

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

**COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL
CANINO: ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE MMP9, VEGF E CASP9 EM RELAÇÃO
AS CARACTERÍSTICAS DE MALIGNIDADE**

VIVIAN GISEL SUAREZ ARIAS

BOTUCATU - SÃO PAULO - BRASIL

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL
CANINO: ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE MMP9, VEGF E CASP9 EM RELAÇÃO
AS CARACTERÍSTICAS DE MALIGNIDADE**

VIVIAN GISEL SUAREZ ARIAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Medicina Veterinária.

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

Co-Orientadores: Prof. Dr. Mauricio Montoya
Flórez

Prof. Dr. Francisco Javier
Pedraza Ordoñez

FICHA CATALOGRÁFICA

A696c

Arias, Vivian Gisel Suarez

Comportamento biológico do Tumor Venéreo Transmissível Canino: análises da expressão de MMP9, VEGF E CASP9 em relação as características de malignidade / Vivian Gisel Suarez Arias. -- Botucatu, 2024
68 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientadora: Noeme Sousa Rocha

Coorientador: Mauricio Montoya Flórez

1. Cães. 2. Imunohistoquímica. 3. Neovascularização. 4. Metaloproteinases.. 5. Caspases. I. Título.

Nome do Autor: Vivian Gisel Suarez Arias

Título: COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL
CANINO: ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE MMP9, VEGF E CASP9 EM RELAÇÃO AS
CARACTERÍSTICAS GERAIS DE MALIGNIDADE

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª Noeme Sousa Rocha

Orientadora

Departamento de Patologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr Pablo Eduardo Ocampo Ortiz

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

Universidad de Pamplona - Norte de Santander - Colômbia

Prof. Dr Luis Fernando Barbisan

Membro

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

IBB – UNESP – Botucatu

Março de 2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e à minha família, por serem o motor da minha vida. Agradeço à minha mãe, Viviana Arias, por me amar incondicionalmente, à minha tia, Marisol Arias, que está sempre presente, apoiando-me em todos os momentos da minha vida, sejam bons ou maus. Agradeço também à minha conselheira de vida, minha irmã Carolina Suarez, por sempre acreditar em mim e mesmo à distância, encher-me de amor. Expresso minha gratidão aos meus amigos, que permanecem no meu coração, mesmo à distância. Sou grata pelos novos laços que formei com pessoas que tive a fortuna de conhecer neste país maravilhoso. Por fim, agradeço aos meus professores, que sempre me apoiaram, acreditaram no meu conhecimento e meu crescimento acadêmico. Nada disso seria possível sem vocês. ¡Gracias Totales!

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES; 001), processo 88887.761639/2022- 00.

EPÍGRAFE

**"Somos arquitetos do nosso próprio destino,
e todo pensamento é uma pedra
na construção do nosso ser."**

Enrique Barrios

TABELAS

Tabela 1: Dados das informações provenientes da base de dados armazenada no Laboratório de Patologia Veterinária Comparada da FMVZ/UNESP Botucatu.

Tabela 2: Média de critérios de malignidade. A) Critérios de Malignidade Gerais B) Critérios Citoplasmáticos C) Critérios Nucleares.

Tabela 3: Anticorpos utilizados na imunofenotipagem, inclusive o antígeno detectado, a origem, o procedimento de recuperação antigênica, a diluição dos anticorpos e os anticorpos secundários.

Tabela 4: Média as variáveis significativas dos critérios de malignidade comparadas com as categorias citomorfológicas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imunomarcacão de MMP9 no citoplasma das células de TVT. Contra-coloracão com hematoxilina, Objetiva 40×. Barra, 20 μm .

Figura 2. Imunomarcacão de VEGF no citoplasma das células de TVT. Contra-coloracão com hematoxilina, Objetiva 40×. Barra, 20 μm .

Figura 3. Imunomarcacão de CASP9 no citoplasma das células de TVT. Contra-coloracão com hematoxilina, Objetiva 40×. Barra, 20 μm .

Figura 4. Fotomicrografia dos subtipos citomorfológicos do Tumor Venéreo Transmissível: Linfocitoide (seta preta). Plasmocitoide (seta branca). Barra, 10 μm . Coloracão: Giemsa, Objetiva 40×

Figura 5. Fotomicrografia dos critérios de malignidade gerais avaliados no Tumor Venéreo Transmissível: 1 cromatina densa; 2. cromatina frouxa; 3. cromatina granular; 4. cromatina grosseira; 5. macrocariose; 6. corpúsculos linfoglandulares. Todas as barras, 10 μm . Coloracão: Giemsa, Objetiva 40×

Figura 6. Fotomicrografia dos critérios de malignidade citoplasmáticos avaliados no Tumor Venéreo Transmissível: 1. Espessamento da membrana citoplasmática; 2. Célula em girino; 3. Célula em fuso; 4. Projecão citoplasmática. Todas as barras, 10 μm . Coloracão: Giemsa, Objetiva 40×

Figura 7. Fotomicrografia dos critérios de malignidade nucleares avaliados no Tumor Venéreo Transmissível: 1. Binucleacão; 2. Multinucleacão; 3. Hiperchromasia; 4. Vacúolos nucleares; 5. Núcleos *riniformes*; 6. Brotamento nuclear; 7. Lobulações nucleares; 8. Micronucleacão; 9. Halo perinuclear; 10. Mitoses anormais. Todas as barras, 10 μm . Coloracão: Giemsa, Objetiva 40×

Figura 8: Gráficos correspondentes às médias das variáveis significativas dos critérios de malignidade gerais a serem comparadas com as categorias citomorfológicas.

Figura 9: Gráficos correspondentes às médias das variáveis significativas dos critérios de malignidade citoplasmáticos a serem comparadas com as categorias citomorfológicas.

Figura 10: Gráficos correspondentes às médias das variáveis significativas dos critérios de malignidade nucleares a serem comparadas com as categorias citomorfológicas.

Figura 11: Imunomarcação de MMP9 em células de TVT (Caso 13). Contra-coloração com hematoxilina, Objetiva 40×. Todas as barras, 20 μm . Seta preta. Observou-se uma distribuição mais acentuada de MMP9 de forma localizada no citoplasma de algumas células tumorais de TVT.

LISTA DE ABREVIACÕES

ALIX– Proteína X que interage com ALG-2

ATM– Gene supressor tumoral

BCL-2– *B-cell lymphoma 2*

CASP9– Caspase-9

CASPs– Caspases

DAB – Diaminobenzidina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

MB– Membrana Basal

MDR-1– Gene MDR1

MEC– Matriz extracelular

MHC– Complexo de Histocompatibilidade Principal

MMP9– Metaloproteinase de matriz 9

MMPs– Metaloproteinase de matriz

P53– Gene TP53

PCR – Reação em cadeia de polimerase

R– Casos resistentes

RC– Resposta completa

RP– Resposta parcial

TIMP– Inibidores Teciduais de Metaloproteinases

TP53– Gene tumor protein p53

TVT – Tumor Venéreo Transmissível

VCR-LAP– Vincristina-lasparaginase

VEGF– Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
1. Introdução	11
2. Revisão de literatura.....	12
Comportamento biológico de TVT	14
Metaloproteinases de Matriz	17
Fator de crescimento endotelial vascular	19
Caspases	21
3. Objetivo	23
Geral.....	23
Específico	23
4. Referências *	24
CAPÍTULO 2	35
1. Trabalho científico	35
Introdução.....	36
Métodos.....	36
Resultado	42
Discussão.....	44
Referências *	48
Tabelas.....	59
Figuras.....	64

ARIAS, V. G. S. Comportamento biológico do tumor venéreo transmissível canino: análises da expressão de MMP9, VEGF e CASP9 em relação as características de malignidade. Botucatu, 2024. 68 p. Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) é a neoplasia de células redondas mais antiga conhecida, com características plasmocitoides e/ou linfocitoides. Sua singularidade genômica e comportamento biológico versátil o tornaram um excelente objeto de estudo e pesquisa, no entanto, existem áreas sobre o comportamento biológico que necessitam de maiores estudos. O objetivo do trabalho foi analisar critérios citomorfológicos de malignidade do tumor venéreo transmissível, e estabelecer a relação com a expressão da metaloproteinase de matriz 9 (MMP9), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e caspase 9 (CASP9). Portanto, por meio de imuno-histoquímica, foram analisadas 19 amostras de TVT usando anticorpos anti-MMP9, VEGF e CASP9, e os dados obtidos foram comparados com as características citológicas de malignidade gerais, citoplasmáticas e nucleares das amostras analisadas. Realizamos uma análise estatístico utilizando os testes de Tukey-Kramer e de correlação de Spearman, sendo as diferenças com $p < 0,05$ consideradas estatisticamente significativas. Os dados indicam que a expressão de MMP9 no TVT pode estar relacionada com a implantação tumoral, o que possibilita ao tumor criar um ambiente propício para se alojar, nutrir, crescer, regenerar, proteger e promover a propagação de células cancerígenas. Nossos resultados indicam também que a expressão de VEGF no TVT está relacionada com a alta taxa de angiogênese características do tumor, enquanto a imunoexpressão de CASP9 pode estar relacionada com as aberrações cromossômicas das células cancerosas. Foi observada maior expressão de alguns critérios de malignidade no padrão plasmocitoide do TVT, o que pode confirmar a natureza agressiva desse subtipo citomorfológico. Espera-se que os resultados possam contribuir para o entendimento da dinâmica da agressividade do tumor e seu comportamento biológico.

Palavras chaves: Cães; Imunohistoquímica; Neovascularização; Metaloproteinases; Caspases.

ARIAS, V. G. S. Comportamento biológico do tumor venéreo transmissível canino: análises da expressão de MMP9, VEGF E CASP9 em relação as características gerais de malignidade. Botucatu, 2024. 68 p. Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The Transmissible Venereal Tumor (TVT) is the oldest known round cell neoplasm, with plasmacytoid and/or lymphocytoid characteristics. Its genomic uniqueness and versatile biological behavior have made it an excellent object of study and research; however, some research areas on behavior biological this malignancy require further study. The objective of the research was to analyze cytomorphological criteria for malignancy of the transmissible venereal tumor, and establish the relationship with the in-situ expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP9), vascular endothelial growth factor (VEGF) and caspase 9 (CASP9). Therefore, using immunohistochemistry approaches, 19 TVT samples were evaluated using specific MMP9, VEGF, and CASP9 antibodies, and the data obtained were compared with the general cytological, cytoplasmic and nuclear malignant characteristics of the analyzed samples. We performed a quantitative Tukey-Kramer and Spearman correlation analysis, which with $p < 0.05$ values were considered statistically significant. The findings indicate that the MMP9 expression of may be related to tumor implantation, which allows the tumor to create a favorable environment to house, nourish, grow, regenerate, protect, and promote the spread of cancer cells. Our study suggests that VEGF expression in TVT cells is related to the high rate of angiogenesis characteristic of this tumor. In addition, CASP9 immunoexpression may be related to chromosomal aberrations in cancer cells. A higher expression of some malignancy criteria was found in the plasmacytoid pattern, which may confirm the aggressive nature of this cytomorphological subtype. It is expected that the results this study can contribute to the understanding of the dynamics of tumor aggressiveness and its biological behavior.

Key words: Dogs; Immunohistochemistry; Neovascularization; Metalloproteinases; Caspases.

CAPÍTULO 1

1. Introdução

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT), também conhecido como tumor de Sticker, sarcoma venéreo transmissível, sarcoma infeccioso, é uma neoplasia de origem incerta. Entretanto, na análise citológica ou histopatológica é classificado como uma neoplasia de células redondas, de aspecto plasmocitoide, linfocitoide ou misto (Amaral et al., 2007; Prasad et al., 2007; Gaspar et al., 2010).

O TVT apresenta algumas particularidades, dentre elas afinidade pelo cão (Nielsen et al., 1990; Oliveira et al., 2013; Ganguly et al., 2013; Fêo et al., 2020), geralmente não é agressivo, pois raramente está relacionado com óbito do paciente. No entanto, os casos resistentes e de metástase de TVT são raros, cerca de 5% (Das et al., 2000).

Este câncer tem um comportamento autolimitado, consegue suprimir e expressar proteínas, alterando sua evolução (Dujon et al., 2020). Múltiplos mecanismos pelos quais o TVT procura escapar da morte celular foram identificados, incluindo a expressão de genes envolvidos na resistência a quimioterapia, como é a mutação do gene MDR que codifica a P-glicoproteína (Gaspar et al., 2009; Gaspar et al., 2010).

A pesquisa de alterações genética tem sido realizada no TVT, como a análise da expressão e mutação do gene TP53 (Servín et al., 2009; Stockmann et al., 2011; Montoya et al., 2014; Hupples et al., 2016), um gene que codifica a proteína P53 ligando pontos de controle do ciclo celular, que desencadeia uma cascata de mecanismos de reparo de DNA, através da proteína P21, além disso, induz a ativação de vias apoptóticas e antiapoptóticas, alterando expressão dos mecanismos da família BCL-2 (Montoya et al., 2014; Setthawongsin et al., 2019; Fêo et al., 2020).

O TVT pode evadir com sucesso o sistema imunológico do corpo do hospedeiro, evitando ativação do reconhecimento antigênico via MHC (Duzanski et al., 2019; Alzate et al., 2019; Duzanski et al., 2022). Devido aos seus mecanismos evolutivos e por ser um modelo-chave na evasão tumoral, o TVT tem sido um tumor amplamente estudado (Alzate et al., 2019; Fêo et al., 2020)

Além disso, as similaridades entre o comportamento biológico versátil do TVT (Alzate et al., 2019; Fêo et al., 2020) com outras neoplasias em animais (Pearse et al., 2012; Murchison et al., 2014) e no homem (Fêo et al., 2020), como o sarcoma de Kaposi (Hayes

et al., 1983; Rechavi et al., 1991), , fazem do estudo sobre o desenvolvimento desse tumor uma tarefa desafiadora quando se vislumbra uma possível contribuição para o entendimento de outros tumores com comportamentos semelhantes ao TVT.

No ambulatório de citologia do Hospital Veterinário de Botucatu - UNESP, o TVT é a segunda neoplasia de maior incidência em cães, perdendo apenas para as neoplasias mamárias (Amaral et al., 2004; Duzanski et al., 2020). Na última década, o Laboratório de Patologia Investigativa Comparada da FMVZ - Botucatu vêm estudando TVT com diferentes graus de agressividade (Amaral et al., 2004; Bassani-Silva et al., 2007; Gaspar et al., 2005; Danzankil et al., 2019; Do Prado Duzanski et al., 2022), implementando o Sulfato de Vincristina como tratamento padrão (Gaspar et al., 2009, Gaspar et al., 2010; Ramirez et al., 2021) a fim de aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de evolução do tumor e as variações em seu comportamento biológico de acordo com sua citomorfologia.

Dessa forma, considerando a importância de aprofundar a compreensão da evolução e patogenicidade do TVT, com os resultados obtidos com os projetos do grupo de pesquisa prévios e em andamento, foi avaliada por meio da análise imuno-histoquímica, a presença da proteína MMP9 (Figura 1), responsável pela degradação de componentes da matriz extracelular (MEC). Por outro lado, através da expressão de VEGF (Figura 2), foi medida a taxa de angiogênese tumoral, e além disso, através de imunorreatividade de CASP9 (Figura 3), foi estudada a instabilidade cromossômica das células cancerígenas. Finalmente, a expressão dos anticorpos foi comparada os critérios de malignidade citopatológicos em relação com o comportamento biológico.

2. Revisão de literatura

Estima-se que o TVT tenha se originado de uma célula somática de um ancestral canino com baixa heterozigosidade genômica (Strakova et al., 2015; Duzanski et al., 2019), há mais de dez mil anos (Siddle et al., 2013; Murchison et al., 2014), sendo uma distribuição mundial (Mikaelian et al., 1998; Fowler et al., 1997; Rogers et al., 1998; Booth et al., 1994; Ferreira et al., 2000; Boscós et al., 1999; Erünal et al., 2000; Sobral et al., 1998; Tinucci et al., 1999; Amaral et al., 2004). O TVT tem sido relatado em todos os continentes, exceto na Antártica, sendo mais incidente em regiões tropicais e subtropicais, e menos comum na América do Norte devido ao controle populacional de cães errantes (Murchison et al., 2014).

O primeiro caso documentado de TVT foi em 1810 relacionado a uma massa de origem fúngica (Murchison et al., 2014). Mais tarde, Novinsky (1876) realizou o primeiro transplante

experimental no laboratório de células TVT, e pouco depois, Smith e Washbourn em 1898 passaram células TVT de um cão infectado a outro saudável (Akkoc et al., 2017; Frampton et al., 2018; Duzanski et al., 2019; Do Prado Duzanski et al., 2022). Foi assim que o TVT foi catalogado com o conceito característico de aloenxerto, devido à sua capacidade de ser transplantado (Dujon et al., 2020; Frampton et al., 2018).

As células do TVT possuem a particularidade de se implantar em mucosas, quando as mesmas perdem a integridade (Fêo et al., 2020; Alzate et al., 2019). Assim, o tumor consegue se estabelecer, proliferar, alcançar outros locais e inclusive desenvolver metástases (Duzanski et al., 2019); porém a transmissão venérea ainda é a mais frequente (Oliveira et al., 2013; Ganguly et al., 2013; Setthawongsin et al., 2018).

Uma vez implantado o tumor, a expressão clínica pode variar desde uma única forma até múltiplas, principalmente localizada na genitália externa. No entanto, também pode ser encontrado nas cavidades do seio nasal, oral, ocular e pele (Ganguly et al., 2013; Bedoya et al., 2017; Setthawongsin et al., 2018; Fêo et al., 2020), outros como globo ocular, cérebro, ossos, mama, rins, baço, pâncreas, fígado, pulmão, ovários, testículos e linfonodos (Duzanski et al., 2019). Porém, quando o TVT ocorre fora da genitália, tende a localizar-se mais frequentemente na de nível da pele e do tecido subcutâneo (Ferreira et al., 2000; Setthawongsin et al., 2018).

O diagnóstico de malignidade é feito, a princípio pela manifestação clínica, posteriormente realiza-se o exame citológico e raramente se faz uso do exame histopatológico (Ganguly et al., 2013). O exame citopatológico do TVT por punção ou esfoliação é o mais utilizado para o diagnóstico, e na maioria das vezes é conclusivo, além de que a avaliação citológica permite determinar a classificação de acordo com a citomorfologia do tumor, em linfocitoide, plasmocitoide ou misto (Amaral et al., 2004; Amaral et al., 2007; Montoya et al., 2012).

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 tratamento mais utilizado para a regressão do tumor (Setthawongsin et al., 2018; Chokeshaiusaha et al., 2019; Sewoyo et al., 2022). Dessa forma, cerca de 90% dos cães submetidos a esse tratamento respondem positivamente, embora alguns pacientes apresentem sinais e sintomas sugestivos de efeitos colaterais graves, o que leva ao alto número de casos de interrupção do tratamento (Sewoyo et al., 2022).

