experimental primary cell are consistent with similar situations next to *in vivo*, which differ from those observed in immortalized cell lines represented by uniform cells with well-defined characteristics. (Loukopoulos et al. 2004, Hasegawa et al. 2008, Jähn et al. 2010). In this respect, TVT could help to advance in the research of molecular events associated with the initiation, progression and chemotherapy.

However, despite the existence of researches in primary cell culture of TVT, no work related to its immune characterization was found. This makes it necessary in order to facilitate cell culture identification of tumor. For this reason, the present investigation aims to isolate and characterize cell culture primary of TVT by immunocistochemistry.

Material and Methods

The study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Faculty of Veterinarian Medicine, São Paulo State University (UNESP) Brazil. Eight dogs with cytological and clinical diagnosis of TVT were selected from the Hospital of Veterinary Medicine, UNESP, independently of breed, sex and age. Two samples were taken from each dog, one for cell culture, and the other for immunohistochemistry analyses. Specimen owners were informed about study procedures. In addition, no dog had received any prior therapy.

Primary Cell Culture

Immediately following biopsy, specimens of TVT were collected in culture medium, washed in sterile phosphate buffered saline (PBS), and minced into small fragments (<1 mm³) in a sterile environment. Tissue fragments were then digested at 37°C for 60 min containing trypsin. After digestion, the lysate was centrifuge at 250 g for 10 min. The resulting pellet was suspended in DMEM (Dulbecco's Modified Essential Médium-Gibco Life Technologies Corporation, Carlsbad, California), and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 µg/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 3 µg/mL Amphotericin (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California). Cells were plated in 25 cm² tissue culture flasks, and then cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Culture medium was renewed twice weekly.

Immunohistochemistry and immunocytochemistry

The slides were rinsed 3x with Tris pH7.0 and incubated "overnight" with primary antibodies for Anti-vimentin, Anti-lysozyme, Anti-Alpha-1-Antitrypsin, Anti-CD3, Anti-CD79α (table 1). The reaction product was visualized with a polymer based technology HiDef® Detection HRP System (Cell Marque®). The slides were revealed with chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and counter-stained with Harris hematoxylin.

Immunocytochemical analyses was performed on cell culture, first hydrated and permeabilized. Then, after blocking the peroxidase endogenous, immunochemical steps were conducted.

Negative controls were prepared by substituting specific primary antibodies with antibody diluent (Novocastra®). Positive controls were set with liver for Anti-Lysozyme, Anti-Alpha-1- Antitrypsin, Lymphatic node for Anti-CD3, CD79 α and heart for Anti-vimentin.

To identify and quantify the expression of the reaction rate, samples were subjected to a semi-quantitative method as follows: 1 = < 25% labeled cells; 2 = 26-50%; 3 = 51-75%; 4 = >75%; were considered, respectively, 1 = unmarked; 2 = slightly marked; 3 = moderate, and finally, 4 = with intense staining. 100 cells were counted for each slide (Amaral et al., 2005).

Images were captured with a Carl Zeiss optical microscope, Lab.A1, Germany, 10X and 40X objectives, and processed by AxioVision 4.8 software. In all cases, immunohistochemistry evaluation was made by two pathologists.

Cytogenetic Analysis.

To validate immunochemical results on primary cell culture of TVT, a chromosome count was made. Colchicine was added at a final concentration of 0.2 Mg/ml after 18 hours of incubation. Following 2 hours of reincubation, cells were harvested by treatment based on a versene solution. Cell cultures were then treated with a hypotonic citrate solution. Air-dried preparations were made and stained with 2% acetic orcein and, finally, examined.

Statistical Analysis.

The comparison of immunohistochemistry in tissue and immunocytochemistry in cell culture was done by using the Mann-Whitney test at level of $p < 0.05$.

Results

TVT tissues showed intense immunoreactivity to anti-vimentin, greater than 90% of the cells. For anti-lysozyme, immunoreactivity was 79% of the total labeled tissue, being lightly moderate in 29% and 50%. In the case of anti-alpha-antitrypsin, 55% had mild tissue marking. Finally, negative marking was obtained for CD3 and CD79 α (Figures 1: A to D, Graphic 1).

