

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

TESE

ESTUDOS IMUNO-HISTOQUÍMICO COMPLEMENTAR E
LECTINO-HISTOQUÍMICO DO TUMOR VENÉREO
TRANSMISSÍVEL CANINO NO BRASIL

Mariana Bezerra Mascarenhas

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA / CIÊNCIAS CLÍNICAS

**ESTUDOS IMUNO-HISTOQUÍMICO COMPLEMENTAR E LECTINO-
HISTOQUÍMICO DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO
NO BRASIL**

Mariana Bezerra Mascarenhas

Sob a orientação da professora
Ticiano do Nascimento França

e co-orientação do professor
Paulo de Vargas Peixoto

**Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Medicina Veterinária no Programa de Pós-
graduação em Medicina Veterinária, Área
de concentração em Patologia Animal.**

Seropédica, RJ
Fevereiro 2014

636.7089

M395e

T

Mascarenhas, Mariana Bezerra, 1980-
Estudos imuno-histoquímico
complementar e lectino-histoquímico
do tumor venéreo transmissível
canino no Brasil / Mariana Bezerra
Mascarenhas - 2014.

83 f. : il.

Orientador: Ticiania do
Nascimento França.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária.

Bibliografia: f. 59-66.

1. Cão - Doenças - Teses. 2. Cão
- Aparelho genital - Doenças -
Tratamento - Teses. 3.
Imunohistoquímica - Teses. I.
França, Ticiania do Nascimento,
1974-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

MARIANA BEZERRA MASCARENHAS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal.

TESE APROVADA EM

Ticiano do Nascimento França, (Ph. D) UFRRJ
Orientador

Regina Ruckert Ramadina, (Ph. D) UFRRJ

Pedro Soares Bezerra Júnior, (Ph. D). UFPA

Valéria Duarte Cerqueira, (Ph. D) UFPA

Tiago da Cunha Peixoto, (Ph. D) UFBA

“À minha mãe, Carmen, pelo carinho, incentivo, exemplo e dedicação.”

“Ao Fernando e Marina, Reno, Helena e Bernardo, minha mãe e Tio Claudio,
que me ensinam dia a dia o valor de uma verdadeira família!”

AGRADECIMENTOS

À Professora Ticiania França, minha querida Orientadora, os seus ensinamentos, paciência e a sua dedicação total foram fundamentais para a realização deste trabalho. Ao exemplo diário de profissional, mãe e amiga!

Ao Professor Paulo Peixoto, meu Co-orientador, os seus conselhos, correções, ensinamentos, confiança e a sua disponibilidade muito contribuíram no resultado desta tese.

À Professora Regina Ramadinho, minha querida amiga e tutora, sempre presente, disposta a ajudar pelo incentivo e confiança!!!!!!

Às amigas que me ajudaram muito com ensinamentos, dicas e sugestões, Samay e Vivian.

Ao Tiago, a ajuda, paciência e dedicação na coleta do material foram fundamentais para o estudo.

Aos novos e queridos amigos da patologia, Mariana e André, pela disposição e ajuda.

Ao Reno e Helena pela presença e ajuda com a pequena Marina.

À minha querida mãezinha e ao tio Claudio pela ajuda e incentivo constante.

Ao Fernando, pelo apoio, carinho, paciência e compreensão.

À Maria, minha eterna fonte de inspiração!

À minha pequena Marina por me ensinar dia a dia o verdadeiro amor incondicional.

À todos, minha eterna gratidão.

RESUMO

MASCARENHAS, Mariana Bezerra. Estudos imuno-histoquímico complementar e lectino-histoquímico do tumor venéreo transmissível canino no Brasil. 68p. Tese (Doutor em Patologia Animal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Com a finalidade de aprofundar a investigação sobre a natureza (origem) do tumor venéreo transmissível canino (TVTC), bem como, fornecer subsídios para o estabelecimento do diagnóstico e diagnóstico diferencial, esse estudo complementar foi realizado por meio de avaliação imuno-histoquímica e lectino-histoquímica. A avaliação imuno-histoquímica foi feita em 10 TVTCs genitais e em 6 exclusivamente extragenitais previamente diagnosticados através da citologia e da histopatologia. Os TVTCs foram testados para reagentes específicos de antígenos de membrana e citoplasmáticos (anti-lisozima, anti-macrófago, anti-vimentina, anti-CD18, anti-CD3, anti-CD79, anti-CD117) com utilização da técnica complexo avidina-biotina-peroxidase. Adicionalmente, foram testadas as lectinas Con A, DBA, SBA, PNA, UEA-1, WGA, sWGA, GSL, SJA, PSA, PHA-L, PHA-E e RCA em quatro TVTCs genitais. Em 100% dos tumores testados (16/16) com anticorpo anti-vimentina houve forte imunoreatividade. Os TVTCs também apresentaram forte marcação com o anticorpo anti-CD117 e anti-CD3. Não houve reatividade para os anticorpos anti-lisozima, anti-macrófago, anti-CD18 e anti-CD79a. Na avaliação lectino-histoquímica foi verificada forte marcação das células tumorais com Con-A, PHA-L e RCA. Não houve diferença histopatológica e de imunoreatividade entre os TVTCs genitais e extragenitais. Estes achados não corroboram com a hipótese da origem histiocítica do TVTC (ausência de reatividade dos anticorpos anti-lisozima, anti-macrófago e anti-CD18), entretanto, indicam uma provável origem linfóide/mielóide deste tumor (reatividade para CD3, ConA, PHA-L e RCA).

Palavras chaves: TVTC, imuno-histoquímica, lectino-histoquímica, cão, patologia.

ABSTRACT

MASCARENHAS, Mariana Bezerra. Complementary immunohistochemical studies and lectin histochemical of canine transmissible venereal tumor in Brazil. 68p. Tese (Doutorado em Patologia Animal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

To further investigate the nature (origin) of the canine transmissible venereal tumor (CTVT), as well as provide support for establishing the diagnosis and differential diagnosis of this neoplasm, this complementary study was performed by means of immunohistochemistry and lectin histochemistry analysis. The immunohistochemical was performed on 10 genital TVTCs and on 6 exclusively extragenital TVTCs previously diagnosed by cytology and histopathology. CTVT samples were incubated with biotinylated antibodies raised against specific membrane and cytoplasmic antigens (anti-lysozyme, anti-macrophage, anti-vimentin, anti-CD18, anti-CD3, anti-CD79, anti-CD117) and subsequently developed using the avidin-biotin-peroxidase complex technique. Lectins Con A, DBA, SBA, PNA, UEA-1, WGA, sWGA, GSL, JSA, PSA, PHA-L, PHA-E and RCA were additionally tested in four genital TVTCs. A strong reactivity with the anti-vimentin antibody was found in 100% of the tumors tested (16/16). The CTVTs also showed strong staining with anti-CD117 and anti-CD3 antibody. There was no reactivity to anti-lysozyme, anti-macrophage, anti-CD18 and anti-CD79a antibodies. In lectin histochemical was observed strong staining of tumors to Con-A, PHA-L and RCA. There was no histopathological and immuno-reactivity difference among genital and extragenital CTVTs. These findings do not corroborate the hypothesis of histiocytic origin of CTVT (no reactivity to anti-lysozyme antibody, anti-macrophage and anti-CD18), however, they do indicate a probable lymphoid/myeloid origin of this tumor (reactivity for CD3, ConA, PHA -L and RCA).

Keywords: CTVT, immunohistochemistry, lectin histochemistry, dog, pathology.

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1	TVTC genital (2). Células arredondadas com núcleos grandes e esféricos, citoplasma pálido e vacuolizado em parte das células. HE. Obj. 20.	26
Figura 2	TVTC genital (5). Células arredondadas com núcleos grandes, esféricos, nucléolos únicos e evidentes; citoplasma pálido com limites precisos. Figuras de mitose frequentes. HE. Obj. 40.	26
Figura 3	Controle-positivo (inflamação granulomatosa). Intensa imuno-reatividade em macrófagos e neutrófilos para o anticorpo anti-lisozima. Obj. 10.	27
Figura 4	TVTC genital (2). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada imuno-reatividade de macrófagos e neutrófilos para a lisozima. Obj. 20.	28
Figura 5	TVTC genital (6). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada imuno-reatividade de macrófagos e neutrófilos para a lisozima. Obj. 20.	28
Figura 6	TVTC extragenital (16). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada imuno-reatividade de macrófagos e neutrófilos para a lisozima. Obj. 20.	29
Figura 7	Controle-positivo (melanoma amelanótico) Intensa imuno-reatividade nas células neoplásicas para o anticorpo anti-vimentina. Obj. 20	30
Figura 8	TVTC genital (4). Intensa imuno-reatividade para a vimentina, com mais de 90% das células tumorais positivas. Obj. 10.	30
Figura 9	TVTC genital (1). Intensa imuno-reatividade para a vimentina, com mais de 90% das células tumorais positivas. Obj. 20.	31
Figura 10	Controle-positivo (inflamação granulomatosa). Intensa imuno-reatividade em macrófagos e neutrófilos para o anticorpo anti-macrófago. Obj. 40.	32
Figura 11	TVTC genital (2). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade dos macrófagos intersticiais para o anticorpo anti-macrófago. Obj. 20.	33
Figura 12	TVTC extragenital (11). Marcada imuno-reatividade dos macrófagos intersticiais para o anticorpo anti-macrófago. Obj. 40	33
Figura 13	Controle-positivo (inflamação granulomatosa de cão). Intensa imuno-reatividade em macrófagos para o anticorpo anti-CD 18. Obj. 10.	34

Figura 14	TVTC genital (2). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de macrófagos e neutrófilos intersticiais para o anticorpo anti-CD18. Obj. 10.	35
Figura 15	TVTC genital (4). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de macrófagos e neutrófilos intersticiais para o anticorpo anti-CD18. Obj. 20.	35
Figura 16	TVTC extragenital (12). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de macrófagos e neutrófilos intersticiais para o anticorpo anti-CD18. Obj. 10.	36
Figura 17	TVTC genital (4). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de neutrófilos intersticiais para o anticorpo anti-CD18. Obj. 20.	36
Figura 18	Controle-positivo (linfonodo de cão). Intensa imuno-reatividade em linfócitos T presentes predominantemente fora dos centros foliculares para o anticorpo anti-CD3. Obj. 10.	37
Figura 19	TVTC genital (2). Fraca imuno-reatividade para o anticorpo anti-CD3, com mais de 90% das células tumorais positivas. Forte marcação de perinuclear em algumas células tumorais. Obj. 20.	38
Figura 20	TVTC genital (3). Moderada imuno-reatividade para o anticorpo anti-CD3, com mais de 90% das células tumorais positivas. Forte marcação perinuclear em algumas células tumorais. Obj. 20.	38
Figura 21	TVTC genital (3). Moderada imuno-reatividade para o anticorpo anti-CD3, com mais de 90% das células tumorais positivas. Forte marcação perinuclear em algumas células tumorais. Obj. 20.	39
Figura 22	TVTC genital (4). Intensa imuno-reatividade, com mais de 90% das células tumorais positivas para o anticorpo anti-CD3. Forte marcação perinuclear em algumas células tumorais. Obj. 20.	39
Figura 23	Controle-positivo (mastocitoma de cão). Intensa imuno-reatividade em mastócitos para o anticorpo anti-CD117. Obj. 20.	40
Figura 24	TVTC genital (4). Intensa imuno-reatividade, com mais de 90% das células tumorais positivas para o anticorpo anti-CD117. Obj. 20.	41
Figura 25	TVTC genital (3). Intensa imuno-reatividade, com mais de 90% das células tumorais positivas para o anticorpo anti-CD117. Obj. 10.	41
Figura 26	TVTC genital (1). Intensa imuno-reatividade, com mais de 90% das células tumorais positivas para o anticorpo anti-CD117. Obj. 10.	42
Figura 27	Controle-positivo (plasmocitoma cão). Intensa imuno-reatividade em plasmócitos neoplásicos para o anticorpo anti-CD79a. Obj. 10.	43

Figura 28	TVTC genital (4). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de plasmócitos e linfócitos intersticiais para o anticorpo anti-CD79a. Obj. 40.	43
Figura 29	TVTC genital (4). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de plasmócitos e linfócitos intersticiais para o anticorpo anti-CD79a. Obj. 10.	44
Figura 30	TVTC genital (1). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de linfócitos intersticiais para o anticorpo anti-CD79a. Obj. 20.	44
Figura 31	TVTC genital (5). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais para o anticorpo anti-CD79a . Obj. 20.	45
Figura 32	TVTC genital (4). Intensa marcação, com mais de 90% das células tumorais positivas com a lectina PHA-L. Obj. 10.	47
Figura 33	TVTC genital (3). Intensa marcação, com mais de 90% das células tumorais positivas com a lectina RCA. Obj. 20.	48
Figura 34	TVTC genital (3). Intensa marcação, com mais de 90% das células tumorais positivas com a lectina RCA. Obj. 10.	48
Figura 35	TVTC genital (4). Intensa marcação, com mais de 90% das células tumorais positivas com a lectina Con-A, com. Obj. 20.	49

ÍNDICE DE TABELAS

		PÁGINA
Tabela 1	Principais marcadores das desordens histiocíticas, as respectivas células que apresentam imuno-reatividade para estes marcadores, estrutura e função destes marcadores	13
Tabela 2	Principais marcadores das desordens de origem linfocítica, as respectivas células que apresentam imuno-reatividade para estes marcadores, estrutura e função destes estes marcadores	15
Tabela 3	Principais marcadores das desordens de origem germinativa, as respectivas células que apresentam imuno-reatividade para estes marcadores, estrutura e função destes estes marcadores	19
Tabela 4	O clone, o tipo e a marca dos anticorpos utilizados	21
Tabela 5	Anticorpos utilizados e os respectivos controles positivos	21
Tabela 6	Características dos anticorpos primários, diluições, tempo de incubação e recuperação antigênica utilizada	22
Tabela 7	Dados dos cães com TVTC genital	24
Tabela 8	Dados dos cães com TVTC extragenital	24
Tabela 9	Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para a lisozima e a quantidade de TVTCs que apresentaram macrófagos e neutrófilos infiltrados positivos	27
Tabela 10	Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para a vimentina	29
Tabela 11	Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para anti-macrófago e a quantidade de TVTCs que apresentaram macrófagos e neutrófilos infiltrados positivos	32
Tabela 12	Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para CD18 e a quantidade de TVTCs que apresentaram macrófagos e neutrófilos infiltrados positivos	34
Tabela 13	Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para CD3	37
Tabela 14	Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para CD117	40
Tabela 15	Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para CD79a	42
Tabela 16	Imuno-reatividade dos TVTCs genitais testados para os respectivos anticorpos	46