A terapia para o TVT, atualmente, é limitada a um pequeno conjunto de medicamentos, que às vezes são insuficientes, devido à existência de tumores resistentes (Decuadro et al., 2021; Duzanski et al., 2019). No entanto, outras alternativas de quimioterapia utilizadas para o tratamento do TVT são a doxorrubicina (Madhu et al., 2012) e com menor frequência, a vimblastina, metotrexato, prednisolona ou combinações (Setthawongsin et al., 2019). Entretanto, os novos protocolos de quimioterapia multimodal, como a combinação de vincristina-lasparaginase (VCR-LAP), têm mostrado bons resultados, alcançando resolução do tumor em menor tempo (Setthawongsin et al., 2019).

Os estudos sobre a expressão das MMP9, VEGF e CASP9 em TVT, em relação com pesquisas anteriores, podem fornecer uma visão mais ampla sobre a tumorigênese e os mecanismos de evasão da morte tumoral das células cancerígenas, além de alcançar uma melhor compreensão sobre a evolução biológica do tumor.

Comportamento biológico de TVT

O TVT é um excelente modelo experimental, pois possibilita estudos de fenômenos relacionados à carcinogênese em uma espécie mais próxima ao homem que os roedores, considerando que o cão possui similitude biológica no crescimento, evolução dos tumores e aspectos epidemiológicos, morfológicos clínicos e bioquímicos (Kumaraguruparan et al., 2006; Setthawongsin et al., 2018), além de viver em condições ambientais similares às de seus proprietários (Casteleyn et al., 2012).

O TVT é o um tumor relativamente antigo, porém os estudos sobre ele do ponto de vista molecular é recente. Pesquisas desenvolvidas, no Laboratório de Patologia Veterinária Comparada da UNESP- Botucatu, tem demonstrado aumento no número de tumores que apresentam altos níveis de agressividade e uma variável resposta à quimioterapia, incluindo casos de resistência (Alzate et al., 2019; Duzanski et al., 2019), devido ao efeito modulador da vincristina na expressão do MDR-1 (Montoya et al., 2014).

Desde a década de 1960, têm sido investigadas as diferenças entre o genótipo do TVT e o genótipo do cão, com o objetivo de determinar se este tumor possui uma origem comum ou surgiu repetidamente no cão doméstico (Adams et al., 1968; Cohen; 1985).

Análises transcriptômicas em TVT têm demonstrado alterações cromossômicas nas células tumorais , que não são compartilhadas com as características genômicas do cão (Rebbeck et al., 2009). Através de análises citogenéticas em culturas primárias, foi avaliada a variação cromossômica do TVT e demonstrou-se que as células tumorais possuem entre

54 e 72 cromossomos a menos do que as células normais do cão (Cohen; 1985; Flórez et al., 2016; Do prado Duzanski et al., 2022).

Por meio da análise citomorfométrica e citomorfológica, observou-se que o TVT apresenta medidas celulares e nucleares maiores do que outros tumores de células redondas (Setthawongsin et al., 2018). Além disso, estudos comprovam que as células mais agressivas do TVT apresentam maior quantidade de fragmentação de DNA (Amaral et al., 2011; Mohamadzaheiri et al., 2022), o que foi relacionado com altas proporções de metástases (Akkoc et al., 2017).

Com base em suas características citomorfológicas, o TVT foi classificado em diferentes subtipos celulares: plasmocitoide, células com morfologia ovoide, abundante citoplasma e núcleo excêntrico; linfocitoide, células com morfologia redonda, citoplasma escasso e núcleo central (Figura 4) (Amaral et al., 2004; Amaral et al., 2007). Da mesma maneira, tem-se observado no TVT, padrões morfológicos e moleculares, que são característicos de tumores mais agressivos (Alzate et al., 2019; Fêo et al., 2020).

É importante destacar que a citomorfologia plasmocitoide apresenta uma forma mais agressiva em comparação com a linfocitoide (Amaral et al., 2004; Amaral et al., 2004; Gaspar et al., 2010). O subtipo plasmocitoide tem sido associado a pior instabilidade genética com aumento do número de quebras nas fitas de DNA (Montoya et al., 2014; Alzate et al., 2019). Mesmo quando as células de TVT foram submetidas a tratamento quimioterapêutico com própolis *in vitro*, a resposta do subgrupo plasmocitoide foi significativamente menor do que a do linfocitoide (Bassani et al., 2007).

No entanto, no estudo de Setthawongsin (2018) os cães com TVT do subtipo misto mostraram maior imunorreatividade de Ki67 do que as citomorfologias plasmocitoide e linfocitoide, o que, por sua vez, foi relacionado com a resistência à quimioterapia e o comportamento agressivo do tumor. Porém, ainda, precisa-se conhecer a associação destes, com o comportamento biológico, isto é, com a agressividade ou possível resistência ao tratamento (Alzate et al., 2019; Decuadro et al., 2021).

A agressividade tumoral tem sido associada à atipia celular das células tumorais (Solomon et al., 2002). Em diferentes tipos de cânceres em humanos, a importância clínica dos critérios citomorfológicos tem sido comprovada para estimar o grau de malignidade de uma neoplasia (Borges et al., 2023).

Com base na classificação citomorfológica do TVT, tem sido investigado se há uma relação direta com as características citomorfológicas de malignidade e, portanto, com a apresentação clínica do tumor (Amaral et al., 2004; Montoya et al., 2013; Montoya et al.,

2014). Montoya et al. (2014) sugere que a avaliação quantitativa e qualitativa das características de malignidade nucleares e citoplasmáticas no TVT é de grande importância e pode otimizar o estadiamento clínico pelo sistema TNM, bem como prever o grau de benignidade ou malignidade da neoplasia.

O TVT é a neoplasia que exibe comportamento biológico versátil, pois consegue adaptar-se ao sistema imunológico do paciente. O tumor apresenta maior resistência ao tratamento e maior probabilidade de metástase em pacientes imunocomprometidos (Setthawongsin et al., 2018; Alzate et al., 2019). O TVT pode passar despercebido pelo sistema de defesa de seu hospedeiro e se implantar sem ser identificado. Alguns autores referem-se ao TVT como um tumor com comportamento "parasitário" devido à sua capacidade de ser autolimitante e coexistir com o hospedeiro (Dujon et al., 2020).

Foi comprovada a existência de mecanismos de evasão da morte celular no TVT (Gaspar et al., 2010; Alzate et al., 2019; Duzanski et al., 2022). A expressão de IFN- γ e IL-6 é baixa, assim como o reconhecimento por parte do MHC nas células do TVT, o que justifica o escasso recrutamento de células imunológicas para eliminar o tumor do corpo do hospedeiro (Fêo et al., 2017; Duzanski et al., 2022). Essa particularidade é um dos mecanismos das células de TVT que permite evadir com sucesso o sistema imunológico do hospedeiro, e evitar ativação do MHC (Duzanski et al., 2019; Alzate et al., 2019; Duzanski et al., 2022).

Múltiplos mecanismos pelos quais o câncer procura escapar da morte celular foram identificados no TVT. A expressão de genes envolvidos na rejeição da quimioterapia, como a expressão da glicoproteína-P por meio da mutação do gene MDR-1, é um marcador prognóstico negativo em cânceres relacionados à resistência ao tratamento (Gaspar et al., 2009; Gaspar et al., 2010; Alzate et al., 2019).

A elevada expressão de glicoproteína-P pelas células tumorais pode resultar na expulsão de agentes quimioterápicos (Gaspar et al., 2010). Isso leva algumas células apresentarem uma menor resposta ao uso da droga, devido aos baixos índices de apoptose e citotoxicidade, o que resulta em um aumento progressivo nos casos de TVT resistentes ao tratamento quimioterápico (Alzate et al., 2019; Duzanski et al., 2019). Consequentemente, há um aumento nos custos do tratamento, além de efeitos colaterais como anorexia, vômito, distúrbios gastrointestinais (Hantrakul et al., 2014) e nefrotoxicidade (Perazella et al., 2010).

Além disso, foi comprovado que o gene MDR-1 estimula a expressão do gene TP53, o que promove a alteração do ciclo celular das células de TVT, ao inibir o reparo do DNA

durante o ciclo celular (Servín et al., 2009; Stockmann et al., 2011; Montoya et al., 2014; Hupples et al., 2016; Fêo et al., 2020).

No nível intracelular, o marcador de disseminação à distância no câncer em humanos o gene supressor tumoral ATM(Yosef, 2003), tem sido associado à baixa taxa de disseminação à distancia do TVT, especialmente em tumores com características não agressivas, e essa associação tem sido relacionada à expressão do gene TP53(Hupples et al., 2016).

As alterações da família do gene TP53 são consideradas fatores de malignidade devido à capacidade de inibir a morte celular pela via apoptótica (Hupples et al., 2016). O aumento progressivo de casos de TVT mais agressivas e resistentes à quimioterapia deve-se a fenômenos multifatoriais do comportamento biológico dos tumores, frequentemente associados a genes pró-apoptóticos e antiapoptóticos da família BCL-2 (Montoya et al, 2014; Setthawongsin et al., 2019; Fêo et al., 2020).

Metaloproteinases de Matriz

Além dos eventos intracelulares, os acontecimentos que ocorrem fora da célula, na matriz extracelular também são importantes. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são proteases endógenas zinco-dependentes (Fayyad et al., 2018; Akkoc et al., 2017; Nissinen et al., 2014). Foram descobertas na década de 1960 ao promover a degradação do tríplice hélice de colágeno no processo de metamorfose da cauda do girino, por meio da collagenase intestinal (Gross et al., 1962).

As MMPs são conhecidas por o importante papel na regulação da composição proteica da matriz extracelular (MEC), a liberação de moléculas e receptores de membrana (Chakraborti et al., 2003; Akkoc et al., 2017; Nissinen et al., 2014, ayyad et al., 2018; Mohammadian et al., 2020). Sua expressão em processos oncológicos está relacionada à progressão do câncer e a um mau prognóstico (Rollin et al., 2007; Fan et al., 2012, Nissinen et al., 2014), o que resulta na migração de células neoplásicas e invasão tumoral (Akkoc et al., 2017). As MMPs também desempenham um papel fundamental na angiogênese e inflamação, através da atividade de citocinas e quimiocinas (Düsterhöft et al., 2019).

Sabe-se que existe MMPs específica para cada tecido (Egeblad et al., 2002). Identificaram-se 23 MMPs em humanos (De Almeida et al., 2022) e foram classificadas de acordo com sua capacidade de degradação dos componentes da MEC, como: collagenases (MMP-1, -8, -13), gelatinases (MMP-2, -9), estromelisinases (MMP-3, -10, -11, -7) e

matrilisinas (MMP-7, MMP-26). No entanto, outras MMPs foram descobertas dentro e fora da MEC, levando a uma classificação mais ampla com base em seu número e estrutura (Egeblad et al., 2002).

Os membros da família das MMPs podem ser detectados de forma solúvel ou unido à membrana (MT-MMP), por meio de domínios evolutivos que podem variar entre eles; incluem o peptídeo sinal, pró-peptídeo amino terminal, domínio dependente da ligação ao zinco e o carboxi-terminal (Overall et al., 2002). No caso das gelatinases, foram identificadas variações no domínio, e foram caracterizadas por repetições de fibronectina II no domínio catalítico, necessárias para a separação do colágeno e elastina (De Almeida et al., 2022).

A MEC corresponde a um conjunto de proteínas extracelulares nas células, com uma estrutura organizada, composta por um complexo proteico de glicoproteínas, sendo o colágeno tipo IV o mais predominante na membrana basal (MB) (Bornstein et al., 2002). As gelatinases derivam seu nome principalmente devido à sua capacidade de degradar colágeno tipo IV presente em membranas basais (Honkavuori et al., 2007; Nissinen et al., 2014). Em condições normais, a MB é uma barreira biológica seletiva de excelência que impede migração de células tumorais (Klein et al., 2011; Bischoff, 2011; Nissinen et al., 2014).

A prolongada atividade das MMPs pode levar a um desequilíbrio na atividade proteolítica e remodelação tecidual, o que tem sido associado a doenças como câncer, inflamação e lesões teciduais em seres humanos (Overall; 2002). Assim, a participação de antagonistas, como o inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP), são importantes para regular a atividade enzimática das MMPs no câncer (Overall; 2002; Cabral et al., 2020). Também, foi associada a proteína X (ALIX), na regulação da expressão das MMPs, ao promover a degradação proteolítica da membrana basal vascular e favorecer a migração de células tumorais (Xie et al., 2023).

As MMP9 e MMP2 são as MMPs mais estudadas no câncer humano devido à sua capacidade de degradar proteínas da MEC (Akkoc et al., 2017). São secretadas por diversas vias, incluindo os fibroblastos do estroma do tumor, os macrófagos infiltrantes do tumor e até pelas próprias células tumorais (Fayyad et al., 2018). Além disso, as células inflamatórias desempenham um papel crucial na invasão e metástase do tumor, promovendo a infiltração e invasão tumoral (Seppänen et al., 2013).

Existe ampla evidência sobre a função das MMPs em processos patológicos, como o câncer (Overall; 2002; Rollin et al., 2007; Fan et al., 2012; Nissinen et al., 2014). As MMPs favorecem a migração de células neoplásicas e, conseqüentemente, a sua metástase (Egeblad et al., 2002; Akkoc et al., 2017). Assim, o papel das MMPs em tumores parece estar

relacionado principalmente ao processo de angiogênese, crescimento e metástases (Fayyad et al., 2018; Mohammadian et al., 2020).

Estudos já comprovaram que MMPs possuem relação com a progressão do câncer de mama (Dong et al., 2019), sarcoma histiocítico (Fayyad et al., 2018), leucemia (Liu et al., 2012), cânceres urogenitais (Coticchia et al., 2011), câncer de pulmão (Gonzalez et al., 2012; Chandrasekera et al., 2022) e câncer colorretal (Fiorioa et al., 2022; Langers et al., 2012).

As MMPs estimulam os fatores angiogênicos através da geração de VEGF (Mohammadian et al., 2020). Essa atividade estimula a formação de novos vasos sanguíneos e desenvolve um novo sistema vascular, necessário para manter a nutrição, oxigenação e crescimento tumoral (Folkman, 1971).

A função principal das MMPs é a degradação da matriz extracelular; no entanto, o aumento da permeabilidade da MEC também está relacionado à liberação de fatores de crescimento, que participam na implantação, transplante e promoção de angiogênese das células neoplásicas, conforme demonstrado em estudos de sarcoma histiocítico em caninos (Fayyad et al., 2018).

Através de modelos experimentais com ratos, revelou-se que as MMPs desempenham uma função significativa na rejeição ou aceitação de aloenxertos, o aumento da expressão de MMP2 e 9 no tecido pode estimular a resposta negativa das células T (Campbell et al., 2005).

Além dos mecanismos de evasão tumoral, os métodos pelos quais o tumor consegue crescer e manter-se estabelecido como um aloinjerto no organismo são objetos de investigação no TVT (Fox et al., 2001; Gotink et al., 2010). É de grande interesse científico investigar a expressão da MMP9 no TVT por imuno-histoquímica e contribuir na compreensão dos fatores que possibilitam às células tumorais criar um ambiente propício para a transmissão de um hospedeiro para outro (Dujon et al., 2020).

Fator de crescimento endotelial vascular

Desde 1970, os cientistas têm se dedicado à pesquisa dos princípios da angiogênese, um processo fisiológico fundamental para a nutrição e o fornecimento de oxigênio/nutrientes aos tecidos (Folkman, 1971). O fator de crescimento endotelial vascular é considerado o mais importante em vertebrados devido à sua função de desencadear o crescimento e a neovascularização ativando as células endoteliais (Fiorioa et al., 2022).

Assim como os tecidos normais do corpo, o câncer também precisa de um ambiente propício para sobreviver e induzir a neovascularização do tecido tumoral (Bergers et al., 2002; Fiorio et al., 2022) obter oxigênio, nutrientes e eliminar resíduos, e assim manter-se no organismo (Bergers et al., 2002). No entanto, tem sido produzida uma quantidade significativa de informações valiosas relacionadas aos diversos mecanismos envolvidos na formação de vasos sanguíneos nos processos patológicos no organismo (Shibuya, 2008).

Sabe-se que a angiogênese desempenha um papel fundamental no crescimento e invasão do câncer (Fox et al., 2001; Gotink et al., 2010). A importância da participação do VEGF nos processos de neovascularização e metástase do câncer foi amplamente reconhecida (Fiorio et al., 2022). Portanto, a expressão do VEGF desempenha um papel essencial na progressão tumoral (Gotink et al., 2010).

Além dos mecanismos de ação da neovascularização tumoral, foram investigados medicamentos bloqueadores da atividade do VEGF (Anti-VEGF) e têm sido implementados tratamentos antiangiogênicos, com o objetivo de reduzir a progressão tumoral em pacientes com câncer (Hou et al., 2023). Atualmente, são estudadas diferentes vias secundárias na supressão da expressão do VEGF no carcinoma de cólon (Yan et al., 2020), carcinoma mamário (Ge et al., 2009), adenocarcinoma de pulmão (Talib et al., 2018), entre outros.

Foi observada uma relação entre a expressão de VEGF e as proteínas quinases envolvidas na proliferação e migração celular de células tumorais. A ação de fatores angiogênicos promove a ativação dos mecanismos inibidores da tirosina quinase (TKI), o que inibe a progressão da doença (Gotink et al., 2010).

O receptor tirosina quinase específico do endotélio 2 (VEGFR-2) pode ser ativado pelo VEGF, contribuindo para a expressão da angiogênese em câncer. Os inibidores seletivos mais estudados do VEGFR são Cediranibe, Lenvatinibe e Regorafenibe, com efeitos potentes contra a progressão tumoral (Hou et al., 2023). Já foram analisados diferentes mecanismos dos inibidores da atividade do VEGFR no câncer (Yan et al., 2020). Através de um estudo *in vitro*, verificou-se que o composto I10 inibe a fosforilação do VEGFR-2 induzida pela VEGF, com um efeito mais potente na proliferação celular do que outros medicamentos inibidores de tirosina quinase, tornando o I10 um candidato promissor para o tratamento do câncer (Hou et al., 2023). É amplamente reconhecido que a angiogênese desempenha um papel fundamental no crescimento e na invasão do câncer (Fox et al., 2001; Gotink et al., 2010).

Foram investigados mecanismos de angiogênese tumoral em diferentes tipos de câncer, como o carcinoma de cólon (Yan et al., 2020), carcinoma mamário (Ge et al., 2009) e adenocarcinoma de pulmão (Talib et al., 2018) e foram desenvolvidas terapias antiangiogênicas capazes de suprimir a expressão do VEGF.

Além de promover a neovascularização, suporte e migração das células neoplásicas, foi observada uma relação entre a expressão de VEGF e a apoptose das células tumorais (Ge et al., 2009; Talib et al., 2018; Debnath et al., 2021). Estudos in vitro demonstraram que a supressão do VEGF pode estimular a via apoptótica mediada pela família BCL-2/BAX, através de estímulos mitocondriais pode liberar as CASP3 (Ge et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que medicamentos Anti-VEGF através da ativação da via apoptótica, regulam positivamente a expressão de P53, E2F1, P53, GADD45, BAX, BIM e CASP 3,7,8,9 (Talib et al., 2018).