On the other hand, 8 cultures, one from each dog, were isolated, (Figure 2). All showed positive staining in 100% of cases to vimentin, of which 75% of the cells presented intense immunoreactivity, and 25% moderate. For lysozyme, 87% of the cultures were marked 25% mild, and 62% moderate. For alpha-antitrypsin, 75% of the cultures had mild marking.

Finally, all cultures were negative for CD3 and CD79 α (Figure 3: A to D. Figure 2. There were no statistical differences between immunohistochemical and immunocytochemical expression ($p > 0.05$).

In all isolated cultures, a counting of chromosomes was carried out. All cells showed variable number of 56 to 68. None of them exhibited the same number of somatic cells of dogs, as demonstrated in Figure 4.

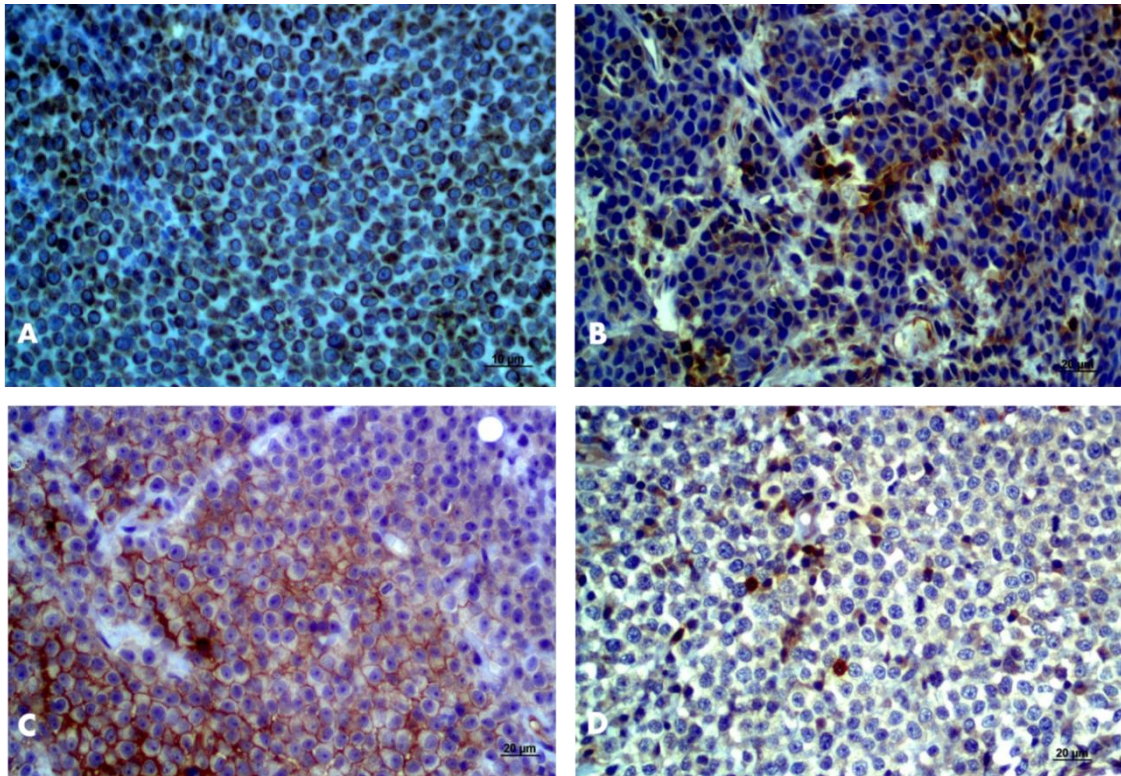


Fig 1. **A.** TVT positive for vimentin, greater than 90%. 20x obj., bar: 10 μ m. **B.** Moderate positivity for lysozyme. 40x obj., bar: 20 μ m. **C.** Moderate positivity for alpha-antitrypsin. 40x obj., bar: 20 μ m. **D.** Lack of tumor cell positivity for CD3, CD79 α (See lymphocyte marking), 40x obj., bar: 20 μ m. Chromogen 3'3 diaminobenzidine (DAB), nuclear counterstaining with Harris hematoxylin.