Tabela 17	Imuno-reatividade dos TVTCs extragenitais testados para os respectivos anticorpos	46
Tabela 18	Resultado do estudo lectino-histoquímico no TVTC	50
Tabela 19	Resultado do estudo lectino-histoquímico no TVTC	51
Tabela 20	Resultado da expressão das células tumorais dos TVTCs genitais, fixados em formaldeído, para cada anticorpo testado	67
Tabela 21	Resultado da expressão das células tumorais dos TVTCs genitais, fixados em paraformaldeído, para cada anticorpo testado	67
Tabela 22	Resultado da expressão das células tumorais dos TVTCs extragenitais, para cada anticorpo testado	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Etiologia, Transmissão e Localização	2
2.2 Sistema Imune e TVTC	2
2.3 Origem do TVTC	3
2.4 Epidemiologia	3
2.5 Aspectos Macroscópicos e Clínicos	4
2.6 Diagnóstico	4
2.7 Diagnóstico Diferencial	4
2.8 Aspectos Microscópicos	5
2.8.1 Citologia	5
2.8.2 Histopatologia	5
2.8.3 Imuno-histoquímica	5
2.8.3.1 Anticorpos frequentemente empregados na avaliação imuno-histoquímica do TVTC	6
2.8.3.1.1 Anticorpo anti-lisozima (lisozima)	6
2.8.3.1.2 Anticorpo anti-alfa-1-antitripsina (alfa-1-antitripsina)	7
2.8.3.1.3 Anticorpo monoclonal murino contra macrófagos de cão (ACM-1)	7
2.8.3.1.4 Anticorpo anti-vimentina (vimentina)	7
2.8.3.1.5 Anticorpos anti-CD 3 e anti-CD 79a (CD 3 e CD 79a)	8
2.8.3.1.6 Anticorpo anti-proteína p53 (p53)	8
2.8.3.1.7 Anticorpo anti-Bcl-2 (Bcl-2)	8
2.8.3.1.8 Anticorpos que falharam em expressar imuno-reatividade no TVTC	9
2.8.4 Lectino-histoquímica e TVTC	9
2.8.5 Microscopia eletrônica	9
2.9 Outros Tumores Transmissíveis	10
2.10 Marcadores Imuno-histoquímicos das Desordens Histiocíticas	10
2.10.1 Anticorpo anti-CD18 (CD18)	11
2.10.2 Anticorpo anti-MHC de classe II (MHC classe II)	12
2.10.3 Anticorpo anti-CD1 (CD1)	12
2.10.4 Anticorpo anti-Lisozima (lisozima)	12
2.11 Marcadores Imuno-histoquímicos Para Célular Anticorpos de Origem Linfocítica	14
2.11.1 Anticorpo anti-CD3 (CD3)	14

2.11.2 Anticorpo anti-CD 79a (CD79a)	14
2.11.3 Anticorpo anti-CD45 (CD45)	14
2.12 Principais Tumores de Origem Germinativa	15
2.12.1 Anticorpo anti-CD117 (CD117)	16
2.12.2 Anticorpo anti-fosfatase alcalina placentária (PLAP)	17
2.12.3 Anticorpo anti- alfa-fetoproteína (AFP)	17
2.12.4 Anticorpo anti-CD30 (CD30)	17
2.12.5 Anticorpo anti-OCT3/4 (OCT3/4)	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Animais	20
3.2 Citologia	20
3.3 Histopatologia	20
3.4 Imuno-histoquímica	21
3.4.1 Anticorpos utilizados	21
3.4.2 Controles positivos	21
3.4.3 A técnica da imuno-histoquímica	22
3.5 Lectino-histoquímica	22
3.5.1 A técnica da lectino-histoquímica	23
3.6 Interpretação dos resultados da imuno-histoquímica e lectino-histoquímica	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Dados dos Animais	24
4.2 Aspectos Macroscópicos e Clínicos	25
4.3 Citologia	25
4.4 Histopatologia	25
4.5 Imuno-histoquímica	27
4.5.1 Anticorpo policlonal anti-lisozima (lisozima)	27
4.5.2 Anticorpo monoclonal anti-vimentina (vimentina)	29
4.5.3 Anticorpo monoclonal anti-macrófago (anti-macrófago)	32
4.5.4 Anticorpo monoclonal anti-CD 18 (CD 18)	34
4.5.5 Anticorpo anti-CD3 (CD 3)	37
4.5.6 Anticorpo anti-CD117 (CD 117)	40
4.5.7 Anticorpo anti-CD 79a (CD 79a)	42
4.6 Lectino-histoquímica	47

5	DISCUSSÃO	52
5.1	Citopatologia e Histopatologia	52
5.2	Imuno-histoquímica	52
5.2.1	Marcadores das desordens histiocíticas	52
5.2.1.1	Anticorpo anti-lisozima (lisozima)	52
5.2.1.2	Anticorpo anti-macrófago (anti-macrófago)	53
5.2.1.3	Anticorpo anti-CD18 (CD18)	53
5.2.2	Marcadores das desordens linfocíticas	54
5.2.2.1	Anticorpo anti-CD3 (CD3)	54
5.2.2.2	Anticorpo anti-CD79a (CD79a)	54
5.2.3	Marcador de células mesenquimais	55
5.2.3.1	Anticorpo anti-vimentina (vimentina)	55
5.2.4	Marcadores de tumores germinativos	55
5.2.4.1	Anticorpo anti-CD117 (c-Kit)	55
5.3	Lectino-histoquímica	56
5.4	Possível Origem do TVTC	56
6	CONCLUSÕES	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
8	ANEXO	67

1 INTRODUÇÃO

O Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC) é uma doença neoplásica incluída no grupo dos chamados “Tumores de Células Redondas”, que tem recebido diversas denominações, tais como, linfossarcoma infeccioso ou transmissível, condiloma canino, granuloma venéreo, sarcoma infeccioso, linfoma venéreo e tumor ou granuloma de Sticker (VERMOOTEN, 1987).

O TVTC acomete principalmente os órgãos genitais externos de cães machos e fêmeas e é uma das raras neoplasias capaz de ser transmitida pelo transplante de células tumorais viáveis, através do coito ou de lambedura de áreas afetadas. O diagnóstico da forma clássica do TVTC geralmente é fácil e fundamentado no histórico, na apresentação clínica e na citologia ou histopatologia.

Embora não haja maiores dificuldades para o estabelecimento do diagnóstico do TVTC quando localizado no trato genital, esse tumor pode ser confundido com diversas condições, neoplásicas e não-neoplásicas, caso se encontre em outros locais. Nestes casos, além do histórico, da avaliação clínica, da citologia e da histopatologia, outras técnicas como, a imuno-histoquímica podem ser necessárias para o diagnóstico definitivo.

A origem histo/citogenética do TVTC, por outro lado, é controversa, mesmo porque há discrepâncias sobre a caracterização imuno-histoquímica dessa neoplasia; alguns autores acreditam que o TVTC tenha imunofenótipo histiocítico (MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997), enquanto outros não confirmaram esse achado em estudos imuno-histoquímicos e lectino-histoquímicos do TVTC (GIMENO et al., 1995; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; GROSS et al., 2005; MASCARENHAS, 2010). Além disto, a análise genética dos TVTCs indicou heterogeneidade do tumor, com uma diversidade substancial de linhagem presente em todo o mundo (MURGIA et al., 2006; REBBECK et al., 2009), o que poderia justificar a diferença na expressão de proteínas e portanto a controvérsia nos estudos sobre a origem da neoplasia.

Dessa maneira, este estudo visa aprofundar a investigação sobre a natureza (origem) do TVTC, iniciada em trabalhos anteriores (MASCARENHAS, 2010), através de estudos complementares de imuno-histoquímica e de lectino-histoquímica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia, Transmissão e Localização

O Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC) é uma doença neoplásica que acomete principalmente os órgãos genitais externos de cães machos e fêmeas (COHEN,1985; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

O TVTC foi a primeira neoplasia na história da patologia a ser transmitida experimentalmente (NOVINSKY, 1876 segundo EPSTEIN; BENNETT, 1974; YANG et al.,1991). Prier e Johnson (1964) inocularam células tumorais por via intravenosa e observaram a disseminação deste tumor na maioria dos órgãos internos (VERMOOTEN, 1987). Essa neoplasia é transmitida pela deposição de células tumorais intactas em superfícies epiteliais previamente lesadas. Na natureza, o TVTC é sobretudo propagado pelo coito ou por lambeduras de áreas tumorais. Lesões genitais são mais comuns, pois no momento do ato sexual há lesão da mucosa genital e o transplante das células tumorais (VERMOOTEN, 1987).

O TVTC não ocorre primariamente apenas na mucosa da região genital, mas também na pele e em outras mucosas (JUBB; KENNEDY; PALMER, 2007). Mordeduras, o ato de coçar e/ou lambeduras predispõe à inoculação do tumor na pele (VERMOOTEN, 1987). Metástases são mais frequentes em linfonodos regionais, pele e conjuntiva ocular, porém olhos, sistema nervoso central, rins, fígado, pulmão, baço e vários outros locais podem ser destino destas metástases (DAS; DAS, 2000).

2.2 Sistema Imune e TVTC

O desenvolvimento do TVTC é mediado pelo sistema imune do hospedeiro, assim, o sucesso do crescimento desta neoplasia representa uma falha do sistema imune. Segundo Mukaratirwa et al. (2004), cães imunossuprimidos infectados experimentalmente com células viáveis de TVTC, desenvolveram o tumor com metástases, entretanto, após a regressão da neoplasia, estes obtiveram imunidade contra subseqüentes implantações. Filhotes nascidos de cadelas com esta neoplasia também apresentam menos chances de contrair esta neoplasia (MUKARATIRWA et al., 2004).

Em animais saudáveis, o TVTC regride espontaneamente. A regressão está associada à infiltração de linfócitos, plasmócitos, necrose (PEREZ et al., 1998) e apoptose (STOCKMANN et al., 2011). As moléculas do complexo de histocompatibilidade, MHC classe I e classe II, não estão presentes ou estão presentes em uma quantidade muito pequena nas células neoplásicas do tumor na fase de progressão. Já na fase de regressão, uma grande proporção das células neoplásicas expressam MHC classe I e II (PEREZ et al., 1998, HSIAO et al., 2004).

Além desta não expressão do MHC, as células neoplásicas liberam substâncias, tais como proteínas citotóxicas, que promovem a apoptose dos linfócitos B durante a fase de progressão (LIAO et al., 2003). As células do TVTC produzem o fator de crescimento TGF- β 1 que inibe a atividade das células T “Natural Killer” (NK) e a infiltração de linfócitos citotóxicos (HSIAO et al., 2004).

A expressão de MHC pelas células do TVTC pode ser induzida pela interleucina 6 (IL-6), em vivo e em vitro, e pelo interferon- γ (em vitro) (STOCKMANN et al., 2011). Assim, a IL-6 secretada por linfócitos infiltrados no tumor, junto com o interferon- γ iniciam a regressão do

tumor, através da ativação da expressão do MHC classe I e II nas células tumorais (HSIAO et al., 2008).

2.3 Origem do TVTC

Estudos citogenéticos revelaram que uma vez originado, o TVTC subsequentemente se distribuiu por todo o mundo. Foi verificado primeiro, que as células do tumor apresentam um número reduzido de cromossomos em relação as células somáticas dos cães, $2n = 57-59$ neste tumor e $2n=78$ nas células somáticas dos cães (COHEN, 1985; ROGERS, 1997). Esta redução no número de cromossomos é justificada por várias fusões ocorridas entre cromossomos menores (16-18 bi-armed derivatives) (MAKINO 1963; MURRAY et al., 1969; VERMOOTEN, 1987). Como o número total de fitas de cromossomos é muito parecido com o genoma de cães normais, tem se proposto que o rearranjo no cariótipo do TVTC não está associado a mudanças significativas no conteúdo do DNA (MAKINO, 1963; WEBER et al., 1965). Além disto, os TVTCs de diferentes regiões geográficas possuem a inserção do elemento LINE-1 próximo ao gene c-myc no genoma. Esta alteração não é achada no genoma de cães normais e pode ser utilizada como um meio de diagnóstico deste tumor (LIAO et al., 2003). Murgia et al. (2006) confirmaram o modelo de transmissão clonal, pois verificaram um padrão de polimorfismo micro-satélite no TVTC de diferentes regiões do mundo, o que evidencia uma origem monofilética. Estes autores também verificaram diferenças nas mitocôndrias e no MHC e sugerem que o TVTC está dividido em 2 distintos grupos pelas diversas regiões geográficas. Já Liao et al. (2003) sugerem que tumores de diferentes regiões geográficas possuem ganhos e perdas diferentes nos padrões cromossômiais, o que leva a formação de linhagens locais deste tumor.

Através de investigações do ancestral genético desta neoplasia, Rebbeck et al. (2009) determinaram que provavelmente este tumor tenha se desenvolvido de cães ou do lobo. Além disto, o TVTC apresentou intensa identidade com células do lobo em estudos que utilizaram polimorfismo micro-satélite. As variantes de MHC presentes nas células neoplásicas dos cães também apresentaram intensa relação filogenética com as variantes MHC de lobo (MURGIA et al., 2006). Em um recente estudo, suspeita-se que o TVTC tenha se originado de uma única célula de lobo a aproximadamente 7.800 à 78.000 anos atrás (REBBECK et al., 2009). Esta evidência indica que este tumor é um clone da célula somática transplantável mais antiga já descrita (MURCHISON, 2009).

2.4 Epidemiologia

O paciente com o TVTC é, na grande maioria das vezes, um cão adulto jovem, sexualmente ativo, com histórico de contatos sociais (VERMOOTEN, 1987; LORIMIER; FAN, 2007). Animais jovens, mal-nutridos e imunologicamente deficientes são os mais acometidos (COHEN, 1985). Segundo alguns autores (BLOOM; PAFF; NOBACK, 1951; COHEN, 1985), em animais saudáveis, a regressão espontânea é considerada frequente e a recorrência rara.

2.5 Aspectos Macroscópicos e Clínicos

Tanto nas fêmeas, quanto nos machos o tumor pode se apresentar como nódulos únicos ou múltiplos, pedunculados ou não, multilobulados (VERMOOTEN, 1987) ou como massas com aparência de “couve-flor” (VERMOOTEN, 1987; ROGERS, 1997; PAPAZOGLU et al., 2001). Em machos, o TVTC frequentemente acomete a glândula do pênis, o bulbo, o pênis e o prepúcio, entretanto pode-se achar lesões em todas estas regiões. O bulbo é a região de ocorrência mais comum (VERMOOTEN, 1987). Nas fêmeas, o TVTC vaginal é quase sempre multilobulado, friável e hemorrágico. O crescimento exacerbado da neoplasia pode ocluir a luz da vagina e induzir ulcerações na pele da vulva e períneo (NIELSEN; KENNEDY, 1990; MORRISON, 1998). A cor dos nódulos varia de rosa pálida à vermelho brilhosa, pode ser friável, hemorrágico e com o tempo se tornar necrótico e ulcerado com infecção secundária (SINGH et al., 1998).

Os cães geralmente manifestam sinais crônicos de desconforto e podem apresentar sangramentos através da vulva ou do prepúcio por semanas ou até meses antes do diagnóstico (LORIMIER; FAN, 2007).

A ocorrência de TVTC exclusivamente extragenital já é conhecida. Tem-se descrito o tumor nas cavidades oral (BRIGHT et al., 1983; RAMADINHA; RAMADINHA; KUNER, 1993;) e nasal (NDIRITU; MBOGWA; SAYER, 1977; BRIGHT et al., 1983; MORRISON, 1998; PAPAZOGLU et al., 2001), oro-nasal (AMBER; ADEYANJU, 1986), nas tonsilas (THEILEN; MADEWELL, 1987), olhos e conjuntiva (BARRON et al., 1963), pele (NIELSEN; KENNEDY, 1990) e mucosa anal (BATAMUZI; BITTEGEKO, 1991). Casos de TVTC generalizado com diversas metástases também têm sido descritos (RAMADINHA; VIANA; RAMADINHA, 1985). Emagrecimento progressivo, anemia e apatia podem ocorrer, principalmente nos casos com múltiplas metástases (BOSCOS, 1988; OGILVIE; MOORE, 1995).