Já foi documentada a expressão de VEGF em TVT, em contraste com o seu potencial angiogênico característico (Fêo et al., 2018). Além disso, sabe-se que fatores de crescimento, são capazes de ativar caspases e consequentemente a apoptose, a qual está intimamente ligada à progressão tumoral (Liao et al., 2022). Portanto, é de suma importância determinar o papel do VEGF na angiogênese tumoral do TVT e compreender os mecanismos pelos quais o câncer consegue se manter no organismo. (Hupples et al., 2014).

Caspases

As caspases (CASP) pertencente à família das cisteína-proteases que foram reconhecidas como os homólogos de mamíferos do produto do gene ced-3 pró-apoptótico do nematoide *Caenorhabditis elegans* (Angosto et al., 2003).

Entre as funções das CASP, destaca-se o papel como mediadora na regulação da morte celular programada e da apoptose. A morte celular programada corresponde ao equilíbrio entre geração, proliferação e morte das células que a compõem (Jordán et al., 2003; Dhuriya et al., 2018). São expressas de forma fisiológica na eliminação de células dos tecidos que se produzem em excesso ou são menos capazes, além de mediar na formação e remodelação de órgãos (Jordán et al., 2003).

A família das caspases são classificadas de acordo com sua função; as caspases envolvidas na produção de citocinas (caspases 1, 4, 5 e 13), as caspases sinalizadoras ou iniciadoras responsáveis por ativar outras caspases (caspases 2, 8, 9 e 10), e as caspases efetoras da morte

ou executores (caspases 3, 6 e 7) que hidrolisam substratos seletivos (García et al., 2003; Angosto et al., 2003).

As caspases estão presentes no citoplasma da maioria das células em sua forma inativa (zimógenos ou proenzimas), e podem ser rapidamente ativadas por clivagem proteolítica ou através da ligação a um co-fator (Mathiasen et al., 2002). A sua ativação é através das vias clássicas a extrínseca ou a intrínseca, no entanto, a morte celular programada pode ocorrer por vias secundárias como a autofagia, necrose ou ferroptose (Liao et al., 2022).

A via extrínseca é desencadeada por ligantes específicos ligados a um grupo de receptores de membrana da família TNFRSF, através da interação de sinais dos estímulos externos (Kia et al., 2021). Essa ação desencadeia o recrutamento da caspase 8 (CASP8) (Onen et al., 2012) e a ativação das caspases executoras CASP3 e 7, responsáveis pela apoptose (Liao et al., 2022).

A CASP9 é responsável pela ativação da via intrínseca em resposta a estresses intracelulares ou extracelulares, como danos ao DNA ou hipóxia (Liao et al., 2022). Os sinais gerados em resposta a esses estímulos convergem principalmente na mitocôndria e envolve permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) (Tummers et al., 2018). Isso desencadeia a liberação do citocromo-c no citosol e a subsequente ativação da CASP9 (Grivicich et al., 2007; Liao et al., 2022).

Porém, pode haver ineficiência ou falhas nos mecanismos reguladores e levar à morte celular descontrolada (Su et al., 2015). O rompimento do equilíbrio da maquinaria de morte celular leva a processos patológicos que confere a formação de células cancerígenas (Jordán et al., 2003). As células tumorais conseguem usar os mecanismos fisiológicos do hospedeiro a fim de perpetuar a progressão, atingindo a fase de metástase (Carranza et al., 2020).

Além da eliminação de todos os compostos que o organismo não reconhece como próprios, como células infectadas ou tumorais, foram identificadas funções não apoptóticas da expressão de CASP9 em humanos que podem contribuir para a progressão de doenças (Avrutsky et al., 2021). Foi demonstrado que a sinalização não apoptótica da CASP9 pode promover a isquemia capilar e a neurodegeneração retiniana em lesões neurovasculares isquêmicas (Avrutsky et al., 2020).

Por outro lado, foi identificado que a expressão da CASP9 por instabilidade cromossômica em carcinomas humanos estimula, de maneira não apoptótica, a invasão e a proliferação do câncer, como resultado do dano no DNA. Em contraste, os níveis elevados de CASP9 podem

estar relacionados com alta instabilidade genômica no câncer devido à aneuploidia, o que pode levar à susceptibilidade ao câncer (Barrio et al., 2023).

Desde a década de 1960, têm sido investigadas as diferenças entre o genótipo do TVT e o genótipo do cão, com o objetivo de determinar se este tumor tem uma origem comum ou surgiu repetidamente no cão doméstico (Adams et al., 1968; Cohen, 1985).

Através de análises citogenéticas em culturas primárias, as variações cromossômicas entre o TVT e o genótipo do cão têm sido estudadas (Cohen; 1985; Flórez et al., 2016; Do Prado Duzanski et al., 2022). Os estudos transcriptômicos no TVT têm direcionado sua atenção para as alterações genéticas, em relação a falta de similaridade cromossômica entre as células tumorais do TVT e as células do cão hospedeiro (Cohen; 1985; Do Prado Duzanski et al., 2022). Portanto, a pesquisa sobre a expressão das caspases nos TVTs fornece uma visão maior sobre os mecanismos de evasão da morte tumoral das células cancerígenas (Gaspar et al., 2010).

3. Objetivo

Geral

Avaliar o comportamento biológico do tumor venéreo transmissível canino por meio da análise da expressão imuno-histoquímica de MMP9, CASP9 e VEGF em relação às características gerais de malignidade.

Específico

Realizar uma análise citopatológica e classificar os subtipos citomorfológicos e identificar os critérios de malignidade no TVT.

Analisar a expressão de proteínas que degradam a matriz extracelular, pela expressão de MMP9.

Identificar a expressão do marcador CASP9 e relacionar com a instabilidade cromossômica das células cancerígenas do TVT.

Avaliar a angiogênese tumoral do TVT por meio da expressão de VEGF.

Analisar o comportamento biológico do tumor por meio da expressão de CASP9, MMP9 e VEGF em relação aos critérios de malignidade da neoplasia.

4. Referências *

AKKOC, A.; INAN, S.; SONMEZ, G. Matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and steroid receptor expressions in feline mammary tumors. **BiotechHistochem.**, v. 87, n. 4, p.312-319, 2012.

AKKOC, A.; NAK, D.; DEMIRER, A.; ŞİMŞEK, G. Immunohistochemical characterization of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in canine transmissible venereal tumors. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 92, n. 2, p. 100–106, 2017.

ALZATE, J. M.; MONTROYA, L. M.; PÉREZ, J. E.; ROCHA, N. S.; PEDRAZA, F. The role of the multi-drug resistance 1, p53, b cell lymphoma 2, and bcl 2-associated X genes in the biologic behavior and chemotherapeutic resistance of canine transmissible venereal tumors. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 48, n. 4, p 730–739, 2019.

AMARAL, A.S.; BASSANI-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.

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.; BASSANI-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.

ANGOSTO, M. Molecular bases of apoptosis. **Real Academia Nacional de Farmacia**, v.69, n. 1, p. 36-64, 2003.

BASSANI, 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.

BEDOYA, J.; CÓRDOBA, M.; FORERO, M.; SÁENZ, F.; TRIANA, L.; VARGAS, J. Canine Transmitted Disseminated Tumor, Case Report. **Redvet.**, v. 18, n. 12, p.1-17, 2017.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**. v.3, n.6, p. 401- 410, 2003.

*Bibliografia organizada de acordo com as normas vigentes da ABNT - 2018

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.

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

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

CABRAL, G.; GARZA, I.; CASTRUITA, C.; RAMIREZ, J.; PEREZ-ROMERO, B.; GUERRERO, J.; MARTINEZ, N.; MARTINEZ, M. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases Mechanisms of malignant progression. *International Journal of Molecular Sciences.* v. 21, n.24, p. 2-55, 2020.

CAMPBELL, L; RAMACHANDRAN, S; LIU, W; SHIPLEY, M; ITOHARA, S; ROGERS, J; MOAZAMI, N; SENIOR, R; JARAMILLO, A. Different Roles for Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 in the Pathogenesis of Cardiac Allograft Rejection. *American Journal of Transplantation.*, v. 5, n.3, p. 517-528, 2005.

CARRANZA, C.; RUIZ, A.; GONZÁLEZ, C.; SILVIA, M. Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Residente*, v. 15, n. 3, p. 97–112, 2020.

CHANDRASEKERA, P, PERFETTO, M; LU, C; ZHUO, M; BAHUDHANAPATI, H; JIEJING LI, J; CHEN, W; KULKARNI, P; CHRISTIAN, L; LIU, J; YIEN, Y; YU, C; WEI, S. Metalloprotease ADAM9 cleaves ephrin-B ligands and differentially regulates Wnt and mTOR signaling downstream of Akt kinase in colorectal cancer cells. *J. Biol. Chem.*, v. 298, n. 8, p. 152410 102225, 2022.

CHOKESHAUSAHA, K.; PUTHIER, D.; NGUYEN, C.; SUDJAIDEE, P.; SANANMUANG, T. Factor Analysis for Bicluster Acquisition (FABIA)revealed vincristine-sensitive transcript pattern of canine transmissible venereal tumors. *Heliyon*, v. 5, n. 5, p. e01558, 2019.

COTICCHIA, C.M.; CURATOLO, A.S.; ZURAKOWSKI, D.; YANG, J.; DANIELS, K.E.; MATULONIS, U.A.; MOSES, M.A. Urinary MMP-2 and MMP-9 predict the presence of ovarian cancer in women with normal CA125 levels. *Gynecol Oncol*, v. 123, n. 2, p.295-300, 2011.

DAS, U; DAS, A. Review of Canine Transmissible Venereal Sarcoma. *Veterinary Research Communications.*, v.100, n.1, p.57-70, 2000.

DE ALMEIDA, L.; THODE, H.; ESLAMBOLCHI, Y.; CHOPRA, S.; YOUNG, D.; GILL, S.; DEVEL, L.; Dufour, A. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological reviews.* v. 74, n.3, p.

714-770, 2022.

DEBNATH, S; MUKHERJEE, A; SAHA, D; DASH, J; CHATTERJEE, T. Poly-L-Lysine inhibits VEGF and c-Myc mediated tumor-angiogenesis and induces apoptosis in 2D and 3D tumor microenvironment of both MDA-MB-231 and B16F10 induced mice model. *International Journal of Biological Macromolecules.*, v.183, p. 528-548, 2021.

DECUADRO, A.; RUIZ, N.; MENÉNDEZ, C.; BARTESAGHI, N.; AMARAL, C.; BRANDL, S.; e BENECH, A. Lomustine therapy for vincristine-resistant canine transmissible venereal tumor: A case report. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*, v. 43, p. 1–9, 2021.

DHURIYA, Y. K.; SHARMA, D. Necroptosis: A regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*, v.15, n. 1, p. 1–9, 2018.

DO PRADO DUZANSKI, A.; FLÓREZ, L. M. M.; FÊO, H. B.; ROMAGNOLI, G. G.; KANENO, R.; ROCHA, N. S. Cell-mediated immunity and expression of MHC class I and class II molecules in dogs naturally infected by canine transmissible venereal tumor: Is there complete spontaneous regression outside the experimental CTVT. *Research in Veterinary Science*, v. 145, p. 193–204, 2022.

DONG, H.; DIAO, H.; ZHAO, Y.; XU, H.; PEI, S.; GAO, J.; WANG, J.; HUSSAIN, T.; ZHAO, D.; ZHOU, X.; LIN, D. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cell lines remarkably increases the cell malignancy largely via activation of transforming growth factor beta/SMAD signalling. *Cell Proliferation*, v. 52, n. 5, p. 2019.

DUJON, A. M.; GATENBY, R. A.; BRAMWELL, G.; MACDONALD, N.; DOHRMANN, E.; RAVEN, N.; SCHULTZ, A.; HAMEDE, R.; GÉRARD, A. L.; GIRAUDEAU, M.; THOMAS, F.; UJVARI, B. Transmissible Cancers in an Evolutionary Perspective. *In iScience*, v. 23, n. 7, p. 2020.

DÜSTERHÖFT, S; LOKAU, J; GARBERS, C. The metalloprotease ADAM17 in inflammation and cancer. *Pathology - Research and Practice.*, v. 215, n. 6, p. 152410, 2019.

DUZANSKI, A. P.; ORTIZ, A. D.; FONSECA, M. W.; FLÓREZ, M. M.; RODRIGUES, L. T.; MICHELON, F.; ROCHA, N. S. Tumor venéreo transmissível canino com resistência quimioterápica e metástase esplênica - Relato de caso. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, v. 66, n.3, p. 260–271, 2019.

EMON, B.; BAUER, J.; JAIN, Y.; JUNG, B.; SAIF, T. Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis: *A Mini Review. Computational and Structural Biotechnology Journal*, v.16, p. 279–287, 2018.

ERÜNAL, 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

FAN, H.X.; LI, H.X.; CHEN, D.; GAO, Z.X.; ZHENG, J.H. Changes in the expression of MMP2, MMP9, and ColIV in stromal cells in oral squamous tongue cell carcinoma: relationships and prognostic implications. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 29, p.31-90, 2012.

FAYYAD, A.; LAPP, S.; RISHA, E.; PFANKUCHE, V. M.; ROHN, K.; BARTHEL, Y.; SCHAUDIEN, D.; BAUMGÄRTNER, W.; PUFF, C. Matrix metalloproteinases expression in spontaneous canine histiocytic sarcomas and its xenograft model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 198, p. 54–64, 2018.

FÊO, H. B.; FLÓREZ, L. M. M.; YAMATOIGI, R. S.; DUZANSKI, A. D. P.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; DE OLIVEIRA, R. A.; e ROCHA, N. S. Do alterations in gene expressions influence tumorigenesis in the transmissible venereal tumor in dogs? **Ciencia Rural**, v. 50, n. 11, p. 1–11, 2020.

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.

FIORIOA, L.; ALVES, I.; DE SOUZA, F.; BAUTZC, W.; SOUZA, F.; NOGUEIRA DA GAMA, L.; NOGUEIRA DA GAMA, L. Perivascular mast cells and the expression of VEGF, laminin-332 and MMP-9 in human colorectal neoplasms. **Journal of gastroenterology of Mexico.**, v.87, n.4, p. 8, 2022.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med** 1., v. 285, n. 21, p. 1182-6, 1971.

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.

FOX, S.; GASPARINI, G.; HARRIS, A. Angiogenesis: Pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. **Lancet Oncology.**, v.2, n.5, p. 278 - 289, 2001.

FRAMPTON, D.; SCHWENZER, H.; MARINO, G.; BUTCHER, L. M.; POLLARA, G.; KRISTON VIZI, J.; VENTURINI, C.; AUSTIN, R.; DE CASTRO, K. F.; KETTELER, R.; CHAIN, B.; GOLDSTEIN, R. A.; WEISS, R. A.; BECK, S.; FASSATI, A. Molecular Signatures of Regression of the Canine Transmissible Venereal Tumor. **Cancer**

Cell, v. 33, n. 4, p. 620-633, 2018.

FULDA, S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *Int J Cell Biol.*, v. 124, n. 3, p. 511-5, 2009.

GANGULY, B.; DAS, U.; DAS, A. K. Canine transmissible venereal tumour: A review. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2013.

GASPAR, L. F. J.; FERREIRA, I.; MOLETA COLODEL, M.; SEULLNER BRANDÃO, C. V.; ROCHA, N. S. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: Cell morphology and influence on P-glycoprotein expression. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v. 34, n. 5, p. 447–454, 2010.

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.

GE, Y; ZHANG, X; ZHANG, J; HOU, L; TIAN, R. The mechanisms on apoptosis by inhibiting VEGF expression in human breast cancer cells. *International Immunopharmacology.*, v.9, n.4, p.389-395, 2009.

GONZALEZ, G.; SOMMER, B.; MENDOZA-POSADA, D.A.; DELGADO, J.; AQUINO-GALVEZ, A.; RAMOS C. Gelatinase activity of matrix metalloproteinases during first-line chemotherapy in lung adenocarcinoma patients: an initial approach. *Lung*, v. 190, n. 1, p.99-104, 2012.

GOTINK, K.; HENK, V. Inhibidores antiangiogénicos de la tirosina quinasa: ¿cuál es su mecanismo de acción?. *Angiogenesis.*, v.13, n.1, p. 1 - 14, 2010.

GRANDI, F.; MIOT, H.; ROCHA, ROCHA, R.; GOMEZ, C.; QUEIROZ, N.; MONTROYA, L.; COGLIATTI, B.; ROCHA, N. Perfil inmunofenotípico y molecular de marcadores de células madre de cáncer en tumor venéreo transmisible canino (CTVT) ex vivo. *Veterinary Medicine and Science.*, v.8, n.6, p. 2297 - 2306, 2022.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. *RBC*, v. 53, n. 3, p.335-343, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. The Hallmarks of Cancer. *Cell.*, v.100, n.1, p.57 70, 2000.

HANTRAKUL, S.; KLANGKAEW, N.; KUNAKORNSAWAT, S.; TANSATIT, T.; POAPOLATHEP, A.; KUMAGAI, S.; POAPOLATHEP, S. Clinical Pharmacokinetics and Effects of Vincristine Sulfate in Dogs with Transmissible Venereal Tumor (TVT). *Pharmacology.*, v.76, n.12, p. 1549-1553, 2014.

HONKAVUORI, M.; TALVENSAARI-MATTILA, A.; SOINI, Y.;

TURPEENNIEMI- HUJANEN, T.; SANTALA M. MMP-2 expression associates with CA 125 and clinical course in endometrial carcinoma. *GynecolOncol*, v. 104, n. 1, p.217-221, 2007.

HUPPES, R. Expressão gênica de mmp-2 e 9, timp-1 e 2, atm, tp53, vegf, cox-2 e cdh-1 no tvf canino. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – UNESP, São Paulo, 2014.

HUPPES, R.; CARVALHOB, M.; FERREIRAC, T.; GRANJA, Y.; USCATEGUIE, R.; CASTRO, J.; JOSIANIC, P.; NARDIC, A.; AMORIMG, R. ¿Pueden los niveles de ATM y de TP53 influenciar el bajo potencial de metástasis del TVT canino?. *Arch Med Vet.*, v. 48, n.1, p. 107-111, 2016.

JORDÁN, J. Apoptosis: muerte celular programada. *Bioquímica*, v.22, n.6, p. 100–106, 2003.

KALLI, M.; STYLIANOPOULOS, T. Defining the Role of Solid Stress and Matrix Stiffness in Cancer Cell Proliferation and Metastasis., *frontiers in Oncology.*, v.8, n.55, p. 1-5, 2018.

KE, C. H.; TOMIYASU, H.; LIN, Y. L.; HUANG, W. H.; HUANG, H. H.; CHIANG, H. C.; LIN, C. S. Canine transmissible venereal tumour established in immunodeficient mice reprograms the gene expression profiles associated with a favourable tumour microenvironment to enable cancer malignancy. *BMC Veterinary Research*, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2022.