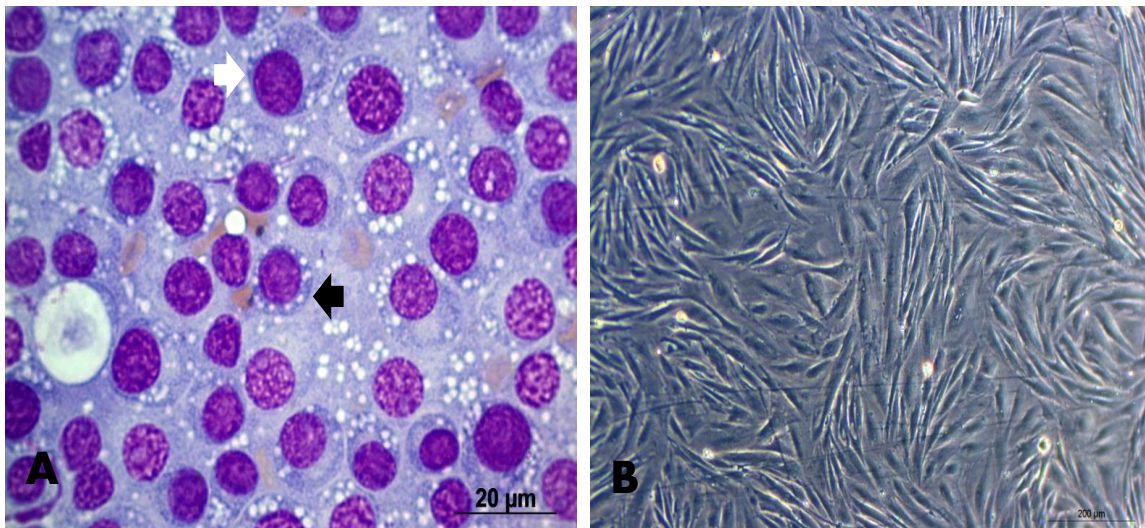


Fig 2. **A.** TVT cells, lymphocytoid standard (round cells, little cytoplasm and high nucleus:cytoplasm ratio), black arrow. Standard plasmacytoid (ovoid cells, broad cytoplasm and eccentric nuclei) white arrow, 40x obj. **B.** TVT cell culture, third passage. Bar: 200 μ m.