2.6 Diagnóstico

O histórico, os sinais clínicos e uma boa avaliação física podem sugerir um diagnóstico presuntivo da apresentação clássica do TVTC (LORIMIER; FAN, 2007). No caso do TVTC extragenital, definir o diagnóstico é geralmente mais complicado. Além do histórico e exame clínico, os achados citológicos e histopatológicos são os métodos mais viáveis para se obter o diagnóstico. Se a histopatologia não for conclusiva, a imuno-histoquímica tem sido utilizada para caracterizar o TVTC e diferenciá-lo de outras neoplasias, principalmente de outros tumores de células redondas (MOZOS, et al., 1996; MARCHAL, et al., 1997, SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001). Adicionalmente, podem ser feitas análises cromossômicas e estudos de transmissão para se obter o diagnóstico definitivo (DAS; DAS, 2000).

2.7 Diagnóstico Diferencial

Todos os tumores de células redondas como os linfomas, plasmocitomas, histiocitomas, mastocitomas e melanomas amelanóticos são importantes diagnósticos diferenciais (MOZOS et al., 1996; LORIMIER; FAN, 2007). Este grupo de tumor é caracterizado por ser constituído de células redondas a ovais, o que os diferencia dos tumores de células fusiformes (DUCAN;

PRASSE, 1979). Os carcinomas pobremente diferenciados também devem ser levados em consideração no diagnóstico diferencial (GROSS et al., 2005).

Para o diagnóstico destas neoplasias é fundamental o histórico, exame clínico, a citologia e o padrão histopatológico (DUCAN; PRASSE, 1979). A imuno-histoquímica tem sido utilizada como mais um meio auxiliar à histopatologia no diagnóstico de várias neoplasias, inclusive no diagnóstico dos tumores de células redondas (FERNADEZ et al., 2005).

2.8 Aspectos Microscópicos

2.8.1 Citologia

Em geral, a morfologia do TVTC é bem característica no exame citológico. As células tumorais são dispostas em lençol (monocamadas), há alta celularidade, independentemente de serem provenientes de tumor genital ou extragenital (MURRAY; JAMES; MARTIN, 1969; COWELL; TYLER, 1989). Os esfregaços caracterizam-se pelo predomínio de células arredondadas e volumosas, cujos diâmetros variam de 14 a 30 micrômetros. Os núcleos são redondos a ovalados, com cromatina marginada e nucléolos únicos, grandes e centrais (DUCAN; PRASSE, 1979; NIELSEN; KENNEDY, 1990; ROGERS, 1997). As figuras mitóticas são frequentes (NIELSEN; KENNEDY, 1990; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001). O citoplasma, levemente azulado, apresenta granulação fina, e vacúolos claros bem definidos que, apesar da natureza ainda desconhecida (DUCAN; PRASSE, 1979) são considerados como a característica mais importante do exame citológico deste tumor (LORIMIER; FAN, 2007). Esses vacúolos adquirem importância principalmente quando os TVTC são extragenitais, diferenciando-os de outras neoplasias como histiocitomas e linfomas. Neutrófilos, linfócitos e macrófagos são frequentemente observados entre as células tumorais (DUCAN; PRASSE, 1979).

2.8.2 Histopatologia

Em lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (H.E.) observam-se células grandes, cujos formatos variam entre redondo, ovalado ou poliédrico, consideradas bastante uniformes quanto ao aspecto e tamanho. Os núcleos são grandes, redondos, levemente vesiculares e contêm, na maioria das vezes, apenas um nucléolo central e proeminente. Seu abundante citoplasma, finamente granular, apresenta limites precisos e cora-se discretamente em azul pela hematoxilina (NIELSEN; KENNEDY, 1990; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001). A relação núcleo/citoplasma em geral é de 1:1 (DUNCAN; PRASSE, 1979; WHITE, 1991). Moderado pleomorfismo celular pode ocorrer (NIELSEN; KENNEDY, 1990; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

2.8.3 Imuno-histoquímica

O diagnóstico dos tumores de células redondas, baseado apenas na histopatologia é frequentemente um desafio. Estas neoplasias especialmente os pobremente diferenciados, podem se apresentar morfológicamente similares. A obtenção do diagnóstico preciso é importante para se determinar o prognóstico e o tratamento adequado. A imuno-histoquímica

tem sido utilizada como mais um meio para o diagnóstico de neoplasias, incluindo os tumores de células redondas (HAINES; CHELACK, 1991). Fernandez et al. (2005) obteve o diagnóstico definitivo de 80% dos tumores de células redondas pobremente diferenciados através da imuno-histoquímica.

Com relação ao TVTC, trabalhos na Espanha e na França fortalecem a hipótese de que o TVTC tenha imunofenótipo histiocítico (MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997), uma vez que houve imuno-reatividade em células tumorais de TVTC para lisozima, alfa-1-antitripsina e ACM-1 (anticorpo monoclonal murino contra macrófagos de cão). Gross et al. (2005), entretanto, afirmam que estudos imuno-histoquímicos em tecidos congelados de TVTC não confirmaram a origem histiocítica deste tumor. Segundo estes autores, estudos imuno-histoquímicos e citométricos do TVTC têm constantemente falhado em demonstrar a expressão de glicoproteínas características para histiócitos (macrófagos e células dendríticas), como CD11b, CD11c, CD1 e MHC II. Outros estudos indicam que o TVTC é formado de leucócitos imaturos, o que sugere origem mieloide (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Mascarenhas (2010) também sugere que não esteja correta a teoria da origem histiocítica do TVTC citada na literatura já que não verificou expressão das células tumorais do TVTC para lisozima e anti-macrófago.

2.8.3.1 Anticorpos frequentemente empregados na avaliação imuno-histoquímica do TVTC

A maioria dos anticorpos utilizados na imuno-histoquímica em medicina veterinária são desenvolvidos contra os antígenos celulares humanos (MOZOS et al., 1996; RAMOS-VARA et al., 2008) ou de roedores (RAMOS-VARA et al., 2008).

2.8.3.1.1 Anticorpo anti-lisozima (lisozima)

A lisozima é uma enzima bacteriolítica de baixo peso molecular. Em humanos essa enzima é sintetizada e secretada por histiócitos, monócitos, granulócitos e algumas células epiteliais, e é utilizada como marcador imuno-histoquímico para desordens histiocíticas proliferativas. Em cães esta enzima encontra-se presente em macrófagos, leucócitos mielóides, células epiteliais de glândulas exócrinas e nas desordens histiocíticas como histiocitose sistêmica, histiocitose maligna e paniculite granulomatosa (MOORE, 1986b). Em histiocitomas cutâneos (tumor de células de Langerhans) canino, entretanto, a presença da lisozima tem sido variável (MOORE, 1986b; SANDUSKY; CARLTON; WIGHTMAN, 1987) ou até nula (MARCHAL et al., 1997). Apesar do anticorpo anti-lisozima detectar imuno-reatividade em tumores de origem não-histiocítica em cão, a demonstração de imuno-reatividade desta enzima em TVTC tem sido tomada como hipótese de que esse tumor tenha origem histiocítica (MARCHAL et al., 1997). Marchal et al. (1997) verificaram 100% de imuno-reatividade da lisozima nos TVTCs testados, enquanto Mozos et al. (1996) encontraram apenas 40% de expressão deste anticorpo neste tumor. Mascarenhas (2010) não verificou expressão da lisozima nos TVTCs testados (23 tumores), entretanto macrófagos e neutrófilos infiltrados no tumor apresentaram intensa imuno-reatividade. Essa forte marcação das células inflamatórias pode facilmente ser confundida com a das células neoplásicas o que poderia justificar a diferença encontrada pelos outros autores (MASCARENHAS, 2010).

A expressão da lisozima é importante para o diagnóstico diferencial do TVTC porque exclui linfomas, melanomas amelanóticos epitelioides, carcinomas pouco diferenciados e mastocitomas (MOZOS et al., 1996).

2.8.3.1.2 Anticorpo anti-alfa-1-antitripsina (alfa-1-antitripsina)

Alfa-1-antitripsina (AAT) é a antiprotease predominante na circulação humana. Tem sido identificada em uma grande variedade de tecidos, porém sua síntese foi demonstrada apenas em hepatócitos, monócitos e macrófagos teciduais (CARLSON et al., 1988). A AAT é considerada um marcador confiável para neoplasias linforreticulares de origem histiocítica em humanos (ISAACSON et al., 1981). Mozos et al. (1996) verificaram que 56% dos TVTCs testados foram positivos para este anticorpo, o que reforçou ainda mais a origem histiocítica deste tumor, uma vez que em humanos a AAT é um marcador confiável para esta origem.

Além deste anticorpo, a muramidase e a alfa-1-antiquimotripsina têm sido aceitas como marcadores de histiocitose benigna e maligna, entretanto, em estudos com histiocitoma cutâneo de cão nenhum destes marcadores se mostraram confiáveis para o diagnóstico (MOORE, 1986b; SANDUSKY; CARLTON; WIGHTMAN, 1987).

A expressão da AAT é importante para o diagnóstico diferencial do TVTC porque exclui linfomas, melanomas amelanóticos epitelioides, carcinomas pouco diferenciados e mastocitomas (MOZOS et al., 1996).

2.8.3.1.3 Anticorpo monoclonal murino contra macrófagos de cão (ACM-1)

ACM-1 é destinado a um antígeno que ainda não foi caracterizado bioquimicamente. Segundo Marchal et al. (1997) este anticorpo tem reatividade similar à do anticorpo CD 68 e identifica células da linhagem histiocítica. O anticorpo monoclonal murino contra macrófagos de cão (ACM-1) reconhece a maioria das células do sistema mononuclear fagocitário canino, assim como o TVTC, o que tem sido reconhecido como indicador da origem em células de linhagem histiocítica da neoplasia (MARCHAL et al., 1997).

2.8.3.1.4 Anticorpo anti-vimentina (vimentina)

O TVTC também apresenta imuno-reatividade conhecida para a vimentina. Sandusky, Carlton e Wightman (1987), Mozos et al. (1996) e Mascarenhas (2010) verificaram 100% de imuno-reatividade da vimentina nos TVTCs testados enquanto Marchal et al. (1997) encontraram uma média de 71,4%. A vimentina é uma proteína fibrosa intracelular derivada da família de filamentos intermediários (MARCHAL et al., 1997). A avaliação imuno-histoquímica de filamentos intermediários é uma ferramenta importante na caracterização e na histogênese da população celular. É bom lembrar que células epiteliais expressam filamentos de citoqueratinas, células mesenquimais expressam filamentos de vimentina e células musculares expressam filamentos de desmina (ESTEXHE et al., 1993).

O anticorpo anti-vimentina tem sido amplamente utilizado, tanto na medicina humana quanto na veterinária para confirmar a origem mesenquimal de vários tumores (MORRIS et al., 2002). Entretanto, células tumorais de origem neural, podem também expressar positividade para este anticorpo (MARCHAL et al., 1997).

Por ser um marcador de células mesenquimais (SANDUSKY; CARLTON; WIGHTMAN, 1987; MARCHAL et al., 1997; FULMER; MAULDIN, 2007), o anticorpo anti-vimentina torna-se importante para o diagnóstico diferencial do TVTC porque exclui linfomas e carcinomas indiferenciados (MOZOS et al. 1996).

Por outro lado, segundo Marchal et al. (1997), a ampla expressão deste anticorpo não auxilia na determinação da origem citogenética do TVTC.

2.8.3.1.5 Anticorpos anti-CD 3 e anti-CD 79a (CD 3 e CD 79a)

A reatividade aos antígenos CD3 policlonais tem sido detectada para linfócitos T de cães e é usada como um marcador para linfomas do tipo T (TRAIL; YANG,1985), dessa forma, a maioria dos linfomas cutâneos caninos expressa este anticorpo (FERRER et al., 1993, FERNANDEZ et al., 2005), enquanto que os linfomas constituídos de linfócitos B são positivos para CD 79a (FERNANDEZ et al., 2005).

Estes anticorpos também podem ser empregados na avaliação do comportamento biológico do TVTC que depende da resposta humoral dos animais. Em estudos experimentais, tem-se descrito um aumento significativo de linfócitos B no TVTC em progressão e um aumento de infiltrado linfocítico T naqueles tumores em regressão (MOZOS et al., 1996). O anticorpo CD3 pode ser útil para a avaliação da fase tumoral (progressão ou regressão). Estes achados são indicativos da resposta humoral do animal desenvolvida contra o tumor (EPSTEIN; BENNETT, 1974). Assim o tratamento poderá ser mais adequadamente selecionado ao se saber em que fase o tumor está (MOZOS et al., 1996).

2.8.3.1.6 Anticorpo anti-proteína p53 (p53)

O gene supressor de tumor p53, localizado no cromossomo 17, codifica uma fosfoproteína denominada proteína p53, que desempenha um importante papel no controle do ciclo celular. Esta proteína tem o papel de bloquear a divisão celular em células que sofreram injúrias no seu DNA. A perda da função desse gene pode estar relacionada tanto à iniciação quanto à progressão tumoral. Mutações na proteína p53 são encontradas em cerca de 50% de todos os cânceres humanos, ou mais de 50 tipos de tumores (ALMEIDA et al., 2007).

Nas neoplasias caninas, já foram descritas mais de 10 diferentes mutações no gene p53 (STOCKMANN et al., 2011). Recentemente, mutações neste gene também foram descritas no TVTC (CHOI; KIM, 2002; SANCHEZ-SERVÍN et al., 2009). Moro et al. (2010) relatam que o TVTC transplantado na fase de regressão expressa mais p53 do que os TVTCs que ocorrem naturalmente. Segundo estes autores, este achado sugere que deve haver anormalidades funcionais no gene p53 deste tumor. A perda da função de p53 é um evento comum em muitos tumores caninos e nos humanos. A inativação deste gene não ocorre apenas por mutações ou por eventos deletérios do p53, mas também pela ruptura de vias que regulam a sua atividade, como a via Mdm2 (STOCKMANN et al., 2011).

2.8.3.1.7 Anticorpo anti-Bcl-2 (Bcl-2)

A família Bcl-2 é um grupo de proteínas que induz ou inibe a morte celular por apoptose. A expressão de Bcl-2 tem sido associada com o gene p53 mutante. A p53 pode induzir a apoptose com o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e com a formação de

proteínas do complexo Bcl2. Estas alterações levam à liberação do citocromo C das mitocôndrias e assim à apoptose. As células do TVTC apresentaram intensa expressão para a proteína Bcl-2 independente do estágio do tumor (STOCKMANN et al., 2011). A família Bcl-2 participa da carcinogênese. A expressão desta proteína pode estar associada à resistência a drogas e à radioterapia, como também à baixa malignidade e a um prognóstico favorável (BROWN; CALVERT; MACEWEN, 1980).

2.8.3.1.8 Anticorpos que falharam em expressar imuno-reatividade no TVTC

Segundo Mozos et al. (1996) e Marchal et al. (1997) as células tumorais do TVTC não foram reativas para imunoglobulinas (IgG, IgM), antígenos CD3, citoqueratinas, proteína S100, enolase neurônio específica, proteína ácida fibrilar glial, imunoglobulinas kappa e lambda de cadeia leve.

2.8.4 Lectino-histoquímica e TVTC

A lectino-histoquímica permite o estudo da presença de carboidratos ou glicoconjugados em tecidos normais e patológicos. Nos últimos anos, esta tem sido uma poderosa técnica de demonstração de carboidratos na superfície celular e em determinadas organelas. Em humanos, tem-se usado a lectina-histoquímica para investigação patológica de diversos tumores, entretanto, em pequenos animais os estudos com esta técnica ainda são muito escassos (GIMENO et al., 1995).