KIA, Z.; BIZAKI, S.; TAPEH, E.; HARIJANI, S.; BAZIARY, R. Managing MMP-2, MMP-9, VEGFR-2, TGFβ-1, and TIMP-1 in NNK-induced lung carcinoma by nonchemical interventions in female rats. *Toxicology Reports.*, v. 9, n.1, p. 1261-1267, 2022.

KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*, v. 41, n. 2, p.271-290, 2011.

KNAUER, S.K.; KRÄMER, OH.; KNÖSEL, T.; ENGELS, K.; RÖDEL, F.; KOVÁCS, A.F.; DIETMAIER, W.; KLEIN-HITPASS, L.; HABTEMICHAEL, N.; SCHWEITZER, A.; BRIEGER, J.; RÖDEL, C.; MANN, W.; PETERSEN, I.; HEINZEL, T.; STAUBER, 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.

LANGERS, A.M.; VERSPAGET, H.W.; HAWINKELS, L.J.; KUBBEN, F.J.; VAN DUIJN, W.; VAN DER REIJDEN, J.J.; HARDWICK, J.C.; HOMMES, D.W.; SIER, C.F. MMP-2 and MMP-9 in normal mucosa are independently associated with outcome of colorectal cancer patients. *Br J Cancer*, v. 106, n. 9, p.1495-1498, 2012.

LIAO, M.; QIN, R.; HUANG, W.; ZHU, H.-P.; PENG, F.; HAN, B.; LIU, B. Targeting regulated cell death (RCD) with small-molecule compounds in triple-negative breast cancer: a revisited perspective from molecular mechanisms to targeted therapies. In *Journal of Hematology e Oncology*, v. 15, p. 15-44, 2022.

LIU, W.H.; CHEN, Y.L.; CHANG, L.S. CIL-102 induces matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)/MMP-9 down-regulation via simultaneous suppression of genetic transcription and mRNA stability. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 44, n. 12, p.2212-2222, 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.

MATHIASSEN, I.S.; JÄÄTTELÄ, M. Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. *Trends Mol Med*, v. 8, n. 5, p.212-220, 2002.

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.

MOHAMADZAHARI, M.; CHERAGHI, H.; SHIRANI, D.; HATAMKHANI, A. Relationship between plasma cell-free DNA changes and lysyl oxidase during the treatment and prognosis of canine transmissible venereal tumors. *BMC Veterinary Research*, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2022.

MOHAMMADIAN, H; SHARIFI, R; AMIRDEHI, S; TAHERI, E; BEDOUSTANI, A. Matrix metalloproteinase MMP1 and MMP9 genes expression in breast cancer tissue. *Gene Reports.*, v. 21, n. 100906, p. 1-4, 2020.

MONTOYA, 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, 2013.

MONTOYA, L.; BALLESTERO, H.; ROCHA, N. S. Canine transmissible venereal tumor: expression of MDR-1, and TP53 and BCL-2 family genes and its implications in biological and therapeutic behavior. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.*, v. 9, n. 2, p. 281 - 294, 2014.

MONTOYA, M. Expressão dos genes MDR-1, TP53, BCL-2, e BAX em tumor venéreo transmissível canino e sua relação com a agressividade e resposta a quimioterapia. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

MONTOYA, L.; PEDRAZA, F. ; GRANDI, F. ; ROCHA, N.S. Cytological subtypes of canine venereal transmissible tumor. *Vet Clin Pathol.*, v.47, n.1, p. 3-5, 2012

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.; 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.

MURCHISON, E. P.; WEDGE, D. C.; ALEXANDROV, L. B.; FU, B.; MARTINCORENA, I., NING, Z.; TUBIO, J. M. C.; WERNER, E. I.; ALLEN, J.; DE NARDI, A. B.; DONELAN, E. M.; MARINO, G.; FASSATI, A.; CAMPBELL, P. J.; YANG, F.; BURT, A.; WEISS, R. A.; STRATTON, M. R. Transmissible dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. *Science*, v. 343, n. 6169, p. 437–440, 2014.

NIELSEN, S.W.; KENNEDY, P.C. Tumors of the genital systems. In: Tumors in domestic animals. *University of California Press*, n. 3, p. 479–517, 1990

NISSINEN, L.; KÄHÄRI, V. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1840, n.8, p. 2571-2580, 2014.

OLIVEIRA, D; 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 Autohemotherapy. *Acta Sci. Vet.*, v. 41, p.1107, 2013.

ONEN, F; DURMAZ, I.; SCHERMAN, D.; HERSCOVICI, J.; CETIN- ATALAY, R. A novel thiazolidine compound induces caspase-9 dependent apoptosis in cancer cells. *BioorgMedChem*, v. 20, n. 17, p.5094-102, 2012.

PENNELL, K.; MESCHIARI, C.; JUNG, M.; LINDSEY, M. Chapter Two - Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. v. 147, n.2, p. 75-100,2017.

PERAZELLA, M.; MOECKEL, G. Nephrotoxicity From Chemotherapeutic Agents: Clinical Manifestations, Pathobiology, and Prevention/Therapy. *Seminars in Nephrology.*, v.30, n.6, p. 570- 581, 2010.

PÉREZ, E.; HERNÁNDEZ, P.; PIRONE, J.; REIN, J.; CAREY, L.; LUBET, R.; MANI, S.; AMOS, K.; TROESTER, M. Gene expression in extratumoral microenvironment predicts clinical outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Research.*, v.14, n.2, p. 2 - 12, 2012.

PRASAD A.; VIJAYANAND V.; RAJASUNDARAM R.; BALACHANDRAN C.; Cutaneous transmissible venereal tumor in a dog. *Indi Vet J*, v. 84, p. 978- 979, 2007.

R.H. Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *FASEB*

J, v. 21, n.1, p.207-216, 2007.

RAMIREZ, J.; FERNANDEZ RIOMALO, A.; PEDRAZA ORDOÑEZ, F. J. Características biológicas y seguimiento clínico en casos naturales de tumor venéreo transmisible canino. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, v. 32, n. 2, p 1 - 11, 2021.

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

ROLLIN, J.; RÉGINA, S.; VOUREH, P.; IOCHMANN, S.; BLÉCHET, C.; REVERDIAU, P.; GRUEL, Y. Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. *LungCancer*, v. 56, n. 2, p.273-80, 2007.

RUIZ, C.M.; SOTO, G.M.T.; ZUCCARI, D.A.P.C. Estudo da apoptose e da proliferação celular no tumor venéreo transmissível canino. *Ars veterinaria.*, v. 20, n. 1, p.107-114, 2004

SANG, M.; FENG, L.; DONG, A.; GRAGNOLI, C.; GRIFFIN, C.; WU, R. The genomic physics of tumor–microenvironment crosstalk. *Physics Reports.*, v.1029, p. 1- 51, 2023.

SEPPÄNEN, H; MUSTONEN, H; VAINIONPÄÄ, S; SHEN,Z; REPO, Z; KEMPPAINEN, E; PUOLAKKAINEN, P. Anti-inflammatory macrophage induced MMP9 and ADAM8 expression increases invasion rate of pancreatic cancer cells. *Pancreatology.*, v. 13, n. 2, p.72, 2013.

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.

SETTHAWONGSIN, C.; TANGKAWATTANA, S.; RUNGSIPIPAT, A.; TECHANGAMSUWAN, S. Computerized Cytomorphometric and Cytomorphological Analysis of Canine Transmissible Venereal Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v. 163, p. 18–22, 2018.

SETTHAWONGSIN, C.; TEEWASUTRAKUL, P.; TANGKAWATTANA, S.; TECHANGAMSUWAN, S.; RUNGSIPIPAT, A. Conventional-Vincristine Sulfate vs. Modified Protocol of Vincristine Sulfate and L-Asparaginase in Canine Transmissible Venereal Tumor. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 6, p. 1–12, 2019.

SEWOYO, P. S.; KARDENA, I. M. Canine Transmissible Venereal Tumor: Treatment Review and Updates. *Revista Electronica de Veterinaria*, v. 23, n. 1, p. 01–

07,2022.

SHIBUYA, M. Vascular endothelial growth factor-dependent and-independent regulation of angiogenesis. **BMB Reports.**, v.41, n.4, p. 278- 286, 2008.

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.

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

SOLOMON, D; DAVEY, D; KURMAN, R; MORIARTY, A; O'CONNOR, D; PREY, M; RAAB, S; SHERMAN, M; WILBUR, D; WRIGHT, T; YOUNG, N. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **American Medical association.**, v. 21, n. 287, p. 2114-2119, 2002.

CABRERA, S, R. Apoptosis en tumor venéreo transmissible Canino, durante fase progresiva y regresiva. 2004, P. 38. (Tesis Doctoral). Universidad De Chile, Santiago, Chile.

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, 2011.

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, 2011.

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

SU, Z.; YANG, Z.; XU, Y.; CHEN, Y.; YU, O. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Mol Cancer.**, v. 14, n.48, p. 2–14, 2015.

TALIB, W; KURY, L. Parthenolide inhibits tumor-promoting effects of nicotine in lung cancer by inducing P53 - dependent apoptosis and inhibiting VEGF expresión. **Biomedicine & Pharmacotherapy.**, v.107, p.1488-1495, 2018.

TUMMERS, B. Caspase-8; regulating life and death. **Physiology e Behavior**, v. 176, n. 3, 139–148, 2018.

VARASCHIN, M.; WOUTERS, V.; SOARES, T.; TOKURA, V.; DIAS, M. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais: formas de apresentação clinicopatológicas. **Clín. Vet.**, v.32, p.40- 48, 2001.

Xie, Q; Wang, W; Yang, J; Xia, H; Xiao, B; Chen, G; Huang, J; Li, R; GChen, G. ALIX promotes cell migration and invasion of head and neck squamous cell carcinoma by

regulating the expression of MMP9, MMP14, VEGF-C. **Archives of oral biology.**, v. 151, n. 105696, p. 1-8, 2023.

YAN, S; WANG, H; CHEN, X; LIANG, C; SHANG, W; WANG, L; LI, J; XU, D. MiR-182-5p inhibits colon cancer tumorigenesis, angiogenesis, and lymphangiogenesis by directly downregulating VEGF-C. **Cancer Letters.**, v.488, p. 18- 26, 2020.

YOSEF, S. ATM y proteínas quinasas relacionadas: salvaguardando la integridad del genoma. **Nature Reviews Cancer.**, v.3, n.3, p.155-168, 2003

ZHU, Y. Metalloproteases in gonad formation and ovulation. **General and Comparative Endocrinology.**, v. 314, p. 113924, 2021

Björklund, M; Koivunen, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.*, v. 1755, n.1, p. 37-69, 2005

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

GROSS, J; LAPIERE, M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 48, N. 6, p. 1014–1022, 1962.

OVERALL, C. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. **Mol Biotechnol.**, v. 22, n. 1, p. 51-86, 2002.

CAPÍTULO 2

1. Trabalho científico

Comportamento biológico do tumor venéreo transmissível canino: análises da expressão de MMP9, CASP9 e VEGF em relação as características de malignidade

Vivian Gisel Suarez Arias ^{1*}, Noeme Sousa Rocha¹

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Laboratório de Patologia Comparada, Botucatu, SP, Brasil

*Autor para correspondência: vivian.suarez@unesp.br.

Resumo

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) é a neoplasia de células redondas mais antiga conhecida, com características plasmocitoides e/ou linfocitoides. Sua singularidade genômica e comportamento biológico versátil o tornaram um excelente objeto de estudo e pesquisa, no entanto, existem áreas sobre o comportamento biológico que necessitam de maiores estudos. O objetivo do trabalho foi analisar critérios citomorfológicos de malignidade do tumor venéreo transmissível, e estabelecer a relação com a expressão da metaloproteinase de matriz 9 (MMP9), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e caspase 9 (CASP9). Portanto, por meio de imuno-histoquímica, foram analisadas 19 amostras de TVT usando anticorpos anti-MMP9, VEGF e CASP9, e os dados obtidos foram comparados com as características citológicas de malignidade gerais, citoplasmáticas e nucleares das amostras analisadas. Realizamos uma análise estatístico utilizando os testes de Tukey-Kramer e de correlação de Spearman, sendo as diferenças com $p < 0,05$ consideradas estatisticamente significativas. Os dados indicam que a expressão de MMP9 no TVT pode estar relacionada com a implantação tumoral, o que possibilita ao tumor criar um ambiente propício para se alojar, nutrir, crescer, regenerar, proteger e promover a propagação de células cancerígenas. Nossos resultados indicam também que a expressão de VEGF no TVT está relacionada com a alta taxa de angiogênese características do tumor, enquanto a imunoexpressão de CASP9 pode estar relacionada com as aberrações cromossômicas das células cancerosas. Foi observada maior expressão de alguns critérios de malignidade no padrão plasmocitoide do TVT, o que pode confirmar a natureza agressiva desse subtipo citomorfológico. Espera-se que os resultados possam contribuir para o entendimento da dinâmica da agressividade do tumor e seu comportamento biológico.

Palavras chaves: Cães; TVT; imuno-histoquímicos.

Agradecimentos

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) 88887.761639/2022- 00

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não ter conflito de interesses.

Introdução

O tumor venéreo transmissível (TVT), também conhecido como tumor de Sticker, sarcoma venéreo transmissível, sarcoma infeccioso, é uma neoplasia de origem incerta. Entretanto, na análise citológica ou histopatológica é classificado como uma neoplasia de células redondas, de aspecto plasmocitoide, linfocitoide ou misto (Amaral et al., 2007; Prasad et al., 2007; Gaspar et al., 2010).

Geralmente não é agressivo, pois raramente está relacionado com óbito do paciente. No entanto, os casos resistentes e de metástase de TVT são raros, cerca de 5% (Das et al., 2000). No obstante, o subtipo plasmocitóide tem sido associado a maior instabilidade genética com aumento do número de quebras nas fitas de DNA (Montoya et al., 2014; Alzate et al. 2019).

Com base na classificação citomorfológica do TVT, têm sido investigadas as características de malignidade em relação ao comportamento biológico. (Amaral et al., 2004; Montoya et al., 2013; Montoya et al., 2014). Montoya (2014) sugere que a avaliação quantitativa e qualitativa das características de malignidade nucleares e citoplasmáticas no TVT é de grande importância no estadiamento clínico pelo sistema TNM, bem como para prever o grau de benignidade ou malignidade da neoplasia.

O TVT é a neoplasia que exibe comportamento biológico versátil, pois consegue adaptar-se ao sistema imunológico do paciente. O tumor apresenta maior resistência ao tratamento e maior probabilidade de metástase em pacientes imunocomprometidos (Setthawongsin et al., 2018; Alzate et al., 2019). O TVT pode passar despercebido pelo sistema de defesa de seu hospedeiro e se implantar sem ser identificado. Alguns autores referem-se ao TVT como um tumor com comportamento "parasitário" devido à sua capacidade de ser autolimitante e coexistir com o hospedeiro (Dujon et al., 2020).

Múltiplos mecanismos pelos quais o câncer procura escapar da morte celular foram identificados no TVT. A expressão de genes envolvidos na rejeição da quimioterapia, como

a expressão da glicoproteína-P por meio da mutação do gene MDR-1, é um marcador prognóstico negativo em cânceres relacionados à resistência ao tratamento (Gaspar et al., 2009; Gaspar et al., 2010; Alzate et al., 2019).

O TVT é um excelente modelo experimental, pois possibilita estudos de fenômenos relacionados à carcinogênese em uma espécie mais próxima ao homem que os roedores, considerando que o cão possui similitude biológica no crescimento, evolução dos tumores e aspectos epidemiológicos, morfológicos clínicos e bioquímicos (Kumaraguruparan et al., 2006; Setthawongsin et al., 2018), além de viver em condições ambientais similares às de seus proprietários (Casteleyn et al., 2012).

Os estudos das MMP9, VEGF e CASP9 em TVT, fornecem uma visão mais ampla sobre a tumorigênese e os mecanismos de evasão da morte tumoral das células cancerígenas, além de alcançar uma melhor compreensão sobre a evolução biológica do tumor.

Dessa forma, considerando a importância de aprofundar a compreensão da evolução e patogenicidade do TVT, com os resultados obtidos com os projetos do grupo de pesquisa prévios e em andamento, foi avaliada por meio da análise imuno-histoquímica, a presença da proteína MMP9 (Figura 1), responsável pela degradação de componentes da matriz extracelular (MEC). Por outro lado, através da expressão de VEGF (Figura 2), foi estudada a angiogênese tumoral em relação com a neovascularização que sustenta o crescimento do tumor. E além disso, através de imunorreatividade de CASP9 (Figura 3), analisou-se a instabilidade cromossômica das células cancerígenas. Finalmente, a expressão dos anticorpos foi comparada aos critérios de malignidade citopatológicos em relação com o comportamento biológico do tumor.

Métodos

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com Protocolo 178/2022, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – UNESP.

Foi realizado uma análise de 19 amostras de TVT (blocos de parafina) do Laboratório de Patologia Investigativa Comparada do Departamento da Clínica Veterinária - FMVZ. Os blocos de parafina avaliados corresponderam a 19 pacientes com um diagnóstico prévio de TVT por citologia, e os tecidos foram extraídos antes do tratamento com Sulfato de Vincristina.

Os aspectos epidemiológicos incluíram as informações provenientes da base de dados no Laboratório de Patologia Veterinária Comparada da UNESP-Botucatu, bem como

aquelas obtidas dos tutores. Esses registros continham o histórico clínico do cão, hábitos de criação, histórico reprodutivo, contato com outros cães, densidade populacional, além de informações sobre tratamentos prévios para o tumor.

Foram incorporados em nossa pesquisa informação referente a análises clínicas obtidos por meio de exame físico geral, exame hematológico e avaliação específica do tumor pelo sistema TNM clínico (Tumor, Linfonodo, Metástase), no qual incluiu a classificação citomorfológica de acordo com a fase clínica, a medição do tamanho do tumor através de paquímetro universal, avaliação dos linfonodos regionais, bem como a presença ou ausência de metástase.

Também foram registradas as respostas clínicas do tumor, abrangendo 3 categorias, de acordo com a duração do tratamento quimioterápico para a regressão tumoral total; resposta completa (RC), quando o tratamento alcançou a regressão total do tumor em 4 semanas; resposta parcial (RP), regressão de menos de 50% do tamanho do tumor em 4 semanas; casos resistentes (R) - Não houve resposta ao tratamento (Tabela 1). Os tratamentos quimioterápicos foram realizados com sulfato de vincristina, na dose de 0,75 mg/m² de superfície corporal, em aplicação semanal, totalizando entre 4 e 8 doses.

A avaliação do perfil biológico do tumor foi realizada através de análise histopatológica e citopatológica de cada caso de TVT. Para a análise histopatológica, foi avaliada a expressão dos anticorpos MMP9, VEGF e CASP9. Por outro lado, para a avaliação citopatológica, os tumores foram classificados de acordo com seu padrão citomorfológico, e os critérios de malignidade citológica foram quantificados.

Finalmente, foram correlacionadas as variáveis correspondentes as categorias; padrão citomorfológico, critérios de malignidade, fase clínica, metástase e resposta ao tratamento, com a análise imuno-histoquímica de MMP9, VEGF e CASP9.