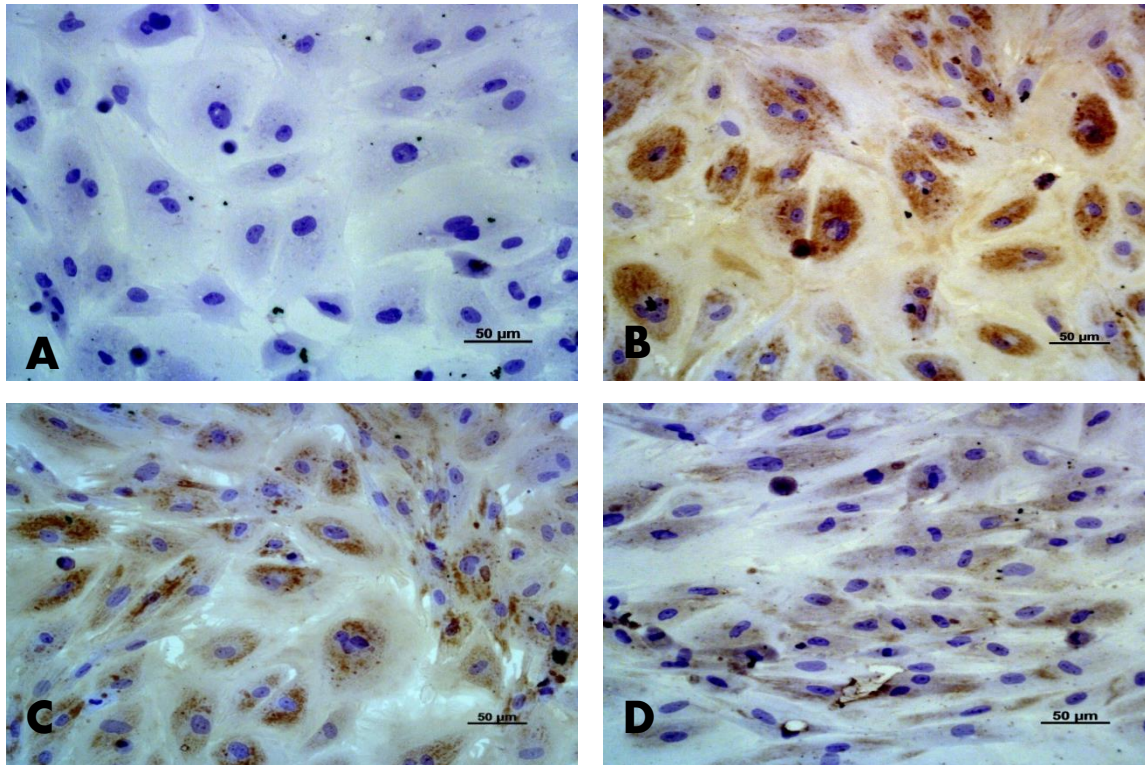


Fig 3. A. TVT cell cultures, CD3 (-), 20x obj. B. Lysozyme (+), 20x obj. C. Vimentin (+), 20x obj. D. Alpha antitrypsin (+), Chromogen 3'3 diaminobenzidine (DAB), nuclear counterstaining with Harris hematoxylin, 20x obj., bar: 50µm.

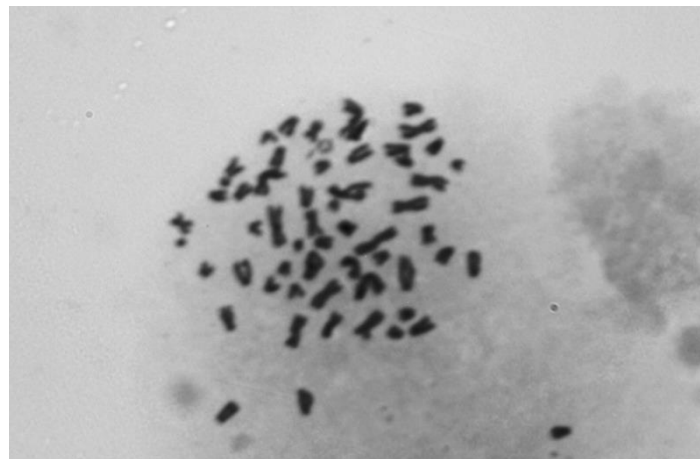


Fig. 4. TVT metaphases in cell culture. Chromosome number is less than 78.

Discussion

TVT has been subject of several studies over the time. However, further research is still needed to better identification of mechanisms related to its strength and aggressiveness.

In vitro culture of tumor tissues is, especially, an interesting model to identify and evaluate tumor biology because cells retain certain characteristics of tissue *in vivo*. Moreover, the system provides quick access to drug efficacy and presents relevant information to identify potential response as anticancer medicine in the complex microenvironment of tumor tissue (Vander Kuip et al. 2006).

TVT primary culture provides an opportunity to study mechanisms and extrapolate different elements of information to the tumor *in vivo*. Thus, in the present study, an antibody panel was used to assist in the identification of primary tumor cultures. In summary, 8 primary cultures were set to these purposes.

Once isolated, the entire primary culture must be characterized in TVT. Despite having been isolated several times (Adams et al. 1968 Mohanty & Rajya 1977, Okamoto et al. 1988, Beschorner et al. 1979 Bassinli-Silva et al. 2007), the identification of such tumor cells is based on the establishment of cell karyotype (Oshimura et al. 1973; Mukaratirwa & Gruys 2003). In addition, immunocytochemistry was used in this research to define possibilities of identifying isolated cells from tumor as belonging to itself.

From a clinical point of view, TVT cells have been usually characterized through markers such as vimentin, lysozyme, alpha-antitrypsin (Moore & Rosin 1986. Sandusky et al. 1987, Mozos et al. 1996, Marcha et al. 1997, Pereira et al. 2000, Morris et al. 2002, Mukaratirwa & Gruys, 2003, Araujo et al. 2012, Mascarenhas et al. 2014). For this reason, these antibodies were firstly considered to characterize TVT primary cultures.