Gimeno et al. (1995) verificaram expressão nas células do TVTC de glicoconjugados com afinidade para *Triticum vulgare* (WGA), *Concanavalia ensiformis* (Con A) e *Ricinus communis I* (RCA-I). Já para *Ulex europaeus-I* (UEA-I), *Arachis hypogaea* (PNA), *Glycine max* (SBA) e *Dolichos biflorus* (DBA) não reagiram com as células do TVTC.

Segundo estes autores, a expressão de Con A, WGA e RCA-I indica a presença de manose, glucose, galactose, N-acetyl-glucosamina e ácido siálico nas células do TVTC. A expressão destas lectinas coincide com a expressão das células neoplásicas de linfoma Hodgkin e Reed-Sternberg. Outros tumores derivados desta linhagem celular ou de neoplasias mesenquimais em humanos como tumores de linfócitos B e T, histiócitos, linfoma Burkitt, promielócito e mieloma também são Con A, WGA e RCA-I positivos (GIMENO et al., 1995).

2.8.5 Microscopia eletrônica

Segundo Kennedy, Yang e Allen (1977) nas fases iniciais de crescimento, o TVTC parece ser composto por um frouxo arranjo de células redondas. Com o crescimento do tumor, as células apresentam-se compactas com inúmeras interdigitações na membrana plasmática. As características ultraestruturais das células são semelhantes à de tumores linforreticulares. Os núcleos são grandes arredondados ou ovais, com membrana nuclear irregular e, algumas vezes com invaginação. O nucléolo é grande, único, típico e proeminente. O citoplasma é abundante com muitos ribossomos sob a forma de polissomos ou aglomerados. Os lisossomos são pequenos. O retículo endoplasmático e as mitocôndrias são grandes, arredondados ou ovais contendo poucas cristas. O aparelho de Golgi é pequeno, paranuclear e associado aos centríolos. Grânulos eletrodensos e vacúolos são vistos no citoplasma. A membrana

plasmática emite projeções que se interdigitam com as células adjacentes (SANTOS et al., 2005).

2.9 Outros Tumores Transmissíveis

O câncer pode, ocasionalmente, ser causado por agentes infecciosos, tais como bactérias, parasitos e vírus, entretanto, não é considerado uma doença transmissível. Em raras circunstâncias a transmissão direta de células tumorais de um hospedeiro para o outro tem sido documentada, como no caso do TVTC e no Tumor Facial do Diabo da Tasmânia (TFDT) (WELSH, 2011).

O Diabo da Tasmânia (*Sarcophilus harrisii*) é uma espécie animal ameaçada de extinção devido a disseminação do TFDT. O tumor afeta a face do animal e leva à morte em até 6 meses por obstrução das vias aéreas e pela incapacidade de o animal se alimentar. A transmissão ocorre pelo contato direto com as células neoplásicas em brigas ou no acasalamento (FASSATI; MITCHISON, 2010). A confirmação de que o TFDT tem sido transplantado em diferentes Diabos da Tasmânia foi feita através de estudos citogenéticos. Diversas amostras deste tumor revelaram um total de 13 cromossomos, o que difere da quantidade de cromossomos do hospedeiro, que possuem 14 cromossomos. Diferentemente do TVTC, os Diabos da Tasmânia possuem uma falha na diversidade genética e com isso os tumores transplantáveis não são rejeitados pelo hospedeiro, o que permite que a doença progrida e leve à morte (WELSH, 2011).

Uma análise recente indicou que este tumor tenha origem neuroendócrina, pois se verificou expressão para a vimentina, S-100, enolase-neurônio específica, cromogranina A e marcadores sinápticos (MURCHISON et al., 2010).

Além disto, o TFDT também apresentou imuno-reatividade para uma ampla variedade de proteínas de mielinização como periaxina, proteína mielínica periférica 22 e para o receptor do fator de crescimento neural. Baseado neste imunofenótipo foi sugerido que este tumor tenha origem em células de Schwann do sistema nervoso periférico (KRESS et al., 2011).

2.10 Marcadores Imuno-histoquímicos das Desordens Histiocíticas

Histiócitos fazem parte do grupo dos leucócitos e por isso são importantes para o funcionamento do sistema imune. Estas células derivam de precursores (+CD34) presentes na medula óssea. Sob a influência de várias citocinas, elas se diferenciam em duas linhagens celulares: macrófagos/monócitos ou em linhagens de células dendríticas. Apesar da diferenciação celular, estas células permanecem com muitos antígenos de superfície semelhantes, como por exemplo, os receptores de imunoglobulinas e das moléculas do complemento (FULMER; MAULDIN, 2007).

As células dendríticas são potentes apresentadoras de antígenos presentes na epiderme, derme e lâmina própria. A linhagem celular da epiderme é conhecida por células de Langerhans enquanto a linhagem presente na derme é conhecida como células dendríticas intersticiais (FULMER; MAULDIN, 2007). Um elemento comum nas desordens histiocíticas proliferativas é a proliferação das células dendríticas, células de Langerhans ou células dendríticas intersticiais (MOORE et al., 2006). Já a linhagem macrocítica/monocítica é especializada em atividades fagocíticas.

Em cães as desordens histiocíticas têm sido classificadas em três categorias: o histiocitoma cutâneo, histiocitose reativa (cutânea e sistêmica) e o complexo sarcoma

histiocítico que inclui o sarcoma histiocítico localizado e o generalizado (FULMER; MAULDIN, 2007). Para o diagnóstico definitivo destas desordens, Moore et al. (2006) sugerem um painel de anticorpos com antígenos leucocitários como CD1, CD11c, CD11d e o CD18.

Os histiocitomas têm o fenótipo característico das células de Langerhans pois expressam CD1a, CD1b, CD1c, MHC classe II, CD11c e E-caderina. Entre os leucócitos, apenas as células de Langerhans expressam o anticorpo E-caderina. Os sarcomas histiocíticos e a histiocitose maligna expressam moléculas de superfície características com as células dendríticas (CD1, CD11c e MHC II), entretanto, não apresentam imuno-reatividade para a E-caderina diferenciando-os do histiocitoma. Na histiocitose reativa (cutânea ou sistêmica) há a proliferação de células dendríticas intersticiais que expressam Thy-1 e CD4 diferente das outras desordens histiocitárias (MOORE, 2011).

Fulmer e Mauldin (2007) recomendam a utilização do painel de anticorpos CD3, CD11d, CD18, CD45RA, CD79a e E-caderina, em tecidos fixados em formol, para o diagnóstico de tumores de origem linfocítica, histiocítica, mastocitomas, leiomiosarcomas e o histiocitoma fibroso maligno.

Com relação ao TVTC, Gross et al. (2005), afirmam que estudos imuno-histoquímicos em tecidos congelados de TVTC não confirmaram a origem histiocítica deste tumor. Segundo estes autores, estudos imuno-histoquímicos e citométricos do TVTC têm falhado em demonstrar a expressão de glicoproteínas características para histiócitos (macrófagos e células dendríticas), como CD11b, CD11c, CD1 e MHC II.

2.10.1 Anticorpo anti-CD18 (CD18)

O CD11/ CD18 constituem uma família de glicoproteínas presentes na superfície dos leucócitos e são responsáveis por funções relacionadas à adesão celular, como migração, quimiotaxia e fagocitose. Esta glicoproteína é formada por três moléculas constituídas por uma cadeia α (CD11a, CD11b ou CD11c) específica, associada a uma cadeia β (CD18) comum (HOOGSTENDEN et al., 1991).

Em cães, os linfócitos T expressam CD3 e CD18, enquanto que linfócitos B expressam CD79a e CD18, entretanto, os macrófagos e os granulócitos expressam dez vezes mais CD18 do que os linfócitos em tecidos fixados em formalina (FERNANDEZ et al., 2005). Apesar de todos os leucócitos expressarem as proteínas anti-CD18, o padrão de coloração é bem proeminente em tumores histiocíticos (FULMER; MAULDIN, 2007).

Atualmente, o critério imuno-histoquímico mais utilizado para a identificação de células histiocíticas em tecidos de cão previamente fixados em formol e emblocados em parafina é a verificação da imuno-reatividade para o CD18 e a utilização do CD3 e CD79a para a eliminação de origem linfocítica (AFFOLTER; MOORE, 2002).

Fernandez et al. (2005) sugere a associação do CD18 e o anticorpo MHC de classe II para o diagnóstico de histiocitomas pois este último é mais específico para as células dendríticas do que o primeiro. Além do mais, este autor verificou que mastocitomas pouco diferenciados podem expressar o CD18, o que complicaria o diagnóstico dentre os tumores de células redondas.

2.10.2 Anticorpo anti-MHC de classe II (MHC classe II)

Os antígenos MHC são glicoproteínas de membranas responsáveis pela apresentação de antígenos para os linfócitos T-citotóxicos (Antígeno MHC classe I) e para os linfócitos T-auxiliares (MHC classe II) (MUKARATIRWA; GRUYS, 2004).

O anticorpo anti-MHC de classe II apresenta ampla expressão nas células apresentadoras de antígenos (FULMER; MAULDIN, 2007), como as células dendríticas (FERNANDEZ et al., 2005; FULMER; MAULDIN, 2007).

Estudos demonstraram que os TVTCs no estágio de progressão falharam em expressar MHC classe I e II enquanto 30 a 40% das células tumorais no estágio de regressão do tumor expressaram estes antígenos de membrana (MUKARATIRWA; GRUYS, 2004). Esta falha na expressão destes antígenos nos tumores em progressão explicaria, pelo menos em parte, o crescimento do TVTC em hospedeiros alogênicos, já que não haveria a apresentação destes antígenos de membrana aos linfócitos T citotóxicos e T auxiliares. Nestes casos não haverá a estimulação da resposta imunológica do hospedeiro contra o tumor (PÉREZ et al., 1998; MUKARATIRWA; GRUYS, 2004).

Gross et al. (2005), afirmam que o TVTC tem constantemente falhado em demonstrar a expressão de glicoproteínas características para histiócitos (macrófagos e células dendríticas) como o anticorpo MHC classe II.

2.10.3 Anticorpo anti-CD1 (CD1)

A família de glicoproteínas CD1 (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e CD1e), assim como as glicoproteínas MHC I e II, são responsáveis pela apresentação de antígenos para os linfócitos. A diferença, entretanto, entre estas duas glicoproteínas é que CD1 apresenta lipídeos e MHC apresenta peptídeos. Tem-se demonstrado que várias classes de lipídeos são apresentadas por diferentes isoformas de CD1. Em humanos as células de Langerhans expressam intensamente CD1a, enquanto, as células dendríticas da derme expressam CD1b e CD1c (LOORINGH VAN BEECK et al., 2008).

2.10.4 Anticorpo anti-Lisozima (lisozima)

Moore (1986b) relata que o uso da lisozima como um marcador de células de origem histiocítica tem sido limitada, pois nem todos os macrófagos expressam este anticorpo. Além disto, segundo este autor, as células dendríticas de Langerhans, as células foliculares e as células reticulares interdigitais também têm falhado em apresentar imuno-reatividade para a lisozima. Nos histiocitomas cutâneos (tumor de células de Langerhans) canino a presença da lisozima tem sido variável (MOORE, 1986b; SANDUSKY; CARLTON; WIGHTMAN, 1987) ou até nula (MARCHAL et al., 1997). Morris et al. (2002) não incluíram a lisozima no estudo por obter achados inconsistentes com este anticorpo.

Os principais marcadores das desordens histiocíticas, as respectivas células que apresentam imuno-reatividade para estes marcadores, a estrutura que corresponde estes marcadores e suas funções estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais marcadores das desordens histiocíticas, as respectivas células que apresentam imuno-reatividade para estes marcadores, estrutura e função destes marcadores

Anticorpo	Células Imunoreativas	Estrutura	Função da Estrutura
CD1 (a,b,c)	células de Langerhans e células dendríticas (FULMER; MAULDIN, 2007)	glicoproteínas de membranas - CD1b/ CD1c endossomas, lisossomas (LOORINGH VAN BEECK et al., 2008)	células apresentadoras de antígeno - apresentam lipídeos principalmente para os linfócitos T (LOORINGH VAN BEECK et al., 2008)
CD11b	células mieloides (macrófagos), <i>natural killer cels</i> (FULMER; MAULDIN, 2007)	glicoproteínas de membranas (cadeia α) (HOOGSTENDEN et al., 1991)	adesão celular, migração, quimiotaxia e fagocitose (HOOGSTENDEN et al., 1991)
CD11c	células dendríticas, <i>natural killer cels</i> (FULMER; MAULDIN, 2007).	glicoproteínas de membranas (cadeia α) (HOOGSTENDEN et al., 1991)	adesão celular, como migração, quimiotaxia e fagocitose (HOOGSTENDEN et al., 1991)
CD11d	macrófagos da polpa vermelha do baço e da medula óssea (FULMER; MAULDIN, 2007)	glicoproteínas de membranas (cadeia α) (HOOGSTENDEN et al., 1991)	adesão celular, migração, quimiotaxia e fagocitose (HOOGSTENDEN et al., 1991)
CD18	leucócitos em geral, macrófagos e granulócitos coram 10 vezes mais, mastocitomas indiferenciados (FERNANDEZ et al., 2005)	glicoproteínas de membranas - marcação de membrana e citoplasmática (FERNANDEZ et al., 2005)	adesão celular, migração, quimiotaxia e fagocitose (HOOGSTENDEN et al., 1991)
MHC II	células apresentadoras de antígeno - células dendríticas (FERNANDEZ et al., 2005, FULMER; MAULDIN, 2007)	glicoproteínas de membranas (FERNANDEZ et al., 2005, FULMER; MAULDIN, 2007)	células apresentadoras de antígeno - apresentam peptídeos para os linfócitos T (LOORINGH VAN BEECK et al., 2008)
Thy-1 (CD90)	CD34+ células hematopoiéticas, células dendríticas intestinais (FULMER; MAULDIN, 2007, MOORE, 2011)	glicoproteína de membrana (DRABEROVA; DRABER, 1993)	molécula de adesão - ativação de linfócitos T (DRABEROVA; DRABER, 1993)
E-caderina	específico para células de Langerhans, células epiteliais (FULMER; MAULDIN, 2007)	glicoproteína transmembrana tipo- 1, expressão de membrana e citoplasmática (DENADAI et al., 2007)	adesão celular - atua mediando as interações célula-célula e célula matriz extracelular - mantém a integridade (DENADAI et al., 2007)

2.11 Marcadores Imuno-histoquímicos Para Células de Origem Linfocítica

As células tronco pluripotentes da medula óssea originam células progenitoras mieloides e linfoides. Os progenitores linfoides, por sua vez, irão originar os linfócitos T, B e células NK (JUNIOR et al., 2010).

2.11.1 Anticorpo anti-CD3 (CD3)

Linfócitos T expressam um antígeno intracitoplasmático CD3. Este antígeno consiste em uma cadeia de 5 polipeptídios (gamma-g-, delta-d-, epsilon-e-, zeta-z - eta-h-) com massa molecular de aproximadamente 16-28 kDa. O antígeno CD3 está presente nas células do timo e sua presença indica a futura formação da linhagem celular dos linfócitos T. Nas células do timo, o CD3 aparece predominantemente como um constituinte intracitoplasmático enquanto que nos linfócitos T maduros este antígeno apresenta-se na superfície. O CD3 é um marcador muito específico para os linfócitos T (RAMOS-VARA, 2012).