Classificação Citomorfológica

Foi realizada a classificação citomorfológica de cada uma das lâminas de acordo com os três subtipos celulares: plasmocitoide, linfocitoide e misto (Amaral et al., 2004; Amaral et al., 2007; Gaspar et al., 2010). Considerou-se o subtipo linfocitoide quando apresentava mais de 60% de células arredondadas com citoplasma escasso e núcleo central. O subtipo plasmocitoide foi atribuído quando apresentava menos de 60% de células ovóides com citoplasma abundante e núcleos excêntricos. O tipo misto foi designado para os casos que continham células linfocitoides e plasmocitoides, sem que nenhum tipo superasse 59% do total de células.

Análise dos critérios de malignidade

Foi realizada a avaliação de forma independente por dois patologistas dos critérios de malignidade gerais, nucleares e citoplasmáticos, nas amostras avaliadas (Tabela 2). As lâminas foram analisadas por microscopia óptica, no aumento 40x para verificar a qualidade e integridade das mesmas.

Características gerais

As amostras foram analisadas de acordo com: padrão de cromatina predominante, foram estabelecidos quatro padrões distintos, em graus progressivos de granulação: densa, granular, grosseira e frouxa. Corpúsculos linfoglandulares e macrocariose foram avaliados em termos de presentes ou ausentes. Os demais critérios gerais foram avaliados como ausentes, discretos, moderados ou intensos (Figura 5).

Características citoplasmáticas

Foram avaliadas principalmente aquelas relacionadas à alteração da estrutura celular, como a presença de células em fuso, células em forma de girino, presença de projeções citoplasmáticas (células amebóides) e células nuas (núcleos íntegros sem citoplasma visível), também a ocorrência de empiropolese, canibalismo, células em forma de anel de sinete e espessamento da membrana citoplasmática (Figura 6). Todas as observações foram quantificadas em termos do número de células que apresentaram a característica na população contada, para expressão em número relativo (%).

Crítérios nucleares

Os critérios de malignidade incluíram hipercromasia, pseudoinclusões nucleares (vacúolos nucleares), presença de núcleos riniformes, lobulação nuclear, binucleação, multinucleação e micronucleação e presença de halo perinuclear. Também foi considerada a ocorrência de anormalidades como projeções nucleares (brotamentos e espículas nucleares) e a presença de mitoses normais e anormais (Figura 7). Da mesma forma que para as alterações citoplasmáticas, todas as observações foram quantificadas em termos do número de células que apresentaram a característica na população contada, para expressão em número relativo (%).

Fases clínicas do tumor na histopatologia

Essa análise incluiu: Fase de progressão (alta celularidade imersa em delicado estroma); Fase de regressão inicial (evidência de tecido estromal de forma moderada); Fase de regressão final (intensa proliferação de tecido estromal), conforme estudos de Mukaratirwa et al. (2003) e Stockmann et al. (2011).

Imunofenotipagem

Foram avaliadas 19 em bloco parafina (amostras) de TVT, e feito cortes histológicos seriados de 3µm estendidos em lâminas (Slidetech Plus Novocastra® Newcastle UK). Para a expressão de MMP9, foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo MMP9 (ab58803), para a medição de CASP9, foi empregado o anticorpo policlonal de coelho Anti-CASP9 (ab52298) e para a análise do VEGF, foi utilizado um anticorpo monoclonal de rato VEGF (sc-53462). O controle positivo da reação imune, foi feito com tecido de cólon saudável para CASP9 e carcinoma mamário de cadela para VEGF e MMP9 (Tabela 3). Quanto ao controle negativo, o anticorpo foi substituído por solução tampão de Tris-HCl pH 7,4.

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol e hidratados em álcool etílico em concentrações decrescentes. Para a recuperação antigênica as lâminas foram imersas em tampão Citrato (pH 6,0) e colocados em suporte de nylon sem alça de metal na panela de pressão Pascal (Dako Cytomation, EUA) com 500 ml de água deionizada e programadas previamente a 125°C por 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi alcançado em solução de peróxido de hidrogênio a 10% (H₂O₂) por 10 minutos em ambiente protegido de luz e para o bloqueio das reações inespecíficas foi feito uma solução de 1% de leite desnatado a 4°C (geladeira) por uma hora. Em seguida, as amostras histológicas foram incubadas com os anticorpos primários.

A incubação foi realizada em uma câmara úmida overnight a 4°C, com duração de 12 horas. O sistema Novolink™ (Leica Biosystems Newcastle Ltd) foi utilizado para a imunomarcagem das moléculas. Para o polímero, usou-se o One-Step HRP (EP-12-20501, EasyPath - Erviegas, Brasil), 2 gotas por corte (100 µL), durante 30 minutos.

Posteriormente, a revelação foi realizada com a solução de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB, 3,3' - DAKO®) (100 µL/lâmina) durante 5 a 10 minutos, em ambiente protegido da luz. Para finalizar, as lâminas foram contra-coradas em uma solução de 50% de hematoxilina de Harris por 5 minutos, seguido de desidratação na capela, para posterior montagem com

lamínula histológica.

A análise das imagens foi feita no microscópio óptico Carl Zeiss, LAb A1, Germany, com o software AxioVision 4.8. Em todos os casos, a avaliação será realizada de forma independente por dois patologistas e os dados apresentados com a média das observações obtidas.

Foi conduzida uma análise com o propósito de traçar o perfil imunofenotípico, a partir da identificação da expressão do MMP9, VEGF e CASP9 por imunofenotipagem em amostras no TVT. Além disso, foi realizada uma análise das possíveis correlações entre a microscopia no TVT, como os critérios de malignidade e subtipo citomorfológico com a expressão do MMP9, VEGF e CASP9 no TVT. Foram analisadas as relações entre resposta ao tratamento com a expressão de MMP9, VEGF e CASP9 no TVT. Foi avaliada a significância entre a metástase e a expressão de MMP9, VEGF e CASP9 no TVT. Finalmente foi abordado a avaliação da relação entre a expressão do MMP9, VEGF, CASP9 e a fase clínica do TVT.

A avaliação da expressão de MMP9, VEGF e CASP9 foi identificada e quantificada. As reações obtidas foram avaliadas de forma semi-quantitativa, conforme critérios empregados por Flórez et al. (2016b).

Para avaliar a qualidade da marcação, foi levado em consideração o background das lâminas, que foi mensurado e classificado em (1) Fraco, (2) Moderado e (3) Intenso. Também foi calculada a intensidade da coloração, abrangendo três categorias: (1) Fraca, (2) Moderada e (3) Intensa. Além disso, considerou-se a distribuição do anticorpo, da seguinte forma:

- (1) = < 25% de células marcadas (não marcado);
- (2) = 26-50% (marcação leve);
- (3) = 51-75% (marcação moderada);
- (4) = >75 % (= marcação intensa).

Posteriormente, para avaliar a positividade da marcação, foi realizado uma contagem de 100 células em 10 campos diferentes de cada uma das lâminas histológicas.

Análises Estatísticas

Devido ao tamanho da amostra foram utilizados testes não paramétricos de análises de correlação de Spearman (duas amostras independentes) e análises de comparação de Tukey-Kramer, que para dados contínuos foi utilizado as análises de modelos lineares de distribuição gama, para verificar se há diferença significativa nas variáveis estudadas.

Os resultados obtidos na imunofenotipagem foram comparados com as categorias clínicas apresentadas pelos cães, incluindo, padrão citomorfológico, fase clínica do tumor, metástases, resposta à quimioterapia, além de critérios de malignidade.

Para este estudo foi realizado análises quantitativas, através do software SAS “Statistical Analysis System”, e os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultado

Dados citopatológicos e comportamento biológico

Foram avaliadas 19 amostras de TVT, das quais 37% (7/19) foram plasmocitoides, 37% (7/19) linfocitoides e 26% (5/19) mistos.

Na Tabela 4, estão resumidos os critérios de malignidade mais significativos nas categorias citomorfológicas avaliadas; corpúsculos linfoglandulares, célula em fuso, espessamento da membrana citoplasmática, vacúolos nucleares, núcleos riniformes, lobulações nucleares, micronucleação, haloperinuclear. Nas Figura 8, 9 e 10 são apresentados os gráficos correspondentes às médias das variáveis significativas dos critérios de malignidade a serem comparadas com as categorias citomorfológicas.

Entre as características de malignidade geral avaliadas, apenas os corpúsculos linfoglandulares apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ao comparar os subtipos misto e plasmocitoide ($P < 0,0063$), com uma média de 3,429 e 0,750, respectivamente (Figura 8).

Nos critérios citoplasmáticos, a característica de célula em fusão foi estatisticamente significativa ao ser comparada com os subtipos misto e linfocitoide ($P < 0,0455$), com uma média de 5,37 e 3,071, respectivamente. Além disso, o espessamento da membrana citoplasmática do subgrupo linfocitoide mostrou uma significância estatística substancial ao exibir uma média menor em comparação com os valores observados no subtipo misto ($P < 0,0050$) e plasmocitoide ($P < 0,0033$) (Figura 9).

Ao comparar os critérios nucleares com os subtipos citomorfológicos, observou-se que a presença de lobulações nucleares no subgrupo plasmocitoide foi significativamente maior em comparação com o misto ($P < 0,0083$) e, principalmente, com o linfocitoide ($P < 0,0006$). Os micronúcleos foram significativamente mais frequentes no subtipo linfocitoide quando

comparados com as categorias mista ($P < 0,0037$) e, em particular, com o tipo plasmocitoide ($P < 0,0001$) (Figura 10).

No entanto, o critério de halo perinuclear do subgrupo misto foi significativamente maior em comparação com os demais grupos, plasmocitoide ($p < 0,0237$) e, principalmente, com o linfocitoide ($p < 0,0152$). Da mesma forma, os vacúolos nucleares do subgrupo misto apresentaram uma correlação positivamente maior em comparação com o tipo linfocitoide ($p < 0,0327$). Por fim, a característica de núcleos riniformes da citomorfologia plasmacitoide foi significativamente maior em comparação com o subtipo misto ($p < 0,0077$).

Dados citopatológicos em comparação com a imunoexpressão

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa ao comparar a expressão de MMP9, com a categoria de lobulações nucleares ($P < 0,0489$).

Comparando os resultados obtidos na imunohistoquímica com as características de malignidade, foram encontrados maiores achados na categoria de critérios nucleares. Foi observada uma correlação significativa entre a imunoexpressão de VEGF e os critérios de núcleos riniformes ($P < 0,0030$), brotamento nuclear ($P < 0,0005$), micronucleação ($P < 0,0051$) e mitoses ($P < 0,0005$).

No entanto, a expressão de CASP9 não apresentou relação com nenhuma das características de malignidade avaliadas.

Dados histopatológicos

No presente estudo, encontrou-se que, das 19 amostras analisadas, o 84% (16/19) estavam em fase de progressão, com exceção de 11% das amostras (2/19) que se encontravam em regressão inicial e o 5% (1/19) estavam em regressão final. Os anticorpos MMP9, CASP9 e VEGF foram expressas no citoplasma das células neoplásicas de TVT (Figura 1, 2 e 3).

A taxa de marcação positiva de MMP9 e CASP9 foi de 89%, enquanto VEGF foi expresso em 84% das amostras avaliadas. A imunorreatividade de todos os anticorpos avaliados foi a nível citoplasmático (Figura 7). Quando foram feitas as comparações entre a média de expressão de MMP9, VEGF e CASP9 entre as categorias citomorfológicas, observou-se que o subtipo misto ($r = 86.910$; $r = 79.100$; $r = 83.600$ respectivamente) apresentou uma maior imunorreatividade do que o linfocitoide ($r = 79.971$; $r = 59.593$; $r = 79.857$ respectivamente) e, por sua vez, maior do que o plasmocitoide ($r = 59.421$; $r = 51.514$; $r = 59.057$ respectivamente).

Histopatologicamente, observou-se um padrão de distribuição citoplasmático intenso, concentrado e focalizado de MMP9 em células de TVT. A distribuição do anticorpo assemelhou-se ao padrão de marcação por C-KIT descrito em mastocitomas por Kiupel (2004), para a classificação do mastocitoma grau II (Figura 11).

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa ao comparar a expressão de VEGF com a fase clínica ($p < 0,0808$); a categoria de progressão foi significativamente maior em comparação com a categoria de regressão final ($P < 0,0243$). Os outros grupos epidemiológicos avaliados não apresentaram valores significativos.

No entanto, a expressão de CASP9 não apresentou relação estatisticamente significativa com nenhuma das categorias epidemiológicas avaliadas.

Dados epidemiológicos

Apenas o 5% (1/19) dos pacientes estudados apresentaram metástase. Quanto à resposta ao tratamento, 53% (10/19) apresentaram resposta parcial, 21% (4/19) tiveram resposta completa, 21% (4/19) não foram tratados e 5% (1/19) foram resistentes (Tabela 1).

Discussão

No presente estudo, avaliou-se o comportamento biológico do TVT, por meio dos dados epidemiológicos prévios, como; padrão citomorfológico, fase clínica, metástases e resposta ao tratamento. Em relação à expressão de MMP9, VEGF, CASP9 e aos critérios de malignidade citológicos.

Através da citologia, foi realizado o diagnóstico e classificação citomorfológica do tumor. Na presente pesquisa, não foi observada uma prevalência do subtipo plasmocitoide sobre as demais citomorfologias, contrário com outros estudos que relatam uma alta incidência do subgrupo plasmocitoide entre 53% e 100% (Amaral et al., 2007; Fêo et al., 2017).

Amaral (2004) investigou e evidenciou variações no comportamento biológico do TVT de acordo com seu subtipo citomorfológico tais como plasmocitoide, linfocitoide ou misto, em resposta à quimioterapia, e foi proposto que a citomorfologia plasmocitoide é mais agressiva em comparação com a linfocitoide e misto (Amaral et al., 2004; Gaspar et al., 2010). Na presente pesquisa, dentre as amostras que corresponderam a 37% do subtipo plasmocitoide, não foi observado um comportamento agressivo, e a resposta à quimioterapia foi positiva, visto que nenhum dos casos avaliados apresentou resistência ao tratamento ou

metástase.

Cabe ressaltar que em nosso estudo, os critérios citológicos de malignidade em destaque incluem multinucleação, vacúolos nucleares, núcleos riniformes, lobulações nucleares, micronúcleos e halo perinuclear (Figura 7), bem como a presença de células em fuso e espessamento da membrana citoplasmática (Figura 6), além de corpúsculos linfoglandulares (Figura 5). Foi observada uma maior prevalência dos critérios nucleares no padrão plasmocitoide. Os resultados estão em concordância com os resultados do estudo de Amaral (2005), que foi descrita uma prevalência de corpúsculos linfoglandulares, células em girino, pseudoinclusões nucleares e multinucleação, Particularmente com maior incidência no padrão plasmocitoide.

Atualmente, as funções das MMPs continuam sendo difíceis de interpretar no câncer (Fayyad et al., 2018). Apesar de que na maioria das expressões de MMPs está relacionada com a progressão do câncer e um mau prognóstico (Rollin et al., 2007; Fan et al., 2012, Nissinen et al., 2014) Na presente pesquisa, não foi observada uma relação entre a expressão de MMP9 e a agressividade e metástases do tumor, devido ao fato de que 89% das amostras que foram positivas para a marcação, apenas 5% apresentaram metástase. No entanto, é recomendável corroborar em futuros estudos com um maior número de amostras de TVT.

Por outro lado, um estudo realizado por Hupples et al. (2014) por meio da PCR, sugere que os níveis elevados de MMP2 no TVT podem estar relacionados com o processo de implantação das células tumorais. Com base nisso, e considerando que o TVT é reconhecido como um aloenxerto (Dujon et al., 2020). Os altos níveis de MMP9 obtidos em nosso estudo podem estar relacionados à capacidade de implantação do câncer, o que auxilia na criação de um ambiente biológico favorável para o tumor se transplantar de um hospedeiro para outro e preservar suas características celulares. Estes processos são essenciais para estabelecer um ambiente favorável que permita a sobrevivência, nutrição, crescimento e proteção das células tumorais.

O papel das MMPs na progressão do crescimento de células cancerosas e metástases são particularmente interessantes, os estudos adicionais sobre a sua atividade são necessários para entender a função na regulação, invasão e agressividade tumoral.

A expressão de VEGF está associada à invasão de células cancerosas, sendo sua superexpressão considerada um fator de prognóstico desfavorável em cânceres (Gotink et al., 2010; Yan et al., 2020; Ge et al., 2009). É sabido que o VEGF é o principal fator promotor da angiogênese no câncer, proporcionando um ambiente para a realização do processo de nutrição e crescimento do tecido tumoral (Fox et al., 2001; Gotink et al., 2010).

Em nosso estudo, 84% das amostras avaliadas apresentaram alta imunoeexpressão de VEGF, enquanto 84% dos tumores estavam em fase clínica de progressão ou crescimento tumoral. No entanto, os níveis elevados de VEGF em TVT em nosso estudo não foram relacionados à classificação citomorfológica, metástases ou resistência ao tratamento. Esses resultados mostram que a sobreexpressão de fatores angiogênicos em TVT não está diretamente relacionada à malignidade do tumor. Isso indica que a expressão do fator angiogênico VEGF pode estar associada à neovascularização que sustenta o crescimento do tumor e é crucial para a nutrição das células tumorais, resultando no rápido crescimento do TVT.

Alem disso, no estudo de Fayyad (2018), foi analisado um modelo de aloenxerto de sarcoma histiocitário canino, no qual foi observado um aumento significativo de fatores angiogênicos em relação com a expressão de MMPs nas células tumorais. Portanto, o aumento de MMPs obtidos em nossa pesquisa também pode estar correlacionado à angiogênese tumoral mediada por VEGF.

O aumento de VEGF tem sido relatado em TVT, e tem sido relacionado com a neovascularização tumoral (Huppel et al., 2014; Fêo et al., 2018). A imunoeexpressão de VEGF em nosso estudo foi relacionada com o potencial angiogênico característico do tumor, em contraste com as altas taxas de neovascularização e inflamação no tecido do TVT.

Investigações anteriores sobre câncer medem os níveis de expressão das caspases para estimar a apoptose das células cancerígenas (Fulda, 2010; Onen et al., 2012). Entretanto, foi identificado que a expressão de CASP9 está associada à instabilidade cromossômica em carcinomas humanos (Barrio et al., 2023). No entanto, em nosso estudo, não foi observada correlação entre a apoptose das células tumorais e a expressão de CASP9 ($P > 0,05$), uma vez que 16 pacientes (84%) que se encontravam em progressão tumoral foram positivos para CASP9.

Nas últimas décadas, foi demonstrada a herdabilidade dos genes com predisposição ao câncer (Lichtenstein et al., 2000). O TVT é um dos cânceres mais antigos conhecidos, com milhões de mutações cromossômicas, que apesar de suas aberrações genéticas e baixa heterogeneidade, tem conseguido se manter há milhares de anos (Murchison et al., 2014)

Zhou (2023) investigaram as variações na linha germinativa de TVT e identificaram 11 regiões de instabilidade cromossômica com uma maior taxa de susceptibilidade genética do que outras. O que proporciona às células de TVT a capacidade de propagar com sucesso as características mutadas da linha germinativa do animal da origem para as gerações seguintes.