At first, the chosen panel showed compatibility to the results reported in the scientific literature (Pereira et al. 2000, Morris et al. 2002, Mukaratirwa & Gruys 2003, Araujo et al. 2012, Mascarenhas et al. 2014). In fact, the phenotypic profile presented by the authors to identify the TVT cells can be considered as an auxiliary method in the definitive diagnosis of the tumor.

When compared primary cultures to immunocytochemical features of TVT, a similar statistical profile of tissues was observed. Moreover, expression of vimentin, and alpha-antitrypsin lysozyme enables to identify cells coming from TVT, as described in the literature, since these markers have helped in a high number of cases to establish a differential diagnosis (Mukaratirwa & Gruys 2003; Mozos et al. 1996).

In TVT tissues, the use of such markers excluded other types of round cell tumors, such as lymphomas, melanomas amelanotic melanomas, carcinomas poorly differentiated, and masctocitomas. However, some authors described similar immunostaining in histiocytomas. In this case, differential diagnosis is based on clinical and histopathological criteria (Mozos et al. 1996, Ramos et al. 2008).

Finally, analyzed tissues and cells of TVT displayed no immunoreactivity for CD3 and CD79 α . Nevertheless, concerning tissues, lymphocyte immunostaining was observed during tumor infiltration. Data already observed in other studies also support this issue (Mozos et al. 1996, Marchal et al. 1997, Mukaratirwa & Gruys, 2003, Araujo et al. 2012.).

In the cultures, marking for these antibodies was not found. This was expected because in cultures "in vitro", lymphocytes and other inflammatory cells lack adhesion, being deleted during the change of medium.

To validate the immunostaining results in primary cultures, the karyotype of TVT cells was assessed. At the end, in all cases, chromosome number resulted less than 78, which was characterized as TVT cells.

These data corroborate what different authors describe: the chromosome number in cell cultures TVT may present a wide variation between 46 and 67 (Adams et al. 1968, Oshimura et al. 1973, Mukaratirwa & Gruys 2003, Murchison et al, 2014). Therefore, the results allowed concluding that isolated cells are from TVT.

Likewise, the authors of this research consider these findings as innovative and unpublished, also highlighting the antibody panel as a useful tool for TVT primary cultures to identify cells as coming from the same tumor. These finding would eventually contribute to veterinary oncology investigation.

Conclusion

This paper is the first report on the use of immunocytochemistry in cell culture of TVT. Significant statistical difference between immunochemistry in tissue and culture cell was not established, which suggests that the use of this technique may provide greater certainty in the confirmation of tumor in primary culture.

Acknowledgements

Financial Support: Foundation of support to the research of São Paulo estate FAPESP.

References

- Adams E.W., Carter L.P., Sapp W.J. 1968. Growth and maintenance of the canine venereal tumor in continuous culture, Cancer. Res. Baltimore. 28:753-757.
- Albanese F., Poli A., Millanta F. 2002. Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with *Leishmania*-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin?. Vet. Dermat. 13:243-246.
- Amaral A.S., Bassani-Silva S., Ferreira I., Fonseca L.S. Andrade F.H., Gaspar L.F., Rocha N.S. 2007. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. Rev. Port. Ciên. Vet. 103:563-564.
- Amaral A.S., Ferreira I., Colodel M.M., Fávero D.M., Rocha N.S. 2011. DNA damage in canine transmissible venereal tumor. Rev. Lus. Ciên. Med. Vet. 4: 1-5..
- Amaral A.S. Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA. 2005, 228p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Araújo M.R., Preis I.S., Lavallo G.E., Cassali G.D., Ecco, R. 2012. Histomorphological and immunohistochemical characterization of 172 cutaneous round cell tumours in dogs. Pesq. Vet. Bras. 32(8):772-780.
- Bassani-Silva S., Sforcin J.M., Amaral, A.S. Rocha N.S. 2007. Propolis effect in vitro on canine transmissible venereal tumour cells. Rev. Port. Ciên Vet. 102:261-265.