Os linfócitos T só reconhecem antígenos processados, apresentados por moléculas de MHC na superfície de uma célula apresentadora de antígeno. O receptor de células T é expresso na membrana dos linfócitos T em associação com o complexo CD3. Este receptor é responsável pelo reconhecimento do complexo peptídeo-molécula de MHC, e o CD3, pela sinalização celular subsequente (JUNIOR et al., 2010).

Muitos estudos em humanos têm demonstrado que a molécula CD3 é restrita aos linfócitos T, com possível exceção apenas das células de Purkinje do cerebelo. Para o diagnóstico de linfomas o anticorpo anti-CD3 é considerado um marcador excelente, pois as células neoplásicas preservam este antígeno intracitoplasmático (FERRER et al., 1993).

2.11.2 Anticorpo anti-CD 79a (CD79a)

A molécula CD79 é formada por duas cadeias de polipeptídeos, mb-1 (CD79a) e B29 (CD79b), fisicamente associadas à membrana das células B com imunoglobulinas. O polipeptídeo mb-1 está presente nos primeiros estágios de maturação das células B e persiste até a formação de plasmócitos, onde aparece como um componente intracelular (MASON et al., 1995). O CD79 está associado a pelo menos um receptor de tirosina-quinase. A ativação deste receptor é feita pela ligação com antígenos e desencadeia diversas fosforilações que assim, iniciam a sinalização celular (MASON, et al., 1995). É encontrado na maioria das leucemias agudas de linfócitos B, linfomas de células B e em alguns mielomas. Músculos lisos podem expressar anti-CD79a (RAMOS-VARA, 2012).

2.11.3 Anticorpo anti-CD45 (CD45)

O CD45, antígeno leucocitário comum, é uma glicoproteína de superfície celular com um domínio citoplasmático tirosina-fosfatase cujo papel é favorecer a ativação das células T. Esta glicoproteína está presente na superfície de todos os leucócitos (SODRÉ, 2009) e é restrita às células hematopoéticas (AMROLIA et al., 2003). Diversas funções imunológicas tais como a indução da atividade supressora, citotóxica e a indução da expressão de interleucinas têm sido relacionadas ao CD45 (SODRÉ, 2009).

Este marcador é amplamente utilizado em imuno-histoquímica em humanos, uma vez que auxilia na subtipagem de neoplasias, principalmente linfomas (Hodgkin, não Hodgkin e outras categorias) e leucemias B e T (SODRÉ, 2009).

O CD45 possui pelo menos três isoformas (A, B, C) reconhecidas como CD45RA, CD45RB e CD45RC. A isoforma CD45RA é expressa em todos os linfócitos B e em linfomas tipo B. Na pele verifica-se imuno-reatividade para mastocitomas, plasmocitomas e alguns linfomas de células T (RAMOS-VARA, 2012). Esta isoforma é a maior entre todas (COBBOLD; METCALF, 1994).

Os principais marcadores das desordens de origem linfocítica, as respectivas células que apresentam imuno-reatividade para estes marcadores, a estrutura que corresponde estes marcadores e suas funções estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Principais marcadores das desordens de origem linfocítica, as respectivas células que apresentam imuno-reatividade para estes marcadores, estrutura e função destes marcadores

Anticorpo	Célula	Estrutura	Função
CD3	linfócitos T, células de Purkinje (FERRER et al., 1993)	antígeno intracitoplasmático CD3 - linfócitos T antígeno presente na superfície (RAMOS-VARA, 2012). Marcação de membrana ou citoplasmática (FERNANDEZ et al., 2005)	responsável pela sinalização celular de antígenos apresentados por moléculas de MHC (JÚNIOR, 2010)
CD 79a	linfócitos B - plasmócitos e músculos lisos podem expressar (RAMOS-VARA, 2012).	polipeptídeo mb-1 (CD79a) - componente intracelular (MASON et al., 1995).	responsável pela sinalização celular de antígenos (MASON, et al., 1995).
CD 45RA	Células B e Células T naive (FULMER; MAULDIN, 2007)	glicoproteína de superfície celular com um domínio citoplasmático tirosina-fosfatase (SODRÉ, 2009)	favorecer a ativação das células T e B; possui também funções imunológicas tais como a indução da atividade supressora, citotóxica e a indução da expressão de interleucinas (SODRÉ, 2009).

Com base em algumas semelhanças histológicas entre o TVTC e determinadas neoplasias germinativas, como o germinoma intra-craniano dos cães, deliberou-se investigar a possibilidade do TVTC ter uma possível origem germinativa, através de estudos imuno-histoquímicos. A seguir, há uma breve revisão sobre os tumores germinativos e seus principais marcadores imuno-histoquímicos.

2.12 Principais Tumores de Origem Germinativa

Tumores testiculares originam-se de células germinativas e dos elementos estromais do cordão sexual. Estão divididos em quatro categorias: os tumores de células germinativas (seminoma, teratoma, carcinoma embrionário e os carcinomas do saco vitelino que crescem do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos), os tumores do estroma do cordão sexual (sertolioma e tumor de células de Leydig), os tumores mistos de células germinativas e

células do estroma do cordão sexual, os tumores primários não específicos do testículo e os germinomas intracranianos (CHI-HO YU et al., 2009).

As neoplasias testiculares em cães adultos e idosos são comuns. O seminoma, o sertolioma e os tumores de células de Leydig são os mais frequentes (PATNAIK; MOSTOFI, 1993).

2.12.1 Anticorpo anti-CD117 (CD117)

O CD117 (KIT) é um receptor tirosina-quinase tipo 3 responsável pela transdução celular em diferentes tipos de células. O KIT é ativado ao se ligar aos fatores de crescimento que iniciam uma cascata de fosforilações que darão origem à regulação de apoptoses, diferenciação celular, proliferação, quimiotaxia e adesão celular dependendo do tipo celular. Os mastócitos, as células hematopoéticas, as células germinativas, os melanócitos, as células Cajal do trato gastrointestinal são KIT dependentes. Outras células KIT-positivas incluem as células epiteliais dos anexos da pele, mama e neurônios cerebelares (MIETTINEN; LASOTA, 2005).

Recentemente, tem-se relacionado o KIT na patogênese de múltiplas doenças neoplásicas em humanos (WEBSTER ET al., 2006). A positividade para KIT tem sido variada em sarcomas como nos angiossarcomas, nos sarcoma Ewing, nos sarcomas sinoviais e nos leiomiossarcomas. Além desses tumores, o KIT também é expresso nos carcinomas de células pequenas, carcinomas renais, tímico, alguns carcinomas ovarianos, mamários (MIETTINEN; LASOTA, 2005) e de próstata (WEBSTER et al., 2006).

Uma deficiência neste receptor, devido a mutações hereditárias, pode levar a alterações das funções KIT- dependentes, como a eritropoiese, pigmentação da pele, fertilidade e motilidade gastrointestinal. Por outro lado, uma ativação patológica do KIT, leva ao desenvolvimento de neoplasias KIT-dependentes e KIT-positivas como os mastocitomas, as leucemias mieloide aguda, os seminomas, os tumores do estroma gastrointestinal (GISTs) (MIETTINEN; LASOTA, 2005), os melanomas malignos e os carcinomas de pulmão (MORINI et al., 2004).

Nas neoplasias testiculares, os tumores de células germinativas intratubulares e os seminomas expressam o KIT. Mais de 90% dos seminomas são KIT- positivos. Expressão similar é verificada em neoplasias de ovário (disgerminomas) e da região pineal (germinoma/ pinealoma). Os seminomas atípicos parecem expressar menos a proteína KIT, assim como os seminomas espermatocíticos (MIETTINEN; LASOTA, 2005).

Em tecidos de animais, a expressão do CD117 tem sido verificada em mastócitos, células de Purkinje do cerebelo, no trato gastrointestinal, nas células acinares e ductais das glândulas mamárias, em oocistos (felinos) e no endométrio. Entre as neoplasias o c-KIT é positivo nos mastocitomas, nos tumores mesenquimais gastrointestinais e no carcinoma ovariano canino. O padrão de coloração é fraco e inconstante nos tumores de mama benignos e malignos, nos melanomas, seminomas, nos tumores de células intersticiais e nos tumores de células da granulosa (MORINI et al., 2004). Chi-Ho-Yu et al. (2009), entretanto, verificaram intensa marcação em todos os seminomas caninos testados (20 tumores) com o c-KIT e acreditam que este anticorpo é um marcador sensível para esta neoplasia.

Nos mastocitomas caninos, a ocorrência de mutação da proteína KIT está significativamente associada ao aumento da recorrência do tumor e ao agravamento do quadro. Além disto, a mutação de c-Kit está relacionada à localização desta proteína na célula. Quanto mais difusa e citoplasmática for o padrão de coloração desta proteína na imuno-histoquímica, maior a probabilidade de mutação em c-KIT e assim pior o prognóstico (KIUPEL et al., 2004; WEBSTER et al., 2006; WEBSTER et al., 2007).

2.12.2 Anticorpo anti-fosfatase alcalina placentária (PLAP)

As fosfatases alcalinas são um grupo heterogêneo de glicoproteínas, geralmente confinadas à superfície celular e normalmente sintetizadas pelo sinciciotrofoblasto fetal (CHI-HO-YU et al., 2009). Provavelmente têm papel em transporte celular, regulação do metabolismo, transcrição de genes e diferenciação celular. Historicamente, PLAP tem sido considerado o marcador de escolha para tumores de células germinativas, particularmente germinomas e seminomas em humanos (NEUPATIMAGEM UNICAMP, 2011).

Em cães, os seminomas são PLAP positivos, entretanto, os seminomas espermatocíticos, originados de espermatozoides maduros, raramente expressam este marcador (GRIECO et al., 2007; KIM et al., 2010). Chi-Ho-Yu et al. (2009) também verificaram fraca e heterogênea reatividade dos seminomas de cães para PLAP e por isso não consideram este anticorpo um bom marcador para seminoma.

O PLAP apresenta vários problemas técnicos, incluindo baixa especificidade, baixa sensibilidade, freqüente marcação inespecífica de fundo e pode levar a dificuldades de interpretação, especialmente em espécimes pequenos ou previamente congelados. Por isso, em humanos, novos marcadores como c-Kit e OCT 4 têm sido preferidos (NEUPATIMAGEM UNICAMP, 2011).

2.12.3 Anticorpo anti-alfa-fetoproteína (AFP)

A alfa-fetoproteína é um antígeno oncofetal, normalmente produzido no fígado e no saco vitelino (TASHBAEVA et al., 2007), com funções de transporte plasmático e de manutenção da pressão oncótica (ALMEIDA et al., 2007). Normalmente, esta proteína desaparece do plasma no primeiro ano de vida (ALMEIDA et al., 2007), entretanto, níveis elevados da mesma podem indicar doença hepática ou câncer em adultos (TASHBAEVA et al., 2007). Setenta por cento dos tumores testiculares não seminomatosos produzem AFP. O carcinoma embrionário, teratocarcinoma, tumor de saco vitelino e tumores mistos sintetizam AFP, enquanto que o coriocarcinoma e o seminoma puro não a produzem (ALMEIDA et al., 2007).

2.12.4 Anticorpo anti-CD30 (CD30)

O CD30 é uma glicoproteína de membrana da superfamília do fator de necrose tumoral que no humano é utilizado como marcador de carcinoma embrionário (CHI-HO-YU et al., 2009). Este anticorpo também é importante porque diferencia o carcinoma embrionário do seminoma (LEROY et al., 2002). A distinção entre estes dois tipos de tumores é muito importante por apresentarem diferentes métodos de tratamentos (CHI-HO-YU et al., 2009).

2.12.5 Anticorpo anti-OCT3/4 (OCT3/4)

O OCT3/4 é um membro da família de fatores de transcrição expresso em células tronco embrionárias e germinativas pluripotentes de humano e camundongos. Em humanos é considerado um bom marcador para seminomas e carcinomas embrionários, entretanto em cães, este anticorpo tem falhado em expressar imuno-reatividade em seminomas (CHI-HO-YU et al., 2009). Esta falha na expressão pode ser justificada pelas características histológicas

deste tumor que são similares às do seminoma espermatocítico humano que por sua vez, também não expressa este anticorpo (OWSTON; RAMOS-VARA, 2007, KIM et al., 2010).

Os principais marcadores das desordens de origem germinativa, as respectivas células que apresentam imuno-reatividade para estes marcadores, a estrutura que corresponde estes marcadores e suas funções estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Principais marcadores das desordens de origem germinativa, as respectivas células que apresentam imuno-reatividade para estes marcadores, estrutura e função destes marcadores

Anticorpo	Expressão	Estrutura	Função
CD117	Os mastócitos, as células hematopoéticas, as células germinativas, os melanócitos, as células Cajal do trato gastrointestinal são CD117 (KIT) dependentes. Outras células KIT-positivas incluem as células epiteliais dos anexos da pele, mama e neurônios cerebelares (MIETTINEN; LASOTA, 2005). Entre as neoplasias o c-KIT é positivo nos mastocitomas, nos tumores mesenquimais gastrointestinais e no carcinoma ovariano canino. O padrão de coloração é fraco e inconstante nos tumores de mama benignos e malignos, nos melanomas, seminomas, nos tumores de células intesticiais e nos tumores de células da granulosa (MORINI et al., 2004). Chi-Ho-Yu et al. (2009), entretanto, verificaram intensa marcação em todos os seminomas caninos testados (20 tumores) com o c-KIT.	Proteína transmembrana (proteína kit) (MIETTINEN; LASOTA, 2005)	Proteína transmembrana que funciona como receptor e tem um componente intracitoplasmático com atividade tirosina quinase. Ativação permanente desta proteína (sem ligação com agonista) promove proliferação celular e inibe apoptose (Neupatimagem-UNICAMP, 2011).
Fosfatase Alcalina Placentária (PLAP)	Expressa em células germinativas primordiais e em sinciotrofoblasto. PLAP tem sido considerada o marcador de escolha para tumores de células germinativas, particularmente germinomas e seminomas. PLAP ligada a membranas tem sido documentada imunohistoquimicamente também em carcinoma embrionário, gonadoblastoma, tumor do seio endodérmico e coriocarcinoma, bem como em metástases de seminoma (Neupatimagem-UNICAMP, 2011).	Grupo heterogêneo de glicoproteínas, geralmente confinadas à superfície celular (Chi-Ho-Yu et al., 2009).	Transporte celular, regulação do metabolismo, transcrição de genes e diferenciação celular (Neupatimagem-UNICAMP, 2011).
Alfa-fetoproteína (AFP)	Doença hepática, carcinoma embrionário, teratocarcinoma, tumor de saco vitelino e tumores mistos (ALMEIDA et al., 2007).	Proteína produzida no fígado e no saco-vitelino (TASHBAEVA et al., 2007).	Funções de transporte plasmático e de manutenção da pressão oncótica (ALMEIDA et al., 2007)
CD 30	Carcinoma embrionário (LEROY et al., 2002)	Glicoproteína de membrana presente no fator de necrose tumoral (Chi-ho Yu et al., 2009).	Função primária ainda desconhecida mas sabe-se que o CD30 participa de várias vias importantes da regulação dos linfócitos T e NK (MUTA et al., 2000).
OCT 3/4	Bom marcador para seminomas e carcinomas embrionários em humanos. Em cães não parece ser um bom marcador para seminomas (Chi-ho Yu et al., 2009).	Fator de transcrição nuclear (Chi-ho Yu et al., 2009)	Necessário para manter a pluripotência das células tronco (Barros, 2008)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Este trabalho é um estudo complementar à dissertação de mestrado (MASCARENHAS, 2010), onde foi feita a avaliação imuno-histoquímica de 23 TVTCs, 10 genitais e 13 exclusivamente extragenitais.