Considerando os estudos transcriptômicos realizados em TVT, nos quais foram comprovadas as semelhanças cromossômicas compartilhadas pelos tumores de diferentes continentes (Murchison et al., 2014). Além das variações na linha germinativa do TVT que codificam alterações estruturais cromossômicas associadas aos níveis de metilação do DNA (Zhou et al., 2023).

Nossos resultados indicam que a expressão positiva de CASP9 nas amostras de TVT avaliadas podem estar relacionada com as aberrações cromossômicas das células tumorais, como resultado da propagação hereditária do TVT e da capacidade de transferir as mesmas características genômicas de uma célula cancerígena para outra. Portanto, nossa pesquisa, assim como o estudo realizado por Do Prado Duzanski et al., 2022, corrobora a natureza clonal do tumor.

Ao quantificar os níveis de expressão dos genes MMP9, VEGF e CASP9 em células TVT em relação com as características de malignidade, contribui na compreensão das variações que convergem no comportamento biológico em pacientes com TVT.

Referências *

- AKKOC, A.; INAN, S.; SONMEZ, G. Matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and steroid receptor expressions in feline mammary tumors. *Biotech Histochem.*, v. 87, n. 4, p.312-319, 2012.
- AKKOC, A.; NAK, D.; DEMIRER, A.; ŞİMŞEK, G. Immunohistochemical characterization of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in canine transmissible venereal tumors. *Biotechnic and Histochemistry*, v. 92, n. 2, p. 100–106, 2017.
- ALZATE, J. M.; MONTOYA, L. M.; PÉREZ, J. E.; ROCHA, N. S.; PEDRAZA, F. The role of the multi-drug resistance 1, p53, b cell lymphoma 2, and bcl 2-associated X genes in the biologic behavior and chemotherapeutic resistance of canine transmissible venereal tumors. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 48, n. 4, p 730–739, 2019.
- AMARAL, A.S.; BASSANI-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.
- 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.; BASSANI-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.
- ANGOSTO, M. Molecular bases of apoptosis. *Real Academia Nacional de Farmacia*, v.69, n. 1, p. 36-64, 2003.
- BASSANI, 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.
- BEDOYA, J.; CORDOBA, M.; FORERO, M.; SÁENZ, F.; TRIANA, L.; VARGAS, J. Canine Transmitted Disseminated Tumor, Case Report. *Redvet.*, v. 18, n. 12, p.1-17, 2017.
- BERGERS, G.; BENJAMIN, L. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*. v.3, n.6, p. 401- 410, 2003.
- 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.

*Bibliografia organizada de acordo com as normas vigentes da ABNT - 2018

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

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

CABRAL, G.; GARZA, I.; CASTRUITA, C.; RAMIREZ, J.; PEREZ-ROMERO, B.; GUERRERO, J.; MARTINEZ, N.; MARTINEZ, M. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases Mechanisms of malignant progression. ***International Journal of Molecular Sciences.*** v. 21, n.24, p. 2-55, 2020.

CAMPBELL, L; RAMACHANDRAN, S; LIU, W; SHIPLEY, M; ITOHARA, S; ROGERS, J; MOAZAMI, N; SENIOR, R; JARAMILLO, A. Different Roles for Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 in the Pathogenesis of Cardiac Allograft Rejection. ***American Journal of Transplantation.***, v. 5, n.3, p. 517-528, 2005.

CARRANZA, C.; RUIZ, A.; GONZÁLEZ, C.; SILVIA, M. Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. ***El Residente.*** v. 15, n. 3, p. 97–112, 2020.

CHANDRASEKERA, P, PERFETTO, M; LU, C; ZHUO, M; BAHUDHANAPATI, H; JIEJING LI, J; CHEN, W; KULKARNI, P; CHRISTIAN, L; LIU, J; YIEN, Y; YU, C; WEI, S. Metalloprotease ADAM9 cleaves ephrin-B ligands and differentially regulates Wnt and mTOR signaling downstream of Akt kinase in colorectal cancer cells. ***J. Biol. Chem.***, v. 298, n. 8, p. 152410 102225, 2022.

CHOKESHAIUSAHA, K.; PUTHIER, D.; NGUYEN, C.; SUDJAIDEE, P.; SANANMUANG, T. Factor Analysis for Biclust Acquisition (FABIA)revealed vincristine-sensitive transcript pattern of canine transmissible venereal tumors. ***Heliyon.*** v. 5, n. 5, p. e01558, 2019.

COTICCHIA, C.M.; CURATOLO, A.S.; ZURAKOWSKI, D.; YANG, J.; DANIELS, K.E.; MATULONIS, U.A.; MOSES, M.A. Urinary MMP-2 and MMP-9 predict the presence of ovarian cancer in women with normal CA125 levels. ***Gynecol Oncol.*** v. 123, n. 2, p.295-300, 2011.

DAS, U; DAS, A. Review of Canine Transmissible Venereal Sarcoma. ***Veterinary Research Communications.***, v.100, n.1, p.57-70, 2000.

DE ALMEIDA, L.; THODE, H.; ESLAMBOLCHI, Y.; CHOPRA, S.; YOUNG, D.; GILL, S.; DEVEL, L.; Dufour, A. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. ***Pharmacological reviews.*** v. 74, n.3, p. 714-770, 2022.

DEBNATH, S; MUKHERJEE, A; SAHA, D; DASH, J; CHATTERJEE, T. Poly-l-

Lysine inhibits VEGF and c-Myc mediated tumor-angiogenesis and induces apoptosis in 2D and 3D tumor microenvironment of both MDA-MB-231 and B16F10 induced mice model. *International Journal of Biological Macromolecules.*, v.183, p. 528-548, 2021.

DECUADRO, A.; RUIZ, N.; MENÉNDEZ, C.; BARTESAGHI, N.; AMARAL, C.; BRANDL, S.; e BENECH, A. Lomustine therapy for vincristine-resistant canine transmissible venereal tumor: A case report. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*, v. 43, p. 1–9, 2021.

DHURIYA, Y. K.; SHARMA, D. Necroptosis: A regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*, v.15, n. 1, p. 1–9, 2018.

DO PRADO DUZANSKI, A.; FLÓREZ, L. M. M.; FÊO, H. B.; ROMAGNOLI, G. G.; KANENO, R.; ROCHA, N. S. Cell-mediated immunity and expression of MHC class I and class II molecules in dogs naturally infected by canine transmissible venereal tumor: Is there complete spontaneous regression outside the experimental CTVT. *Research in Veterinary Science*, v. 145, p. 193–204, 2022.

DONG, H.; DIAO, H.; ZHAO, Y.; XU, H.; PEI, S.; GAO, J.; WANG, J.; HUSSAIN, T.; ZHAO, D.; ZHOU, X.; LIN, D. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cell lines remarkably increases the cell malignancy largely via activation of transforming growth factor beta/SMAD signalling. *Cell Proliferation*, v. 52, n. 5, p. 2019.

DUJON, A. M.; GATENBY, R. A.; BRAMWELL, G.; MACDONALD, N.; DOHRMANN, E.; RAVEN, N.; SCHULTZ, A.; HAMEDE, R.; GÉRARD, A. L.; GIRAUDEAU, M.; THOMAS, F.; UJVARI, B. Transmissible Cancers in an Evolutionary Perspective. *In iScience*, v. 23, n. 7, p. 2020.

DÜSTERHÖFT, S; LOKAU, J; GARBERS, C. The metalloprotease ADAM17 in inflammation and cancer. *Pathology - Research and Practice.*, v. 215, n. 6, p. 152410, 2019.

DUZANSKI, A. P.; ORTIZ, A. D.; FONSECA, M. W.; FLÓREZ, M. M.; RODRIGUES, L. T.; MICHELON, F.; ROCHA, N. S. Tumor venéreo transmissível canino com resistência quimioterápica e metástase esplênica - Relato de caso. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, v. 66, n.3, p. 260–271, 2019.

EMON, B.; BAUER, J.; JAIN, Y.; JUNG, B.; SAIF, T. Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis: A Mini Review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v.16, p. 279–287, 2018.

ERÜNAL, 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

FAN, H.X.; LI, H.X.; CHEN, D.; GAO, Z.X.; ZHENG, J.H. Changes in the expression of MMP2, MMP9, and ColIV in stromal cells in oral squamous tongue cell carcinoma: relationships and prognostic implications. *J Exp Clin Cancer Res*, v. 29, p.31-90, 2012.

FAYYAD, A.; LAPP, S.; RISHA, E.; PFANKUCHE, V. M.; ROHN, K.; BARTHEL, Y.; SCHAUDIEN, D.; BAUMGÄRTNER, W.; PUFF, C. Matrix metalloproteinases expression in spontaneous canine histiocytic sarcomas and its xenograft model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 198, p. 54–64, 2018.

FÊO, H. B.; FLÓREZ, L. M. M.; YAMATOIGI, R. S.; DUZANSKI, A. D. P.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; DE OLIVEIRA, R. A.; e ROCHA, N. S. Do alterations in gene expressions influence tumorigenesis in the transmissible venereal tumor in dogs? *Ciencia Rural*, v. 50, n. 11, p. 1–11, 2020.

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.

FIORIOA, L.; ALVES, I.; DE SOUZA, F.; BAUTZC, W.; SOUZA, F.; NOGUEIRA DA GAMA, L.; NOGUEIRA DA GAMA, L. Perivascular mast cells and the expression of VEGF, laminin-332 and MMP-9 in human colorectal neoplasms. *Journal of gastroenterology of Mexico.*, v.87, n.4, p. 8, 2022.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1., v. 285, n. 21, p. 1182-6, 1971.

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.

FOX, S.; GASPARINI, G.; HARRIS, A. Angiogenesis: Pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncology.*, v.2, n.5, p. 278 - 289, 2001.

FRAMPTON, D.; SCHWENZER, H.; MARINO, G.; BUTCHER, L. M.; POLLARA, G.; KRISTON VIZI, J.; VENTURINI, C.; AUSTIN, R.; DE CASTRO, K. F.; KETTELER, R.; CHAIN, B.; GOLDSTEIN, R. A.; WEISS, R. A.; BECK, S.; FASSATI, A. Molecular Signatures of Regression of the Canine Transmissible Venereal Tumor. *Cancer Cell*, v. 33, n. 4, p. 620-633, 2018.

FULDA, S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *Int J Cell*

Biol., v. 124, n. 3, p. 511-5, 2009.

GANGULY, B.; DAS, U.; DAS, A. K. Canine transmissible venereal tumour: A review. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2013.

GASPAR, L. F. J.; FERREIRA, I.; MOLETA COLODEL, M.; SEULLNER BRANDÃO, C. V.; ROCHA, N. S. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: Cell morphology and influence on P-glycoprotein expression. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v. 34, n. 5, p. 447–454, 2010.

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.

GE, Y; ZHANG, X; ZHANG, J; HOU, L; TIAN, R. The mechanisms on apoptosis by inhibiting VEGF expression in human breast cancer cells. *International Immunopharmacology.*, v.9, n.4, p.389-395, 2009.

GONZALEZ, G.; SOMMER, B.; MENDOZA-POSADA, D.A.; DELGADO, J.; AQUINO-GALVEZ, A.; RAMOS C. Gelatinase activity of matrix metalloproteinases during first-line chemotherapy in lung adenocarcinoma patients: an initial approach. *Lung*, v. 190, n. 1, p.99-104, 2012.

GOTINK, K.; HENK, V. Inhibidores antiangiogénicos de la tirosina quinasa: ¿cuál es su mecanismo de acción?. *Angiogenesis.*, v.13, n.1, p. 1 - 14, 2010.

GRANDI, F.; MIOT, H.; ROCHA, ROCHA, R.; GOMEZ, C.; QUEIROZ, N.; MONTOYA, L.; COGLIATTI, B.; ROCHA, N. Perfil imunofenotípico y molecular de marcadores de células madre de cáncer en tumor venéreo transmisible canino (CTVT) ex vivo. *Veterinary Medicine and Science.*, v.8, n.6, p. 2297 - 2306, 2022.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. *RBC*, v. 53, n. 3, p.335-343, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. The Hallmarks of Cancer. *Cell.*, v.100, n.1, p.57-70, 2000.

HANTRAKUL, S.; KLANGKAEW, N.; KUNAKORNSAWAT, S.; TANSATIT, T.; POAPOLATHEP, A.; KUMAGAI, S.; POAPOLATHEP, S. Clinical Pharmacokinetics and Effects of Vincristine Sulfate in Dogs with Transmissible Venereal Tumor (TVT). *Pharmacology.*, v.76, n.12, p. 1549-1553, 2014.

HONKAVUORI, M.; TALVENSAARI-MATTILA, A.; SOINI, Y.; TURPEENNIEMI- HUJANEN, T.; SANTALA M. MMP-2 expression associates with CA 125 and clinical course in endometrial carcinoma. *GynecolOncol*, v. 104, n. 1, p.217-221,

2007.

HUPPES, R. Expressão gênica de mmp-2 e 9, timp-1 e 2, atm, tp53, vegf, cox-2 e cdh-1 no tvt canino. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – UNESP, São Paulo, 2014.

HUPPES, R.; CARVALHOB, M.; FERREIRAC, T.; GRANJA, Y.; USCATEGUIE, R.; CASTRO, J.; JOSIANIC, P.; NARDIC, A.; AMORIMG, R. ¿Pueden los niveles de ATM y de TP53 influenciar el bajo potencial de metástasis del TVT canino?. *Arch Med Vet.*, v. 48, n.1, p. 107-111, 2016.

JORDÁN, J. Apoptosis: muerte celular programada. *Bioquímica*, v.22, n.6, p. 100–106, 2003.

KALLI, M.; STYLIANOPOULOS, T. Defining the Role of Solid Stress and Matrix Stiffness in Cancer Cell Proliferation and Metastasis., *frontiers in Oncology.*, v.8, n.55, p. 1-5, 2018.

KE, C. H.; TOMIYASU, H.; LIN, Y. L.; HUANG, W. H.; HUANG, H. H.; CHIANG, H. C.; LIN, C. S. Canine transmissible venereal tumour established in immunodeficient mice reprograms the gene expression profiles associated with a favourable tumour microenvironment to enable cancer malignancy. *BMC Veterinary Research*, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2022.

KIA, Z.; BIZAKI, S.; TAPEH, E.; HARIJANI, S.; BAZIARY, R. Managing MMP-2, MMP-9, VEGFR-2, TGFβ-1, and TIMP-1 in NNK-induced lung carcinoma by nonchemical interventions in female rats. *Toxicology Reports.*, v. 9, n.1, p. 1261-1267, 2022.

KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*, v. 41, n. 2, p.271-290, 2011.

KNAUER, S.K.; KRÄMER, OH.; KNÖSEL, T.; ENGELS, K.; RÖDEL, F.; KOVÁCS, A.F.; DIETMAIER, W.; KLEIN-HITPASS, L.; HABTEMICHAEL, N.; SCHWEITZER, A.; BRIEGER, J.; RÖDEL, C.; MANN, W.; PETERSEN, I.; HEINZEL, T.; STAUBER, 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.

LANGERS, A.M.; VERSPAGET, H.W.; HAWINKELS, L.J.; KUBBEN, F.J.; VAN DUIJN, W.; VAN DER REIJDEN, J.J.; HARDWICK, J.C.; HOMMES, D.W.; SIER, C.F. MMP-2 and MMP-9 in normal mucosa are independently associated with outcome of colorectal cancer patients. *Br J Cancer*, v. 106, n. 9, p.1495-1498, 2012.

LIAO, M.; QIN, R.; HUANG, W.; ZHU, H.-P.; PENG, F.; HAN, B.; LIU, B. Targeting regulated cell death (RCD) with small-molecule compounds in triple-negative

breast cancer: a revisited perspective from molecular mechanisms to targeted therapies. In *Journal of Hematology e Oncology*, v. 15, p. 15-44, 2022.

LIU, W.H.; CHEN, Y.L.; CHANG, L.S. CIL-102 induces matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)/MMP-9 down-regulation via simultaneous suppression of genetic transcription and mRNA stability. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 44, n. 12, p.2212-2222, 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.

MATHIASSEN, I.S.; JÄÄTTELÄ, M. Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. *Trends Mol Med*, v. 8, n. 5, p.212-220, 2002.

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.

MOHAMADZAHERI, M.; CHERAGHI, H.; SHIRANI, D.; HATAMKHANI, A. Relationship between plasma cell-free DNA changes and lysyl oxidase during the treatment and prognosis of canine transmissible venereal tumors. *BMC Veterinary Research*, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2022.

MOHAMMADIAN, H.; SHARIFI, R.; AMIRDEHI, S.; TAHERI, E.; BEDOUSTANI, A. Matrix metalloproteinase MMP1 and MMP9 genes expression in breast cancer tissue. *Gene Reports.*, v. 21, n. 100906, p. 1-4, 2020.

MONTOYA, 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, 2013.

MONTOYA, L.; BALLESTERO, H.; ROCHA, N. S. Canine transmissible venereal tumor: expression of MDR-1, and TP53 and BCL-2 family genes and its implications in biological and therapeutic behavior. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.*, v. 9, n. 2, p. 281 - 294, 2014.

MONTOYA, M. Expressão dos genes MDR-1, TP53, BCL-2, e BAX em tumor venéreo transmissível canino e sua relação com a agressividade e resposta a quimioterapia. 2016 tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

MONTOYA, L.; PEDRAZA, F. ; GRANDI, F. ; ROCHA, N.S. Cytological subtypes of canine venereal transmissible tumor. *Vet Clin Pathol.*, v.47, n.1, p. 3-5, 2012

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.; 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.

MURCHISON, E. P.; WEDGE, D. C.; ALEXANDROV, L. B.; FU, B.; MARTINCORENA, I.; NING, Z.; TUBIO, J. M. C.; WERNER, E. I.; ALLEN, J.; DE NARDI, A. B.; DONELAN, E. M.; MARINO, G.; FASSATI, A.; CAMPBELL, P. J.; YANG, F.; BURT, A.; WEISS, R. A.; STRATTON, M. R. Transmissible dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. **Science**, v. 343, n. 6169, p. 437–440, 2014.

NIELSEN, S.W.; KENNEDY, P.C. Tumors of the genital systems. In: Tumors in domestic animals. **University of California Press**, n. 3, p. 479–517, 1990

NISSINEN, L.; KÄHÄRI, V. Matrix metalloproteinases in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1840, n.8, p. 2571-2580, 2014.

OLIVEIRA, D; 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 Autohemotherapy. **Acta Sci. Vet.**, v. 41, p.1107, 2013.

ONEN, F; DURMAZ, I.; SCHERMAN, D.; HERSCOVICI, J.; CETIN- ATALAY, R. A novel thiazolidine compound induces caspase-9 dependent apoptosis in cancer cells. **BioorgMedChem**, v. 20, n. 17, p.5094-102, 2012.

PENNELL, K.; MESCHIARI, C.; JUNG, M.; LINDSEY, M. Chapter Two - Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. v. 147, n.2, p. 75-100, 2017.