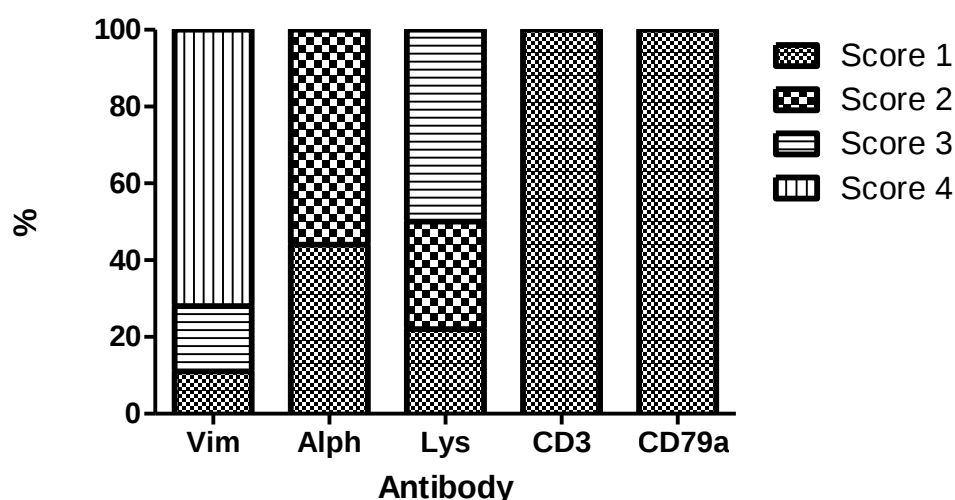
- Beschorner W.E., Hess A.D., Nerenberg S.T. 1979. Isolation and characterization of canine venereal tumor-associated inhibitory and blocking factors. *Cancer. Res.* Baltimore. 39(10):3920-3927.
- Booth M.J. 1994. Canine transmissible venereal tumour and ovarian papillary cystadenocarcinoma in a bitch. *J. Small Anim. Pract.* 35(1):39-42.
- Cohen D. 1973. The biological behavior of the canine transmissible venereal tumour in immunosuppressed dogs. *EUR j. Cancer.* 9:253-258.
- Ferreira A.J., Jaggy A., Varejão A.P. 2000. Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. *J. Small Anim. Pract.* 41(4):165-168.
- Fonseca L.S., Mota L.S., Colodel M.M., Rocha N.S. 2012. Spontaneous Canine Transmissible Venereal Tumor: association between different phenotypes and the insertion LINE-1/c-myc. *Rev. Col. Cien. Pec.* 25:402-408.
- Ganguly B., Das U., Das K. 2013. Canine transmissible venereal tumour: a review. *Vet. Comp. Onc.* 11(4):1-12.
- Gaspar L.F., Amaral A.S., Bassani-Silva S., Rocha N.S. 2009. Imunorreatividade à glicoproteína-p nos diferentes tipos citomorfológicos de tumor venéreo transmissível canino. *Vet. em Foco.* 6(2).
- Gaspar L.F., Ferreira I., Colodel, M.M., Rocha N.S. 2010. Spontaneous canine transmissible venereal tumour: cell morphology and influence on p-glycoprotein expression. *Turkish J Vet. Anim. Sci.* 34:447-454.
- Gaspar LFJ. Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com danos citogenéticos, taxa de proliferação e resposta clínica à quimioterapia. Botucatu, Brasil: Universidade Estadual Paulista, 2005, 143p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- Hasegawa Y., Shimada K., Suzuki N. 2008. The in vitro osteogenic characteristic of primary osteoblastic cells from a rabbit calvarium. *J. Oral Sci.* 50:427-434.
- Hasler A.H., Weber W.T. 2000. Theriogenology question of the month. Transmissible venereal tumour (TVT). *J Am. Vet. Med. Assoc. Schaumburg*, v.216, n.10, p.1557-1559, maio. Errata: Theriogenology question of the month. *Journal of American Veterinary Medical Association, Schaumburg.* 217(1):42.
- Jähn K., Richards R., Archer C., Stoddart M. 2010. Pellet culture model for human primary osteoblasts. *Eur. Cells Mater.* 20:149-161.
- Jubb K.V.F.; Kennedy, P.C & Palmer, N. editado por Maxie, G. *Pathology of Domestic Animals. Nervous system.* 2007, Vol 1 7th ed. Elsevier Health Sciences. p415.
- Kroger D., Grey R.M., Boyd J.W. 1991. An unusual presentation of canine transmissible venereal tumour. *Canine Pract.* 16 (6):17-21.
- Loukopoulos P., O'Brien T., Ghoddusi B.A., Mungall D., Robinson, W.F. 2004. Characterisation of novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. *Res. Vet. Sci.* 77:131- 141.
- Macewen, E.G. Transmissible venereal tumour. In: Withrow, S.J., Macewen, E.G. 3th ed. *Small animal clinical oncology.* Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p.651-656.
- Marchal T., Chabanne L., Kaplanski. 1997. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57(1/2):1-11.
- Mascarenhas M.B., Peixoto P.V., Ramadinha R.R., Yamasaki E.M., Costa S.Z., Driemeier D., Sonne L., França. 2014. Immunohistochemical study of genital and extragenital forms of canine transmissible venereal tumor in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 34(3).250-254.