Os principais dados dos cães, como sexo, idade, raça e localização do tumor, assim como os aspectos macroscópicos e clínicos foram obtidos junto ao setor de Dermatologia do Hospital Veterinário de Pequenos Animais (HVPA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Todos os cães foram submetidos ao exame clínico completo e ao exame citológico do tumor.

Para a avaliação dos aspectos microscópicos foram selecionados 10 casos de TVTC genital, e 6 casos de TVTC extragenital submetidos a biópsia (biópsia incisional) no HVPA e diagnosticados pela Área de Anatomia Patológica do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, UFRRJ. Dos 10 casos de TVTC genital, 5 foram fixados em formaldeído a 10% por 24 horas e os outros 5 em paraformaldeído 4% por 24 horas. Os seis TVTCs extragenitais foram fixados em formaldeído 10%, porém não se pode precisar o tempo de fixação; estes tumores foram os mesmos utilizados no estudo anterior realizado por Mascarenhas (2010). Os outros 17 tumores utilizados no trabalho de Mascarenhas (2010) não puderam ser avaliados novamente, devido ao término e desgaste do material emblocado. Os 16 animais selecionados obtiveram a cura clínica com o tratamento preconizado para este tumor, a quimioterapia com vincristina ou vinblastina.

3.2 Citologia

O material para a citopatologia foi obtido por meio de punção por agulha fina. As lâminas com as preparações citológicas foram então, coradas pelo método rápido Instant Prov e examinadas à microscopia óptica.

3.3 Histopatologia

Os fragmentos dos 16 TVTCs selecionados, previamente fixados e emblocados em parafina, foram processados rotineiramente para histologia, cortados a 5 micrômetros e as lâminas obtidas coradas pela Hematoxilina-Eosina (HE), foram examinadas em microscópio óptico.

3.4 Imuno-histoquímica

3.4.1 Anticorpos utilizados

O material selecionado e emblocado em parafina foi cortado a 5 micrômetros e testado para reagentes específicos de antígenos de membrana (anti-macrófago) e citoplasmáticos (anti-lisozima, anti-vimentina, anti-CD18, anti-CD3, anti-CD79a, anti-CD117) com utilização da técnica complexo avidina-biotina-peroxidase, preconizada por Mozos et al. (1996), Marchal et al. (1997) e Ramos-Vara (2010). Os exames imuno-histoquímicos dos 16 TVTCs selecionados foram realizados no Setor de Anatomia Patológica, do Projeto Sanidade Animal, Convênio UFRRJ/EMBRAPA. Todos os anticorpos utilizados, com seus respectivos clones e especificações, foram sintetizados na Tabela 4.

Tabela 4. O clone, o tipo e a marca dos anticorpos utilizados

Anticorpo	Clone	Tipo	Marca
Lisozima	18-0039*	policlonal	Zymed / Invitrogen
CD79a	HM57	monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
CD3	**	policlonal	Spring Bioscience
Anti-macrófago	LN-5	monoclonal	Zymed / Invitrogen
CD18	CA16 3C10	monoclonal	University of California
CD117	RP063-05*	policlonal	Diagnostic Biosystem
Vimentina	V9	monoclonal	Diagnostic Biosystem

*número do catálogo, ** não especificado

3.4.2 Controles-positivos

Cada anticorpo utilizado foi padronizado individualmente com tecidos sabidamente positivos para os mesmos. A perfeita padronização foi obtida quando se verificou forte padrão de coloração nas células. A Tabela 5 apresenta os anticorpos utilizados e os respectivos controles positivos.

Tabela 5. Anticorpos utilizados e os respectivos controles positivos

Anticorpo	Controle positivo	Espécie
Lisozima	inflamação granulomatosa	cão
CD79a	plasmocitoma	cão
CD3	linfonodo	cão
Anti-macrófago	inflamação granulomatosa	cão
CD18	inflamação granulomatosa	cão
CD117	mastocitoma	cão
Vimentina	melanoma amelanótico	cão

3.4.3 A técnica da imuno-histoquímica

Os cortes foram colocados em lâminas positivadas com solução silane 2% em acetona, secadas verticalmente em temperatura ambiente, antes de serem aquecidas em estufa a 60°C por 3-4 horas. Em seguida então, desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em água destilada por dois minutos. A recuperação antigênica utilizada para todos os anticorpos foi o tampão citrato com pH 6 em duas etapas de três minutos no forno de micro-ondas (700W). Logo após, as lâminas foram esfriadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Para a diminuição das ligações inespecíficas (“background”), os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico) 5% diluído em água destilada durante 30 minutos. Os cortes histológicos foram incubados com anticorpos primários (anti-macrófago, anti-proteína S-100, anti-lisozima, anti-CD18, anti-CD117, anti-CD79a, anti-CD3, anti-vimentina) na diluição especificada na tabela 5, em PBS, por 12 horas (*overnight*), a 4°C em câmara úmida. Posteriormente, foram lavados em água destilada e tratados com anticorpo secundário biotinalado (DAKO LSAB 2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA) por 20 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente. Logo após foram lavados em PBS e tratados com o conjugado estreptavidina-peroxidase (DAKO Corp., Carpinteria, CA) por mais 20 minutos cada em câmara úmida e temperatura ambiente, sendo lavados em água destilada e submetidos à revelação com substrato cromógeno (DAB líquido: 1 gota para cada 1ml de tampão substrato Dako – K3468) por 5 à 10 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e contracorados com hematoxilina de Harris por 30 segundos, posteriormente lavados em água corrente por 1-2 minutos, desidratados em graduações de álcool e clarificados em xilol. Em seguida, as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico.

A Tabela 6 apresenta as características dos anticorpos primários, suas respectivas diluições e o método de recuperação antigênica utilizado para cada um.

Tabela 6. Características dos anticorpos primários, diluições, tempo de incubação e recuperação antigênica utilizada

Anticorpo	Diluição	Tempo de incubação	Recuperação antigênica
Lisozima	1/100	<i>overnight</i>	micro.** 6 minutos + citrato
CD79a	1/20	<i>overnight</i>	micro. 6 minutos + citrato
CD3	1/100	<i>overnight</i>	micro. 6 minutos + citrato
Anti-macrófago	1/100	<i>overnight</i>	micro. 6 minutos + citrato
CD18	1/20	<i>overnight</i>	micro. 6 minutos + citrato
CD117	1/200	<i>overnight</i>	micro. 6 minutos + citrato
Vimentina	1/200	<i>overnight</i>	micro. 6 minutos + citrato

**micro-ondas

3.5 Lectino-histoquímica

Para a técnica de lectino-histoquímica foram selecionados quatro TVTCs genitais (1, 2, 2, 4) fixados em formalina a 10% por 24 horas. O material selecionado foi emblocado em parafina e as seguintes lectinas foram testadas: *Canavalia ensiformis* agglutinin (**Con A**; a-d-

Man; a-d-Glc-specific), *Dolichos biflorus* agglutinin (**DBA**; a-d-Gal-Nac-specific), *Glycine max* agglutinin (**SBA**; a-d-GalNac; b-Gal-specific), *Arachis hypogaea* agglutinin (**PNA**; b-d-Gal/(1-3)GalNac-specific), *Ricinus communis* agglutinin-I (**RCA – I**; b-d-Gal-specific), *Ulex europaeus* agglutinin-I (**UEA-1**; a-L-Fuc-specific), *Triticum vulgare* agglutinin (**WGA**; a-d-GlcNac/NeuNac-specific, Succinyl-WGA (**sWGA**), *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* (**GSL**), *Sophora japonica* (**SJA**), *Pisum sativum* (**PSA**), *Phaseolus vulgaris* (**PHA-L e PHA-E**), *Lens culinaris* ou *L. esculenta* (**LCA**) (Lectin Kit Biotinylated BK 1000 e 2000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Como controle negativo de marcação as lectinas foram substituídas por PBS. A técnica da lectino-histoquímica foi realizada no Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.5.1 A técnica da lectino-histoquímica

Os cortes foram colocados em lâminas positivadas com solução silane 2% em acetona, secadas verticalmente em temperatura ambiente, antes de serem aquecidas em estufa a 60⁰C por 3-4 horas. Em seguida foram então, desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em água destilada por dois minutos. A recuperação dos glicoconjugados utilizada foi o tampão citrato com pH 6 em banho-maria por 1 hora. Logo após as lâminas foram esfriadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Para a diminuição das ligações inespecíficas (“background”), os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico) 5% diluído em água destilada durante 30 minutos. Os cortes foram incubados “overnight” com lectinas (Vector Laboratories, Burlingame, Califórnia, 94010, USA) na diluição de 5µg/mL em PBS, com excessão das lectinas Con A que foi diluída na proporção de 0,5µg/ml e da lectina RCA que foi diluída na proporção de 1µg/ml. Utilizamos as lectinas **Con A, DBA, SBA, PNA, UEA-1, WGA, sWGA, GSL, SJA, PSA, PHA-L, PHA-E, LCA e RCA**. Logo após foram lavados em PBS e tratados com o complexo estreptavidina-peroxidase (Vector Laboratories Inc.) por mais 20 minutos cada em câmara úmida e temperatura ambiente, sendo lavados em água destilada e submetidos à revelação com substrato cromógeno (DAB líquido: 1 gota para cada 1ml de tampão substrato Dako – K3468) por 5 à 10 minutos.

Os cortes foram lavados em água destilada e contracolorados com hematoxilina de Harris por 30 segundos, posteriormente lavados em água corrente por 1-2 minutos, desidratados em graduações de álcool e clarificados em xilol.

3.6 Interpretação dos resultados da imuno-histoquímica e lectino-histoquímica

A intensidade da coloração foi graduada em fraca (+), moderada (++) e forte (+++).

4 RESULTADOS

4.1 Dados dos Animais

Os principais dados dos cães com TVTC foram coletados e sintetizados nas Tabelas 7 e 8. Todos os cães utilizados neste estudo foram curados através do tratamento com vincristina ou vinblastina.

Tabela 7. Dados dos cães com TVTC genital

TVTCs genitais	SEXO	IDADE	RAÇA	LOCALIZAÇÃO	ASPECTO CLÍNICO	FIXAÇÃO / TEMPO
1	M	2 anos	SRD	Bulbo do pênis	Massa friável, multilobulada e hemorrágica	Formaldeído / 24 horas
2	F	3 anos	SRD	vagina	Nódulo eritematoso, ulcerado e hemorrágico	Formaldeído / 24 horas
3	F	11 anos	Cocker Spaniel	vagina	Nódulo hiperêmico e hemorrágico	Formaldeído / 24 horas
4	F	10 anos	SRD	vulva	Massa multilobulada, ulcerada e hemorrágica	Formaldeído / 24 horas
5	F	5 anos	SRD	vagina	Massa ulcerada e hemorrágica	Formaldeído / 24 horas
6	F	6 anos	SRD	vagina	Nódulo hemorrágico	Paraformaldeído / 24 horas
7	M	3 anos	SRD	Tumor no bulbo do pênis	Massa tumoral hemorrágica e friável	Paraformaldeído / 24 horas
8	F	6 anos	SRD	vagina	Nódulo multilobulado, hemorrágico e ulcerado	Paraformaldeído / 24 horas
9	F	2 anos	SRD	vagina	Nódulos firmes	Paraformaldeído / 24 horas
10	F	7 anos	Pitbull	vagina	Nódulo hemorrágico e friável	Paraformaldeído / 24 horas

SRD = sem raça definida; F = fêmea; M = macho

Tabela 8. Dados dos cães com TVTC extragenital

TVTCs Extragenitais	SEXO	IDADE	RAÇA	LOCALIZAÇÃO	ASPECTO CLÍNICO	FIXAÇÃO
11	M	4 anos	SRD	focinho e palato	Massa friável, multilobulada	Formaldeído
12	M	2 anos	SRD	cutâneo	Nódulo eritematoso, hemorrágico	Formaldeído
13	F	4 anos	SRD	M.A.D.	Nódulo hemorrágico	Formaldeído
14	M	10 anos	Pastor Alemão	cav. oral	Massa multilobulada, ulcerada e hemorrágica.	Formaldeído
15	F	6 anos	SRD	M.P.D. e M.P.E	Massa friável	Formaldeído
16	M	6 anos	pinscher	gengiva e palato	Nódulo hemorrágico	Formaldeído

M.A.D – membro anterior direito; M.P.D.- membro posterior direito; Cav. – cavidade

4.2 Aspectos Macroscópicos e Clínicos

As tumorações apresentavam-se como lesões únicas ou múltiplas, por vezes multilobuladas, com aspecto de couve-flor, infiltrativas ou pendunculadas, com ou sem superfície ulcerada ou com cavitações. Os tumores eram de tamanhos variados e consistência ora relativamente firme, ora friável, geralmente com intensa hemorragia.

4.3 Citologia

Os esfregaços caracterizavam-se por alta celularidade, com predomínio de células arredondadas e volumosas, com núcleos redondos a ovalados e nucléolos centrais únicos e grandes. O citoplasma era levemente azulado com vacúolos claros e bem definidos. Figuras de mitose eram frequentes.

4.4 Histopatologia

A avaliação histopatológica, em lâminas coradas pela Hematoxilina-Eosina, dos 16 TVTCs estudados, revelou que as neoplasias eram constituídas por células grandes, arredondadas e uniformes, entremeadas por escasso tecido conjuntivo, com núcleos grandes, esféricos que tinham, na maioria das vezes, apenas um nucléolo central e proeminente. O citoplasma geralmente era pálido a levemente anfófilico com limites precisos. Havia, em alguns tumores, fina granulação e vacuolização citoplasmáticas. Figuras de mitose eram frequentes (Figuras 1 e 2). A quantidade de infiltração perivascular intratumoral por macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos foi bem variada.

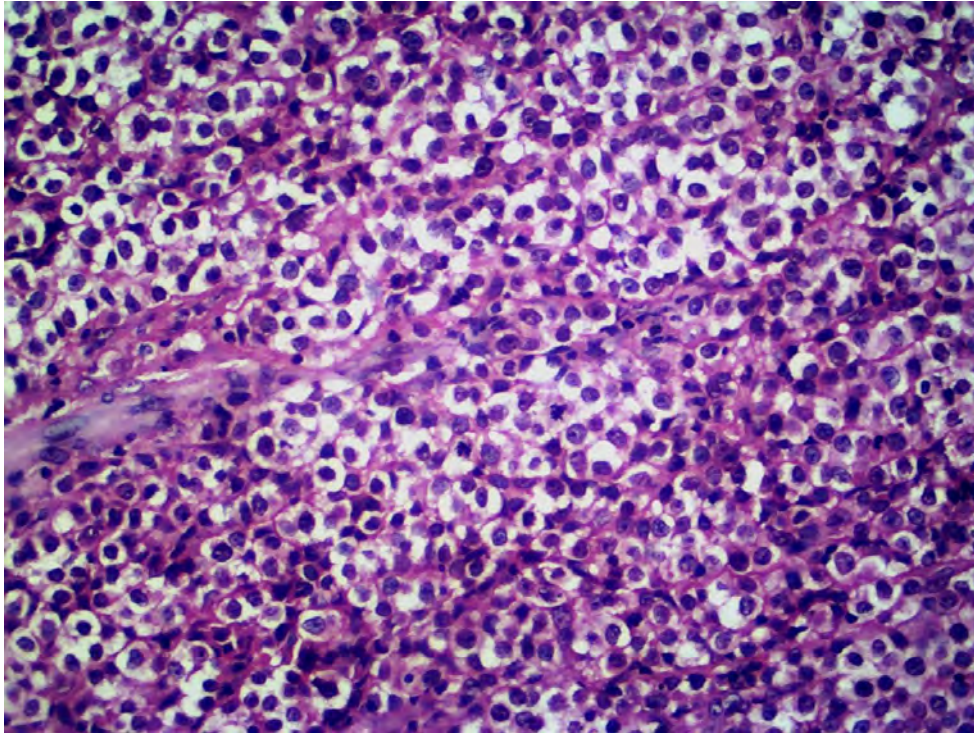


Figura 1. TVTC genital (2). Células arredondadas com núcleos grandes e esféricos, citoplasma pálido e vacuolizado em parte das células. HE. Obj. 20.