PERAZELLA, M.; MOECKEL, G. Nephrotoxicity From Chemotherapeutic Agents: Clinical Manifestations, Pathobiology, and Prevention/Therapy. **Seminars in Nephrology.**, v.30, n.6, p. 570- 581, 2010.

PÉREZ, E.; HERNÁNDEZ, P.; PIRONE, J.; REIN, J.; CAREY, L.; LUBET, R.; MANI, S.; AMOS, K.; TROESTER, M. Gene expression in extratumoral microenvironment predicts clinical outcome in breast cancer patients. **Breast Cancer Research.**, v.14, n.2, p. 2 - 12, 2012.

PRASAD A.; VIJAYANAND V.; RAJASUNDARAM R.; BALACHANDRAN C.; Cutaneous transmissible venereal tumor in a dog. **Indi Vet J**, v. 84, p. 978- 979, 2007.

R.H. Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. **FASEB J**, v. 21, n.1, p.207-216, 2007.

RAMIREZ, J.; FERNANDEZ RIOMALO, A.; PEDRAZA ORDOÑEZ, F. J.

Características biológicas y seguimiento clínico en casos naturales de tumor venéreo transmisible canino. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, v. 32, n. 2, p 1 - 11, 2021.

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

ROLLIN, J.; RÉGINA, S.; VOURECH, P.; IOCHMANN, S.; BLÉCHET, C.; REVERDIAU, P.; GRUEL, Y. Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. *LungCancer*, v. 56, n. 2, p.273-80, 2007.

RUIZ, C.M.; SOTO, G.M.T.; ZUCCARI, D.A.P.C. Estudo da apoptose e da proliferação celular no tumor venéreo transmissível canino. *Ars veterinaria.*, v. 20, n. 1, p.107-114, 2004

SANG, M.; FENG, L.; DONG, A.; GRAGNOLI, C.; GRIFFIN, C.; WU, R. The genomic physics of tumor–microenvironment crosstalk. *Physics Reports.*, v.1029, p. 1- 51, 2023.

SEPPÄNEN, H; MUSTONEN, H; VAINIONPÄÄ, S; SHEN,Z; REPO, Z; KEMPPAINEN, E; PUOLAKKAINEN, P. Anti-inflammatory macrophage induced MMP9 and ADAM8 expression increases invasion rate of pancreatic cancer cells. *Pancreatology.*, v. 13, n. 2, p.72, 2013.

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.

SETTHAWONGSIN, C.; TANGKAWATTANA, S.; RUNGSIPIPAT, A.; TECHANGAMSUWAN, S. Computerized Cytomorphometric and Cytomorphological Analysis of Canine Transmissible Venereal Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v. 163, p. 18–22, 2018.

SETTHAWONGSIN, C.; TEEWASUTRAKUL, P.; TANGKAWATTANA, S.; TECHANGAMSUWAN, S.; RUNGSIPIPAT, A. Conventional-Vincristine Sulfate vs. Modified Protocol of Vincristine Sulfate and L-Asparaginase in Canine Transmissible Venereal Tumor. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 6, p. 1–12, 2019.

SEWOYO, P. S.; KARDENA, I. M. Canine Transmissible Venereal Tumor: Treatment Review and Updates. *Revista Electronica de Veterinaria*, v. 23, n. 1, p. 01–07,2022.

SHIBUYA, M. Vascular endothelial growth factor-dependent and-independent

regulation of angiogenesis. **BMB Reports.**, v.41, n.4, p. 278- 286, 2008.

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.

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

SOLOMON, D; DAVEY, D; KURMAN, R; MORIARTY, A; O'CONNOR, D; PREY, M; RAAB, S; SHERMAN, M; WILBUR, D; WRIGHT, T; YOUNG, N. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **American Medical association.**, v. 21, n. 287, p. 2114-2119, 2002.

CABRERA, S, R. Apoptosis en tumor venéreo transmissible Canino, durante fase progresiva y regresiva. 2004, P. 38. (Tesis Doctoral). Universidad De Chile, Santiago, Chile.

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, 2011.

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, 2011.

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

SU, Z.; YANG, Z.; XU, Y.; CHEN, Y.; YU, O. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Mol Cancer.**, v. 14, n.48, p. 2–14, 2015.

TALIB, W; KURY, L. Parthenolide inhibits tumor-promoting effects of nicotine in lung cancer by inducing P53 - dependent apoptosis and inhibiting VEGF expresión. **Biomedicine & Pharmacotherapy.**, v.107, p.1488-1495, 2018.

TUMMERS, B. Caspase-8; regulating life and death. *Physiology e Behavior*, v. 176, n. 3, 139–148, 2018.

VARASCHIN, M.; WOUTERS, V.; SOARES, T.; TOKURA, V.; DIAS, M. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais: formas de apresentação clinicopatológicas. **Clín. Vet.**, v.32, p.40- 48, 2001.

Xie, Q; Wang, W; Yang, J; Xia, H; Xiao, B; Chen, G; Huang, J; Li, R; GChen, G. ALIX promotes cell migration and invasion of head and neck squamous cell carcinoma by regulating the expression of MMP9, MMP14, VEGF-C. **Archives of oral biology.**, v. 151, n. 105696, p. 1-8, 2023.

YAN, S; WANG, H; CHEN, X; LIANG, C; SHANG, W; WANG, L; LI, J; XU, D. MiR-182-5p inhibits colon cancer tumorigenesis, angiogenesis, and lymphangiogenesis by directly downregulating VEGF-C. **Cancer Letters.**, v.488, p. 18- 26, 2020.

YOSEF, S. ATM y proteínas quinasas relacionadas: salvaguardando la integridad del genoma. **Nature Reviews Cancer.**, v.3, n.3, p.155-168, 2003

ZHU, Y. Metalloproteases in gonad formation and ovulation. **General and Comparative Endocrinology.**, v. 314, p. 113924, 2021

Björklund, M; Koivunen, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.*, v. 1755, n.1, p. 37-69, 2005

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

GROSS, J; LAPIERE, M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 48, N. 6, p. 1014–1022, 1962.

OVERALL, C. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. **Mol Biotechnol.**, v. 22, n. 1, p. 51-86, 2002.

Tabelas

# Caso	Sexo	Padrão citomorfológico	Fase clínica	Resposta ao Tratamento	TNM
2	M	Misto	Progressão	RP	2/0/0
3	F	Misto	Progressão	RP	3/0/0
4	F	Plasmocitoide	Regressão Inicial	RC	3/0/0
5	M	Plasmocitoide	Progressão	não tratou	2/0/0
6	F	Plasmocitoide	Progressão	não tratou	2/0/0
7	M	Plasmocitoide	Progressão	RP	3/0/0
8	M	Plasmocitoide	Progressão	RC	2/0/0
9	M	Linfocitoide	Regressão Final	RP	3/0/0
10	M	Misto	Progressão	RP	4/0/0
11	M	Linfocitoide	Progressão	não tratou	3/1/0
12	F	Linfocitoide	Progressão	RC	2/0/0
13	M	Linfocitoide	Progressão	R	4/0/0
14	M	Linfocitoide	Progressão	RP	3/0/0
15	M	Plasmocitoide	Progressão	RP	3/0/0
16	M	Linfocitoide	Progressão	não tratou	4/0/0
17	F	Misto	Progressão	R	4/0/1
18	M	Plasmocitoide	Regressão Inicial	RP	2/0/0
19	F	Misto	Progressão	RC	2/0/0
20	F	Linfocitoide	Progressão	RP	2/0/0

Abreviaturas: M, masculino; F, feminino; RC, resposta completa; RP, resposta parcial; R, resistente; TNM, Tumor Nódulo Metástases.

Tabela 1: Dados das informações provenientes da base de dados armazenada no Laboratório de Patologia Veterinária Comparada da UNESP-Botucatu.

A)

# Ca so	CROMAT INA DENSE	CROMATI NA FROUXA	CROMATIN A GRANULAR	CROMATIN A GROSSEIRA	MACRO CARIOS E	CORPÚSCULOS LINFOGLANDULA RES
2	308	8	15	1	1,5	0
3	0	0	0	0	0	0
4	241	4	34,5	8,5	2	9,5
5	107	6	168	6	1,5	4,5
6	105	102,5	80	3	1	3,5
7	177,5	57,5	45,5	1	1	5,5
8	223,5	3	1,5	0	3	0
9	222,5	8,5	72,5	0	1	2,5
10	136	17	141,5	5,5	2	2
11	111	19	135	12,5	3,5	4,5
12	232	46	15	3	3	2,5
13	145	40	110	0,5	2	2
14	77,5	73	150	0,5	2	3,5
15	230,5	1,5	159,5	0	1	0
16	217,5	34	43,5	0	1	3
17	143	81	70,5	0	1	1
18	56	189	42	1	1	1
19	262	0	29,5	6	1	0
20	19	3	235	6	2	4

B)

# Ca so	CÉLULA EM SINETE	CÉLULA EM FUSO	CÉLULA EM GIRINO	ESPESSAMENTO DA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA	CANIB ALISM O	EMPIR OPOLE SIS	PROJEÇÃO CITOPLASMÁ TICA
2	0	4	7	2	0	0	11,5
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	4	31	1	0	0	32
5	0	2	18,5	2	1	0	17
6	0	4,5	14,5	1	1	0	43
7	0	4	9,5	1	2	0	30,5
8	1,5	2	17,5	2	0	0	7
9	0	0,5	15,5	1	1	0	52,5
10	0	5,5	16	2	0	0	51
11	0	1,5	15	1	1	0	47
12	0	0,5	10	1	0	0	50,5
13	0	3	12	1	0	0	25,5
14	1	2,5	21,5	1	2	0	42
15	0,5	0	7	1,5	0	0	105
16	0	6,5	20,5	1	0	0	74
17	0	7	27	2	0	0	61
18	0	5	32	3	0	0	83
19	1,5	5	14,5	1	0	0	38,5
20	0	1,5	17	1	0	0	73,5

c)

# Ca so	BINUCLEAÇÃO	MULTINU CLEAÇÃO	HIPERCRO MASIA	VACÚOLOS NUCLEARES	NÚCLEOS RINIFORME S	BROTAMENT O NUCLEAR
2	4,5	0	11	8	4,5	8
3	0	0	0	0	0	0
4	10	1	31	0	7	8
5	0	0	47	0	5,5	1,5
6	0	0	40,5	0	7	10,5
7	0	0	41	0	20,5	13,5
8	9,5	1	6	15	15	11,5
9	1	0	62,5	0	2	2
10	0	0	23,5	0	4,5	0,5
11	12	2	58,5	0	2,5	0
12	2	0	65	0	9	5,5
13	1,5	0	33	5	8	6,5
14	1	0	56	4	2,5	2,5
15	2,5	0	32,5	0	3,5	3,5
16	1	0	36	1	0	1,5
17	1	0	47,5	0	2	2,5
18	1	0	29	2	4,5	5
19	0	0	53,5	17	1	3,5
20	0	0	50,5	3	6,5	4,5

# Ca so	LOBULAÇÕES NUCLEARES	MICRONUCLE AÇÃO	HALOPERI NUCLEAR	MITOSES
2	2	1,5	0	2,5
3	0	0	0	0
4	4,5	3	1	5,5
5	0	0	1	10,5
6	0	0	1	2,5
7	0	0	1	3
8	6	1,5	0	4,5
9	0	0	1	2,5
10	0	0	2	7,5
11	0	0	1	2,5
12	2	0	1	5
13	0	0	1	6,5
14	1	0	1	4
15	2	0	0	2,5
16	1	0	1	0
17	0	0	1	4,5
18	0	0	1	1
19	1	0	1	5
20	0	0,5	1	6

Tabela 2: Média de critérios de malignidade. A) Critérios de Malignidade gerais B) Critérios Citoplasmáticos C) Critérios Nucleares.

Antígeno	Nome, clonalidade, fonte	Controle positivo	Recuperação antigênica	Diluição	Polímero
MMP9	Metaloproteinase 9, ab58803, monoclonal de rato	Carcinoma mamário de cadela	Panela de pressão Pascal	1:50	One-Step HRP (EP-12-20501, EasyPath
CASP9	Anti-Caspase 9, ab52298, policlonal de coelho	Colon	Panela de pressão Pascal	1:200	Histofine simple stain Rat MAX PO (multi)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular, sc-53462, monoclonal de rato	Carcinoma mamário de cadela	Panela de pressão Pascal	1:200	Histofine simple stain Rat MAX PO (multi)

Tabela 3: Anticorpos utilizados na imunofenotipagem, inclusive o antígeno detectado, a origem, o procedimento de recuperação antigênica, a diluição dos anticorpos e os anticorpos secundários.

CITOFORMOLAGIA				
		Plasmocitoide	Misto	Linfocitoide
CRITÉRIOS DE MALGNIDAD		Media	Media	Media
GERALES	Corpúsculos linfoglandulares	3429 (3457)	0.750 (0.957)	3143 (0.900)
CITOPLASMATICOS	Célula em fuso	3071 (1.790)	5375 (1.250)	2286 (2.079)
	Espessamento da membrana citoplasmática	1643 (0.748)	1750 (0.500)	1000 (0.000)
NUCLEARES	Vacúolos nucleares	2429 (5.593)	6250 (8.098)	1857 (2.116)
	Núcleos riniformes	9000 (6.311)	3000 (1.780)	4357 (3.436)
	Lobulações nucleares	1786 (2.514)	0.750 (0.957)	0.571 (0.787)
	Micronucleação	0.643 (1.180)	0.375 (0.750)	0.071 (0.189)
	Haloperinuclear	0.714 (0.488)	1000 (0.816)	1000 (0.000)

Tabela 1: Média as variáveis significativas dos critérios de malignidade comparadas com as categorias citomorfológicas.

Figuras

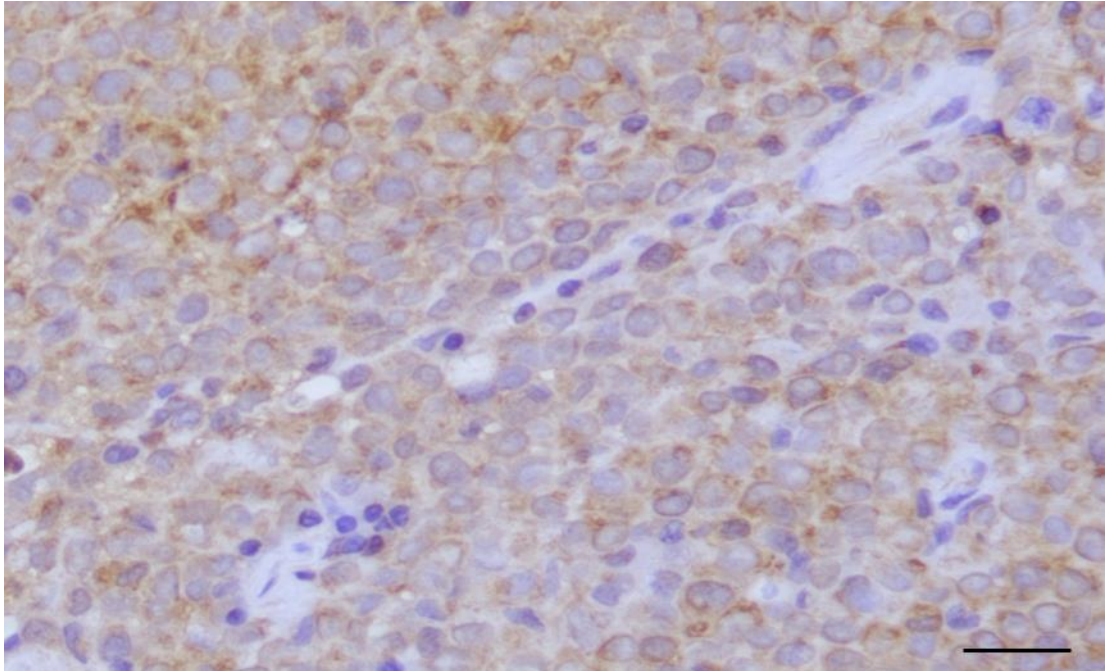


Figura 1: Imunomarcção de MMP9 no citoplasma das células de TVT. Contra-coloração com hematoxilina, Objetiva 40 $\times$. Barra, 20 μ m.

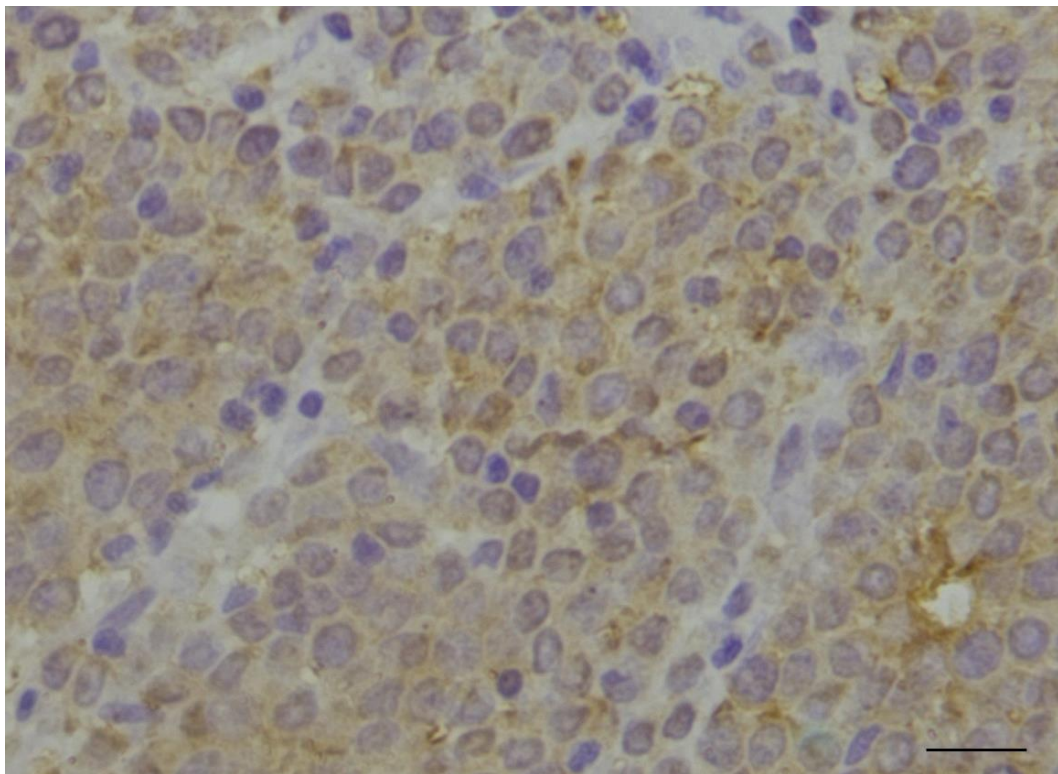


Figura 2: Imunomarcção de VEGF no citoplasma das células de TVT. Contra-coloração com hematoxilina, Objetiva 40 $\times$. Barra, 20 μ m.