- Meuten D.J. Tumours in Domestic Animals. London: University of California Press, 4th ed., p.115-117;435;572, 2000.
- Moore P.F., ROSIN, A. 1986. Malignant histiocytosis of Bernese mountain dogs. *Vet. Pathol.* 23(1):1-10.
- Mohanty G.C., Rajya B.S. 1977. Growth and morphological characteristics of canine venereal tumor cell in vitro. *Vet. Path.* 14(4):420-425.
- Montoya F.L., Pedraza F.J., Grandi F., Rocha N. 2012. Cytologic subtypes of canine transmissible venereal tumor. *Vet. Clin. Pathol.* 41(1):4-5.
- Morris J.S., McInnes E.F., Bostock D.E., Hoather T.M., Dobson J.M. 2002. Immunohistochemical and histopathologic features of 14 malignant fibrous histiocytomas from flat-coated retrievers. *Vet. Path.* 39:479-499.
- Mozos E., Méndez A., Gómez-Villamandos J.C., Martín De Las Mulas, J., Pérez J 1996. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. *Vet. Path.* 33:257-263.
- Mukaratirwa S., Gruys E. 2003. Canine transmissible venereal tumour: Cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *Vet. Quart.* 25(3):101-111.
- Murchison P.E., Wedge D.C., Alexandrov L.B., Fu B., Martincorena I., Ning Z., Tubio J., Werner E., Allen J., Barboza De Nardi, A., Donelan E., Marino G., Fassati A., Campbell P., Yang F., Burt A., Weiss R., Stratton M. 2014. Transmissible Dog Cancer Genome Reveals the Origin and History of an Ancient Cell Lineage. *Sci.* 343 (6169):437-440.
- Okamoto Y., Fujinaga T., Tajima M. 1988. Isolation and cultivation of canine transmissible sarcoma cells. *Jap. J. Vet. Sci.* 50(1):9-13.
- Oliveira D.K., Quessada A.M., Medeiros S.M., Lima C.F., Dos Santos L.S., Alves De Pinho F., Barbosa L.R. 2013. Transmissible Venereal Tumor Treated with Autochemotherapy. *Acta Sci. Vet.* 41:1107.
- Oshimura M., Sasaki M., Makino S. 1973. Chromosomal banding patterns in primary and transplanted venereal tumors of the dog. *J Natl. Cancer. Inst.* 51:1197-1203.
- Pandey S.K., Chandrapuria V.P., Bhargava M.K., Tiwari S.K. 1989. Incidence, treatment approach and metastasis of canine transmissible venereal sarcoma. *Indian J. Anim. Sci.* 59:510-513,
- Papazoglou L.G., Koutinas A.F., Plevraki A.G. 2001. Primary intranasal Transmissible Venereal Tumour in the dog: a retrospective study of six spontaneous cases. *J. Vet. Med. Series A.* 48(7):391-400.
- Pereira J.S., Silva A.B., Martins A.L. 2000. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumour. *Vet. Ophthal.* 3(1):43-47.
- Ramos-Vara J.A., Kiupel M., Baszler T., Bliven L., Brodersen B., Chelack B., Czub S., Piero F.D., Dial S., Ehrhart E.J., Grahan T., Manning L., Paulsen D., Valli V.E., West K. 2008. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20:393-413.
- Rodrigues G.N., Alessi A.C., Laus J.L. 2001. Intraocular transmissible venereal tumour in a dog. *Ciê n Rural, Santa Maria.* 31(1):141-143.
- Rogers K.S. 1997. Transmissible venereal tumor. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.* Princeton Jun. 19(9):1036-1045.
- Rogers K.S., Walker M.A., Dillon H.B. 1998. Transmissible venereal tumour: a retrospective study of 29 cases. *J. Ame Anim Hosp. Assoc.* 34(.6):463-470.