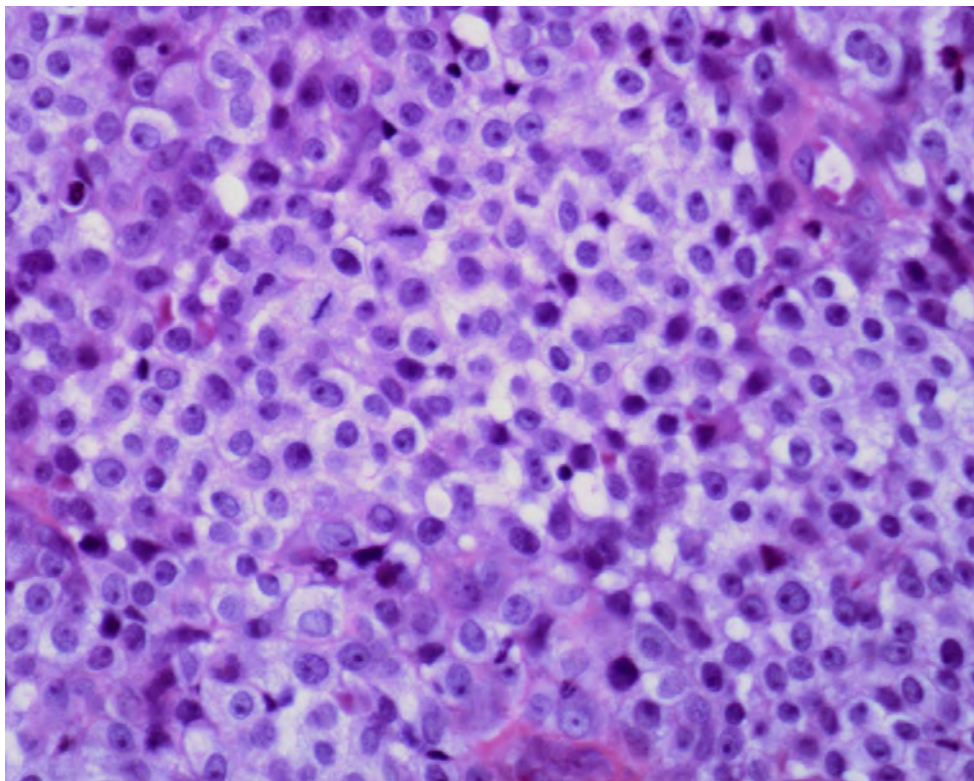


Figura 2. TVTC genital (5). Células arredondadas com núcleos grandes, esféricos, nucléolos únicos e evidentes; citoplasma pálido a anfófilico com limites precisos. Figuras de mitose frequentes. HE. Obj. 40.

4.5 Imuno-histoquímica

4.5.1 Anticorpo policlonal anti-lisozima (lisozima)

Nas células tumorais de todos os TVTCs estudados não houve imuno-reatividade para este anticorpo. Não houve diferença na expressão da lisozima entre os TVTCs genitais fixados em formaldeído e entre os fixados em paraformaldeído, bem como entre os TVTCs genitais e extragenitais. Macrófagos e neutrófilos infiltrados na massa tumoral apresentaram intensa imuno-reatividade e serviram como controle positivo (Figuras 4 a 6). Os macrófagos e neutrófilos presentes na inflamação granulomatosa de cão utilizada como controle positivo também apresentaram intensa imuno-reatividade (Figura 3). A Tabela 9 sintetiza os resultados obtidos na avaliação imuno-histoquímica dos TVTCs genitais e extragenitais.

Tabela 9. Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para a lisozima e a quantidade de TVTCs que apresentaram macrófagos e neutrófilos infiltrados positivos

LISOZIMA	TVTCs		TOTAL
	TVTCs GENITAIS	EXTRAGENITAIS	
Testados	10	6	16
Positivos	0	0	0
Macrófagos/neutrófilos	10	6	16

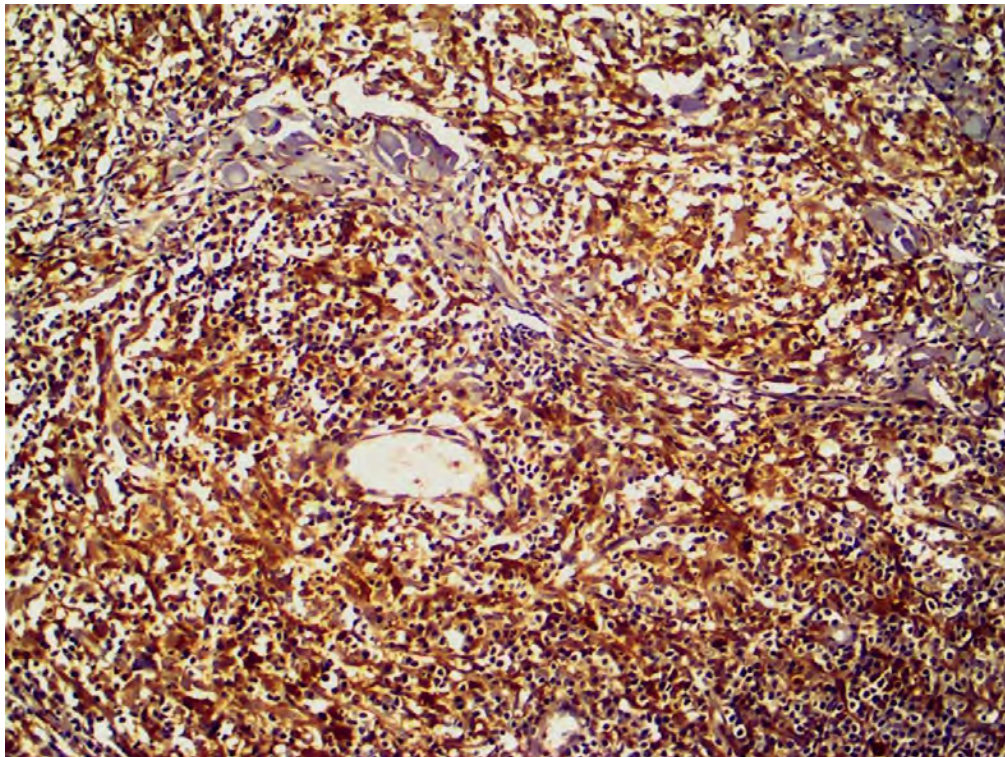


Figura 3. Controle-positivo (inflamação granulomatosa). Intensa imuno-reatividade de macrófagos e neutrófilos para o anticorpo anti-lisozima. Obj. 10.

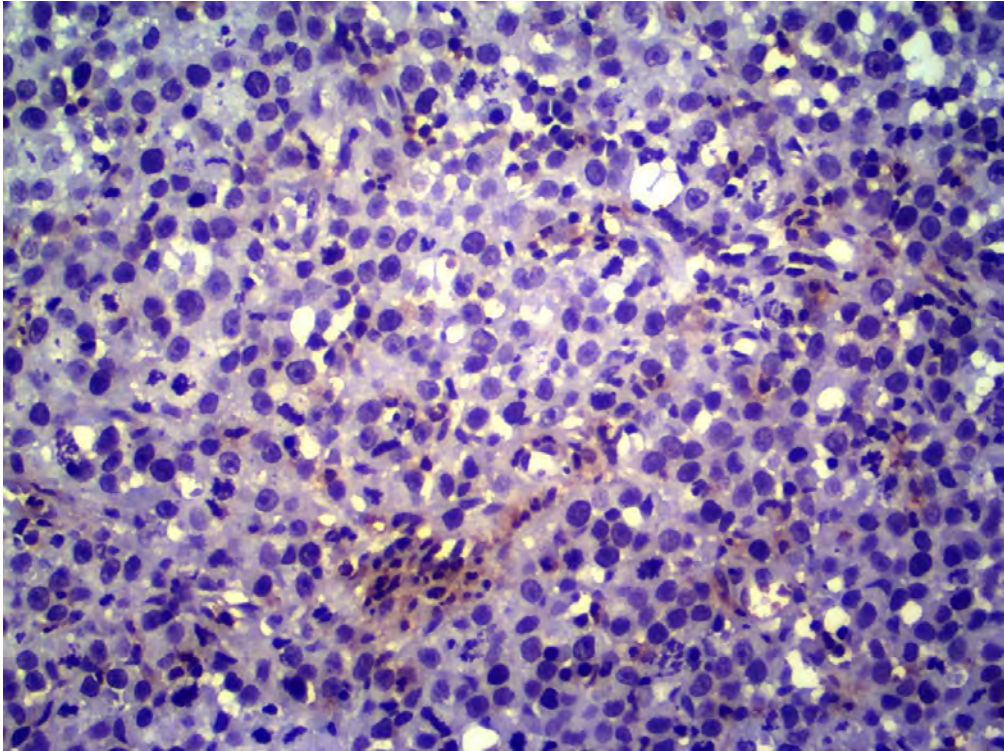


Figura 4. TVTC genital (2). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada imuno-reatividade de macrófagos e neutrófilos para a lisozima. Obj. 20.

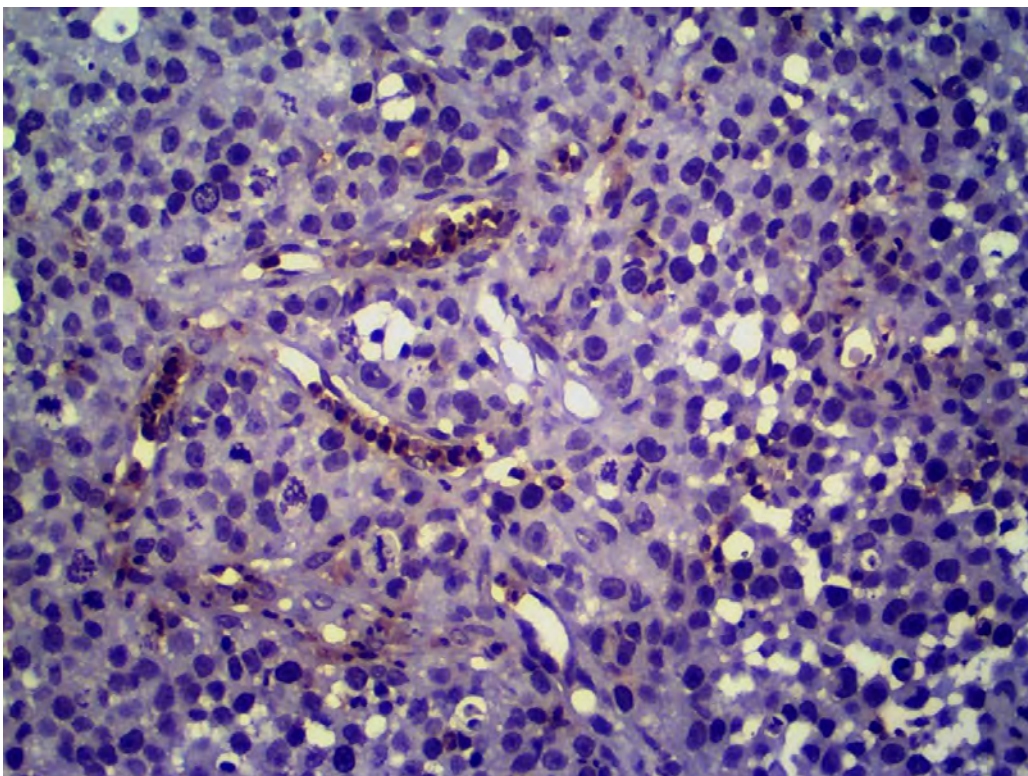


Figura 5. TVTC genital (6). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada imuno-reatividade de macrófagos e neutrófilos para a lisozima. Obj. 20.

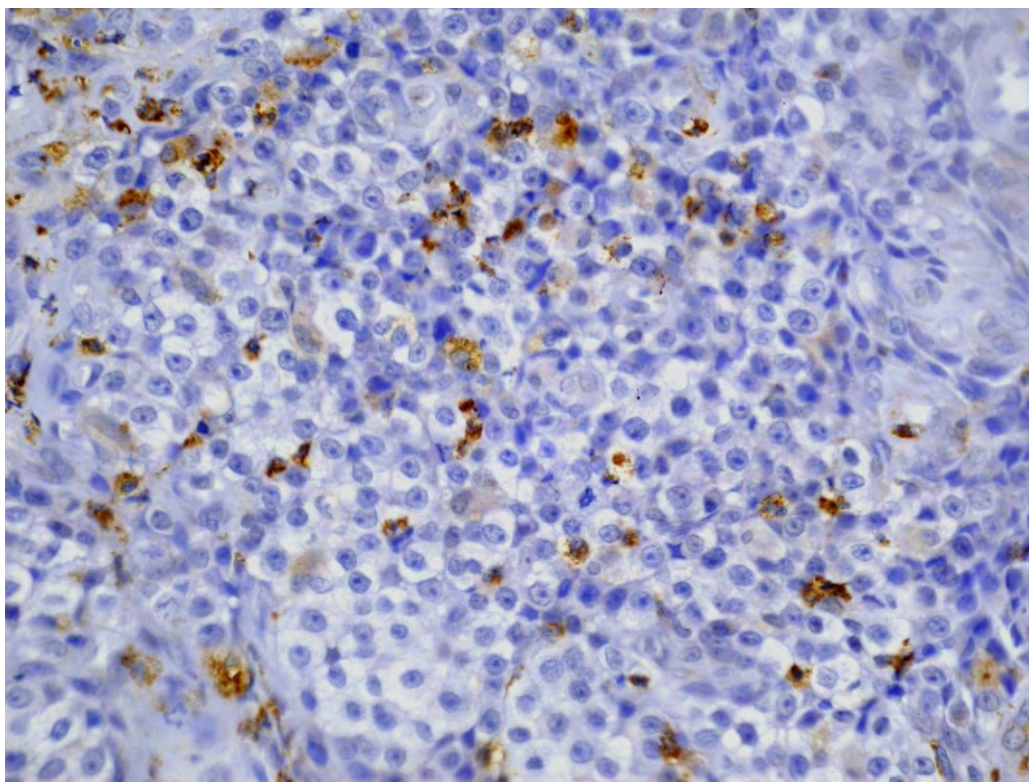


Figura 6. TVTC extragenital (16). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada imuno-reatividade de macrófagos e neutrófilos para a lisozima. Obj. 20.

4.5.2 Anticorpo monoclonal anti-vimentina (vimentina)

A imuno-reatividade para a vimentina foi intensa (+++) no citoplasma de mais de 90% das células tumorais de todos os TVTCs analisados (Figuras 8 e 9). Não houve diferença entre os TVTCs genitais fixados em formaldeído e entre os fixados em paraformaldeído. Também não houve diferença entre os TVTCs genitais e extragenitais na expressão desta proteína. Macrófagos e neutrófilos infiltrados na massa tumoral apresentaram imuno-reatividade. As células tumorais do melanoma amelanótico canino utilizado como controle positivo também apresentaram intensa imuno-reatividade (Figura 7). A Tabela 10 sintetiza os resultados obtidos na avaliação imuno-histoquímica dos TVTCs genitais e extragenitais.