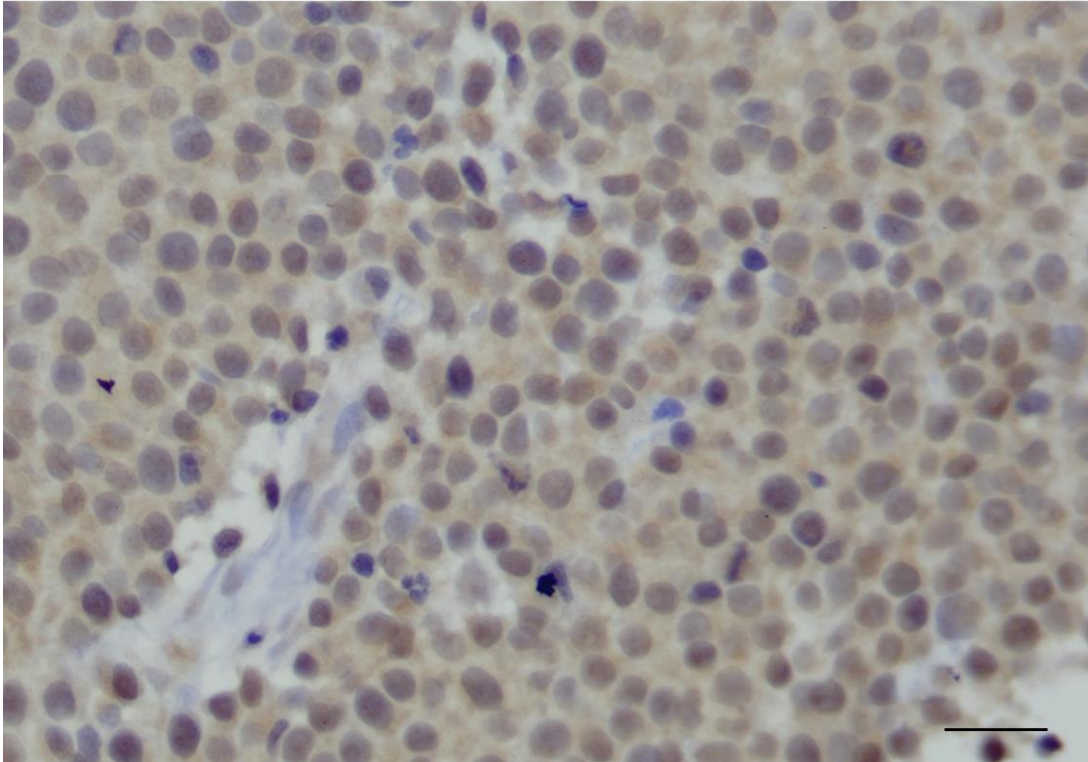


Figura 3: Imunomarcagem de CASP9 no citoplasma das células de TVT. Contra-coloração com hematoxilina, Objetiva 40 $\times$. Barra, 20 μ m.

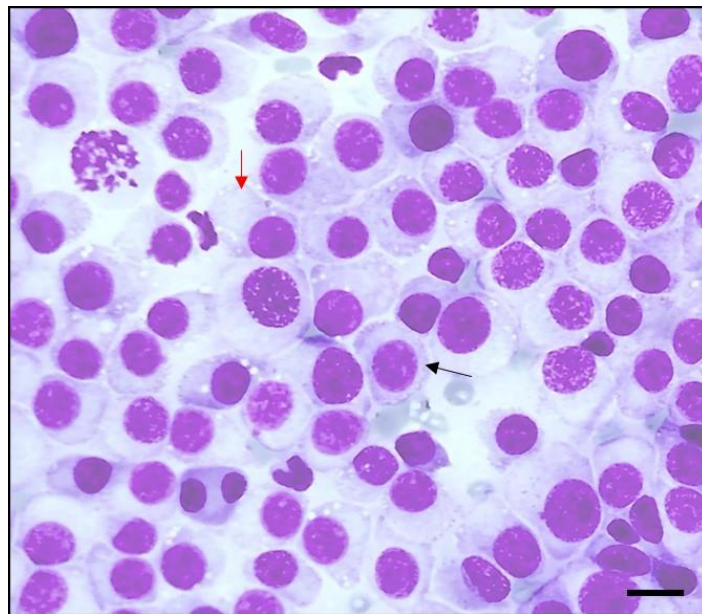


Figura 4. Fotomicrografia dos subtipos citomorfologicos do Tumor Venéreo Transmissível: Linfocitoide (seta preta). Plasmocitoide (seta branca). Barra, 10 μ m. Coloração: Giemsa, Objetiva 40 $\times$

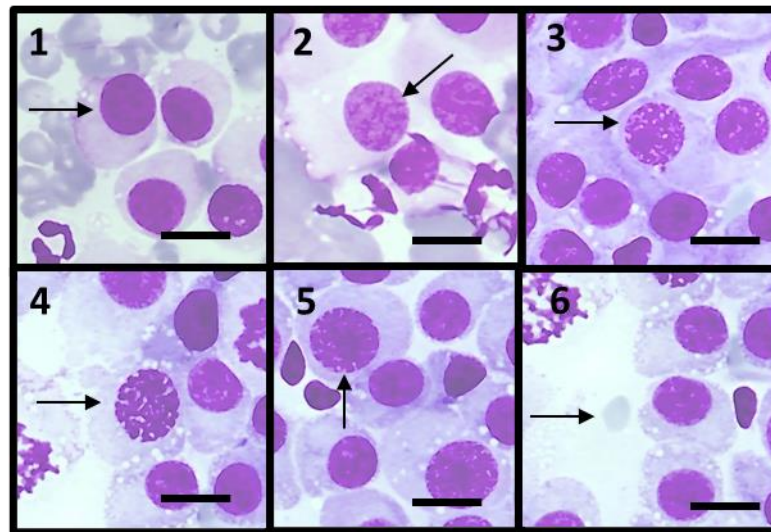


Figura 5. Fotomicrografia dos critérios de malignidade gerais avaliados no Tumor Venéreo Transmissível: 1 cromatina densa; 2. cromatina frouxa; 3. cromatina granular; 4. cromatina grosseira; 5. macrocariose; 6. corpúsculos linfoglandulares. Todas as barras, 10 μ m. Coloração: Giemsa, Objetiva 40×

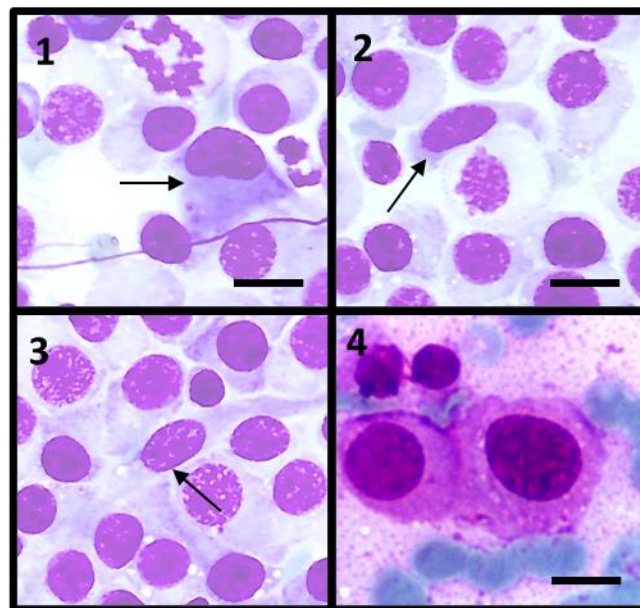


Figura 6. Fotomicrografia dos critérios de malignidade citoplasmáticos avaliados no Tumor Venéreo Transmissível: 1. Espessamento da membrana citoplasmática; 2. Célula em girino; 3. Célula em fuso; 4. Projeção citoplasmática. Todas as barras, 10 μ m. Coloração: Giemsa, Objetiva 40×

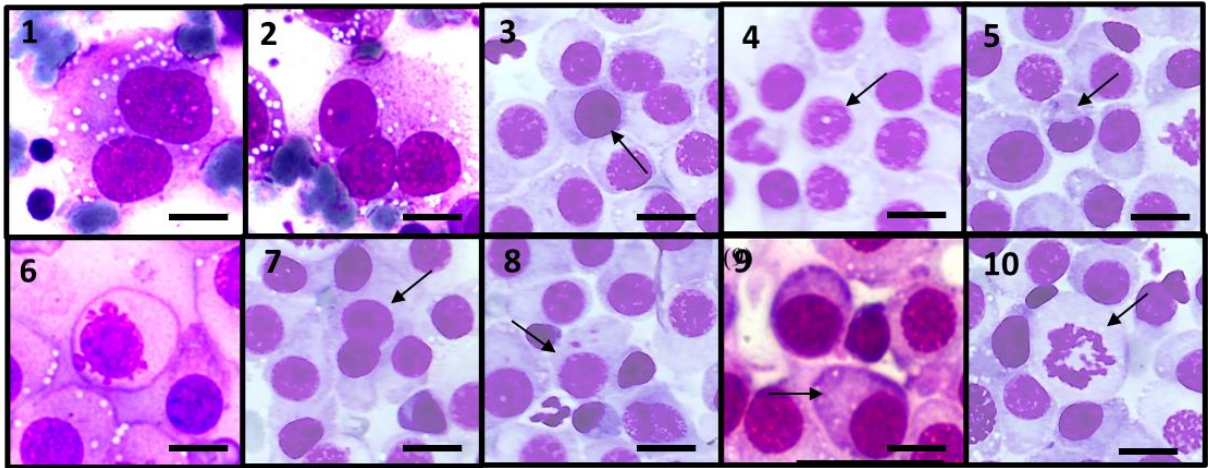


Figura 7. Fotomicrografia dos critérios de malignidade nucleares avaliados no Tumor Venéreo Transmissível: 1. Binucleação; 2. Multinucleação; 3. Hiperchromasia; 4. Vacúolos nucleares; 5. Núcleos riniformes; 6. Brotamento nuclear; 7. Lobulações nucleares; 8. Micronucleação; 9. Halo perinuclear; 10. Mitoses anormais. Todas as barras, 10 μm . Coloração: Giemsa, Objetiva 40 $\times$

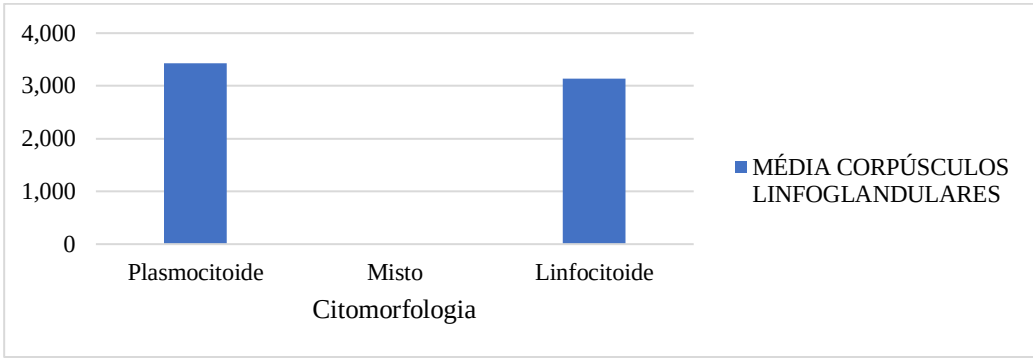


Figura 8: Gráficos correspondentes às médias das variáveis significativas dos critérios de malignidade gerais a serem comparadas com as categorias citomorfológicas.

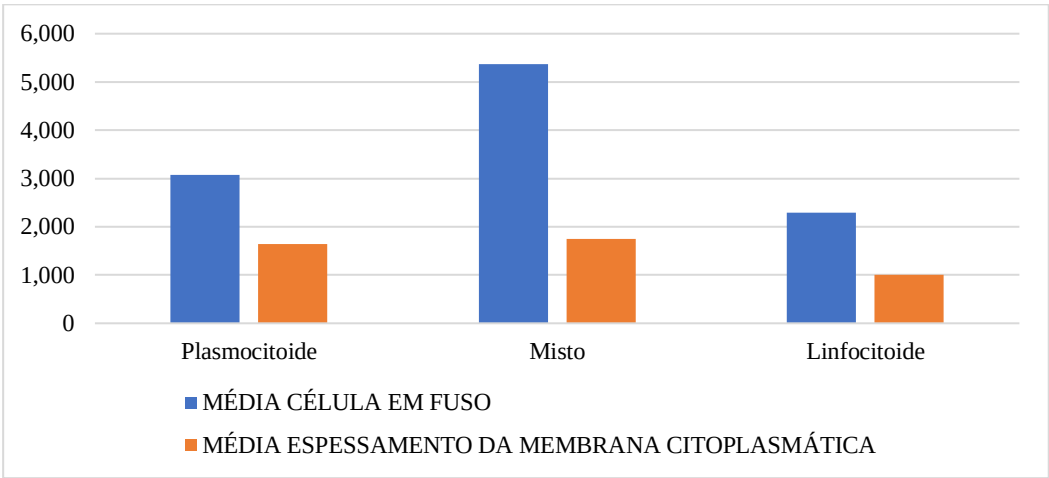


Figura 9: Gráficos correspondentes às médias das variáveis significativas dos critérios de malignidade citoplasmáticos a serem comparadas com as categorias citomorfológicas.

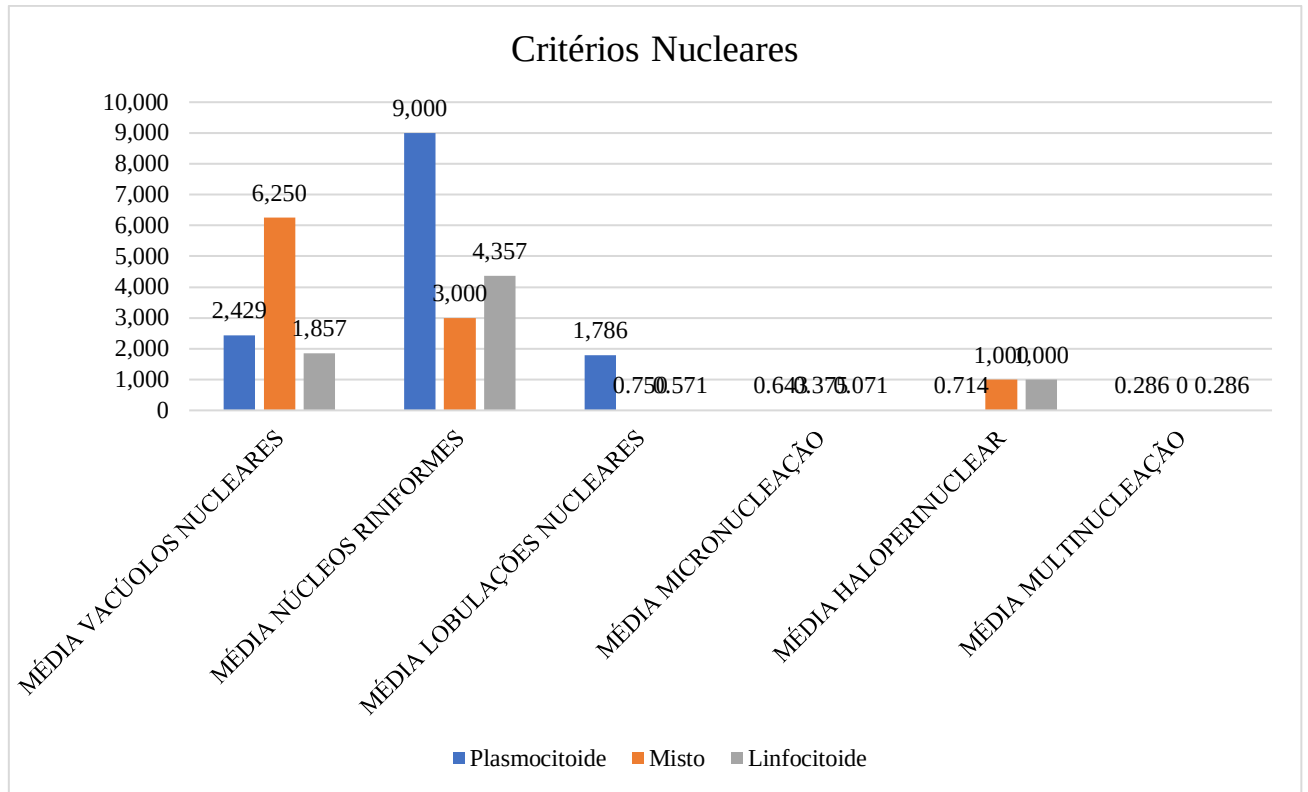


Figura 10: Gráficos correspondentes às médias das variáveis significativas dos cr terios de malignidade nucleares a serem comparadas com as categorias citomorfológicas.

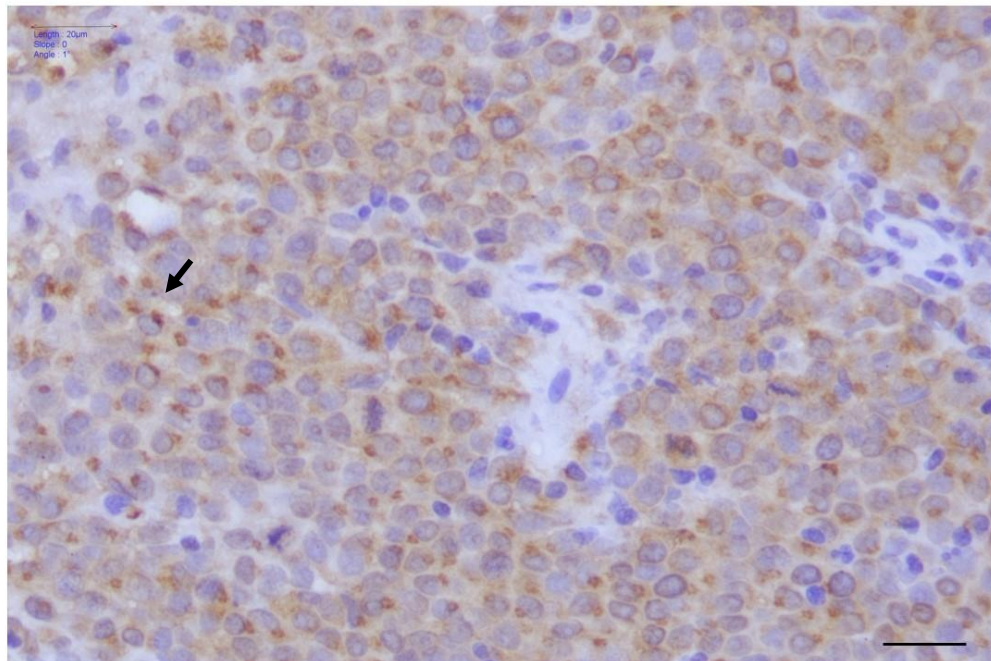


Figura 11: Imunomarca   o de MMP9 em células de TVT (Caso 13). Contra-colora   o com hematoxilina, Objetiva 40 . Todas as barras, 20  m. Seta preta. Observou-se uma distribui   o mais acentuada de MMP9 de forma localizada no citoplasma de algumas células tumorais de TVT.