- Sandusky G.E., Carlton W.W., Wightman K.A. 1987. Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. *Vet. Path.* 24(6):495-499.
- Siddle H.V., Kaufman J. 2013. A tale of two tumours: Comparison of the immune escape strategies of contagious cancers. *Mol. Immunol.* 55:190– 193.
- Strakova A., Murchison E.P. 2014. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour *BMC Vet. Res.*10:168.
- Yang T.J., Jones J.B. 1973. Canine transmissible venereal sarcoma – Transplantation studies in neonatal and adult dogs. *J. Nat. Cancer institute.*51:1915-1918.
- Van Der Kuip H., Mürdter T.E., Sonnenberg M., McClellan M., Gutzeit S., Gerteis A., Simon W., Fritz P., Aulitzky W.E. 2006. Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact environment. *BMC Cancer.* 6(86):1-11.
- Varaschin M.S., Wouters F., Bernins V.M. 2001. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais; formas de apresentação clínico-patológicas. *Clín Vet.* 6(32):32-38.

Table 1. Specific antibody for the characterization of TVT

Antibody	Code	Dilution ratio	Manufacturer	Type of antibody
Anti-CD79a	A045201-2	1:100	Dako, EUA	Monoclonal
Anti-CD3	A045201-2	1:100	Dako, EUA	Policlonal
Anti-Lysozyme	A009902-2	1:300	Dako, EUA	Policlonal
Anti-Alpha-1-Antitrypsin	N153330-2	1:300	Dako, EUA	Policlonal
Anti-vimentin	U7034	1:100	Dako, EUA	Monoclonal



Graphic 1. Distribution of the immunoreactivity levels for the antibody panel used to characterize TVT tissue.

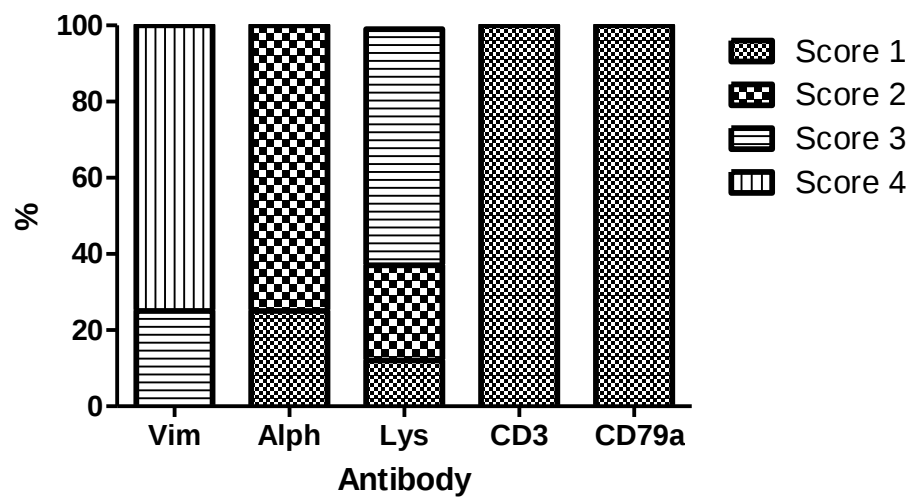


Gráfico 2. Distribution of the immunoreactivity levels for the antibody panel used to characterize TVT cells.