Tabela 10. Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para a vimentina

VIMENTINA	TVTCs GENITAIS	TVTCs EXTRAGENITAIS	TOTAL
Testados	10	6	16
Positivos	10	6	16
Macrófagos/neutrófilos*	10	6	16

*Macrófagos e neutrófilos infiltrados no tumor

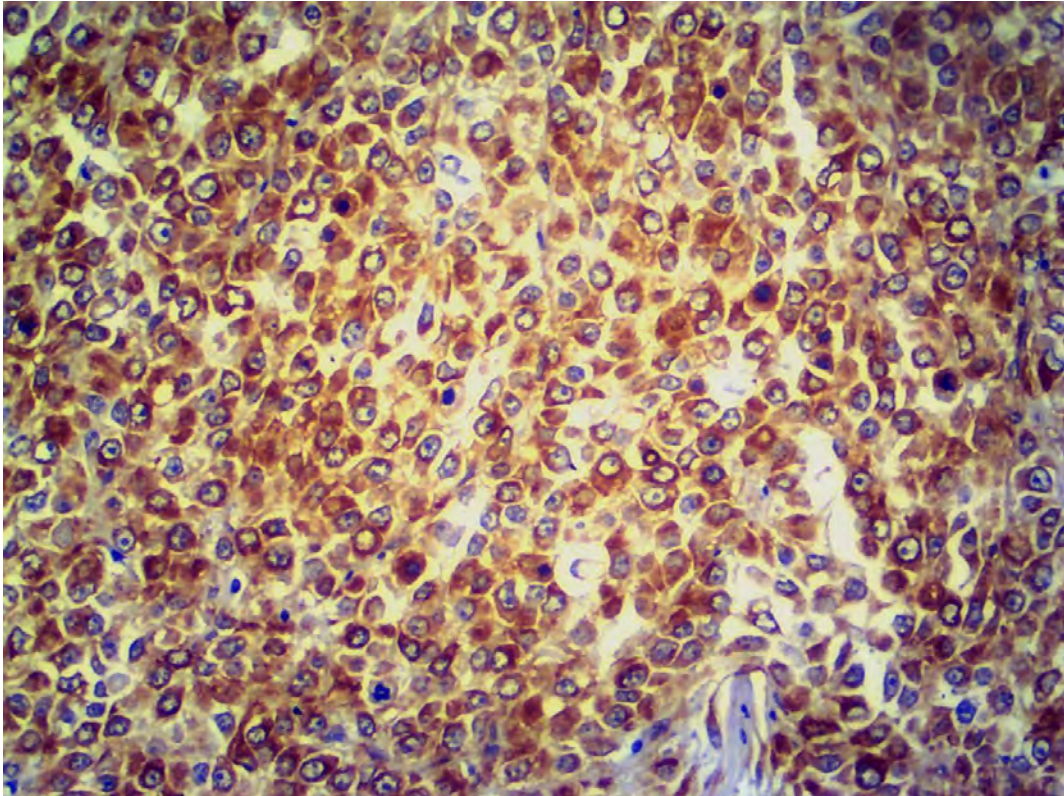


Figura 7. Controle-positivo (melanoma amelanótico). Intensa imuno-reatividade nas células neoplásicas para o anticorpo anti-vimentina. Obj. 20

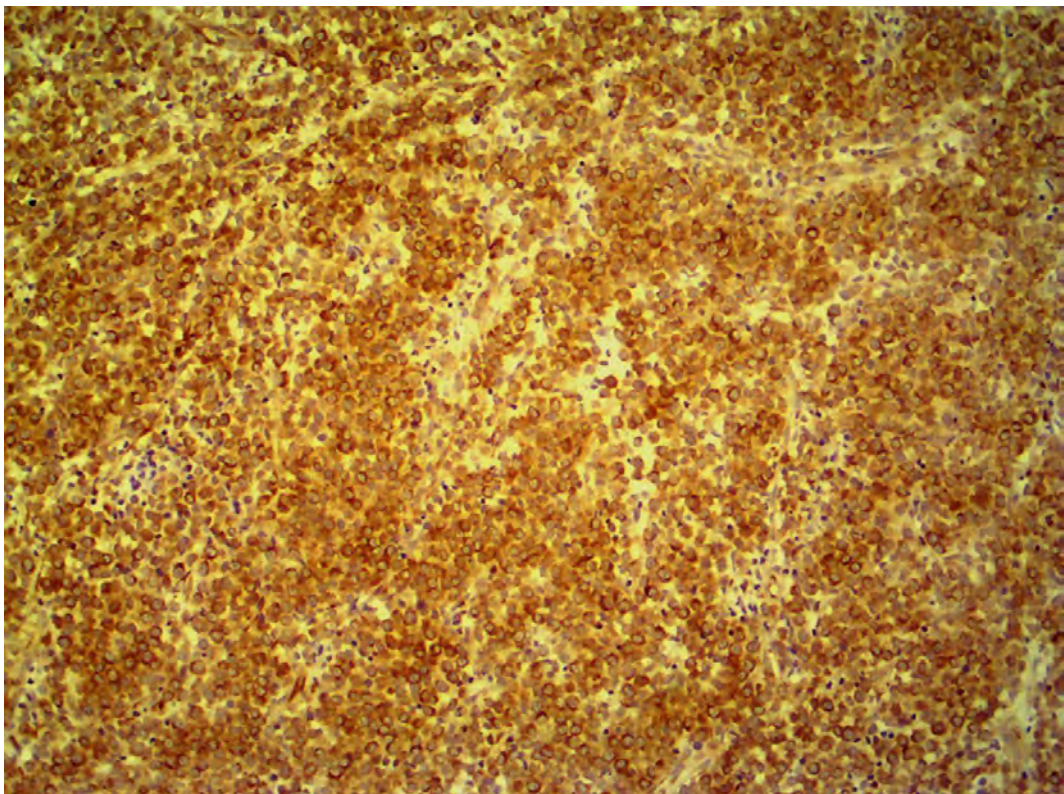


Figura 8. TVTC genital (4). Intensa imuno-reatividade para a vimentina, com mais de 90% das células tumorais positivas. Obj. 10.

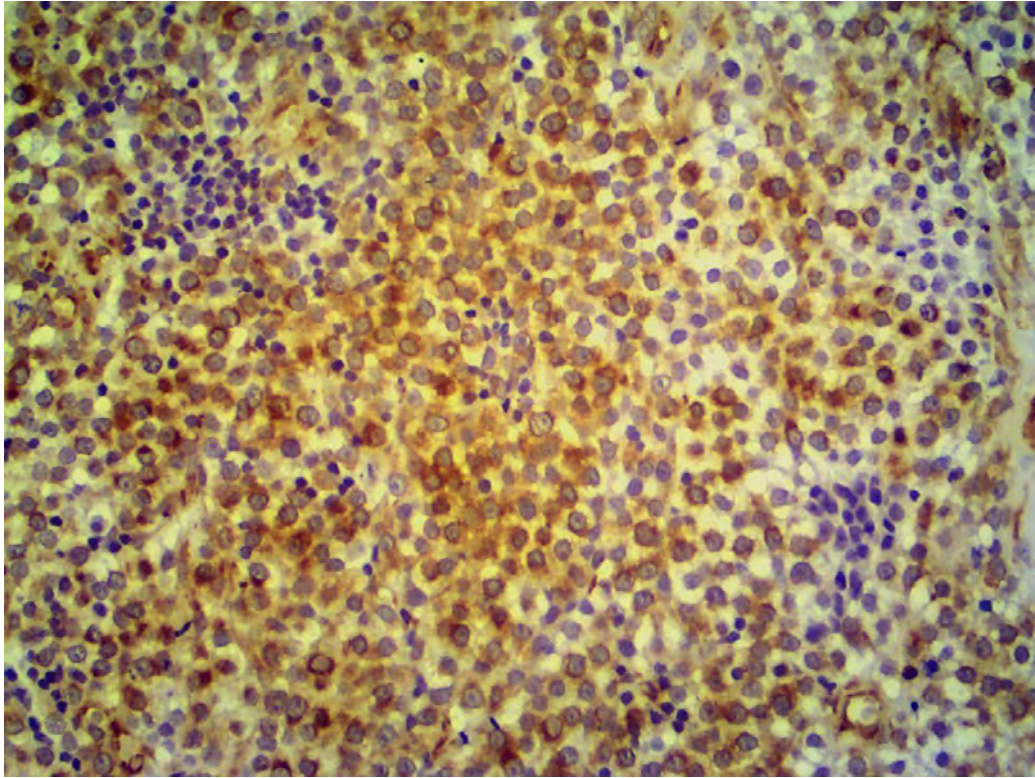


Figura 9. TVTC genital (1). Intensa imuno-reatividade para a vimentina, com mais de 90% das células tumorais positivas. Obj. 20.

4.5.3 Anticorpo monoclonal anti-macrófago (anti-macrófago)

O anticorpo monoclonal anti-macrófago não apresentou imuno-reatividade em nenhum dos TVTCs testados. Não houve diferença entre os TVTCs genitais fixados em formaldeído e entre os fixados em paraformaldeído. Também não houve diferença entre os TVTCs genitais e extragenitais na expressão deste anticorpo. Macrófagos presentes na inflamação granulomatosa de cão utilizada como controle positivo também apresentaram intensa imuno-reatividade (Figura 10). Os macrófagos infiltrados na massa tumoral apresentaram intensa imuno-reatividade, e serviram como controle positivo (Figuras 11 e 12). A Tabela 11 sintetiza os resultados obtidos na avaliação imuno-histoquímica dos TVTCs genitais e extragenitais.

Tabela 11. Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para anti-macrófago e a quantidade de TVTCs que apresentaram macrófagos e neutrófilos infiltrados positivos

MACRÓFAGO	TVTCs GENITAL	TVTCs		TOTAL
		EXTRAGENITAL		
Testados	10	6	16	
Positivos	0	0	0	
Macrófagos/Neutrófilos*	10	6	16	

*Macrófagos e neutrófilos infiltrados no tumor

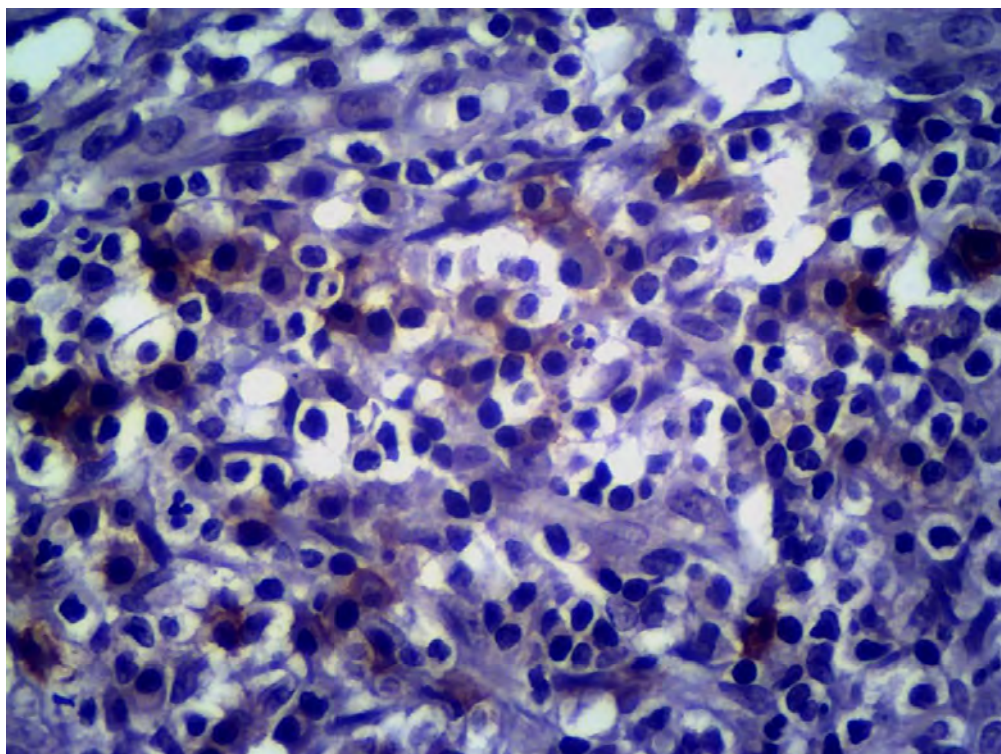


Figura 10. Controle-positivo (inflamação granulomatosa). Intensa imuno-reatividade em macrófagos para o anticorpo anti-macrófago. Obj. 40.

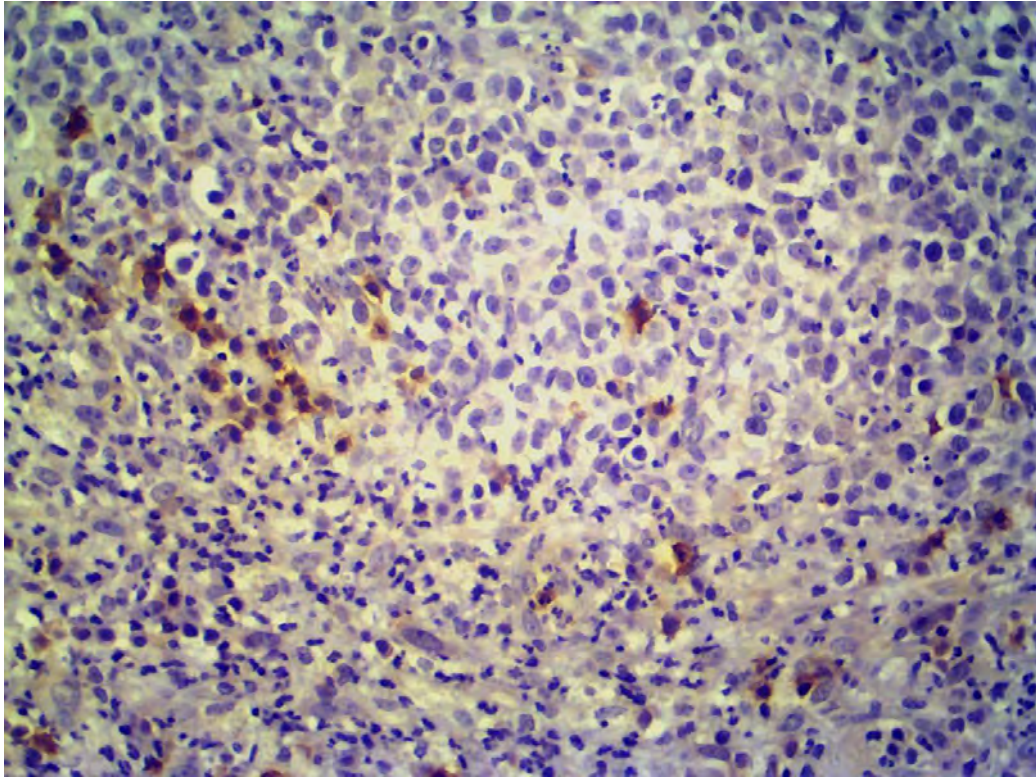


Figura 11. TVTC genital (2). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade dos macrófagos intersticiais para o anticorpo anti-macrófago. Obj. 20.

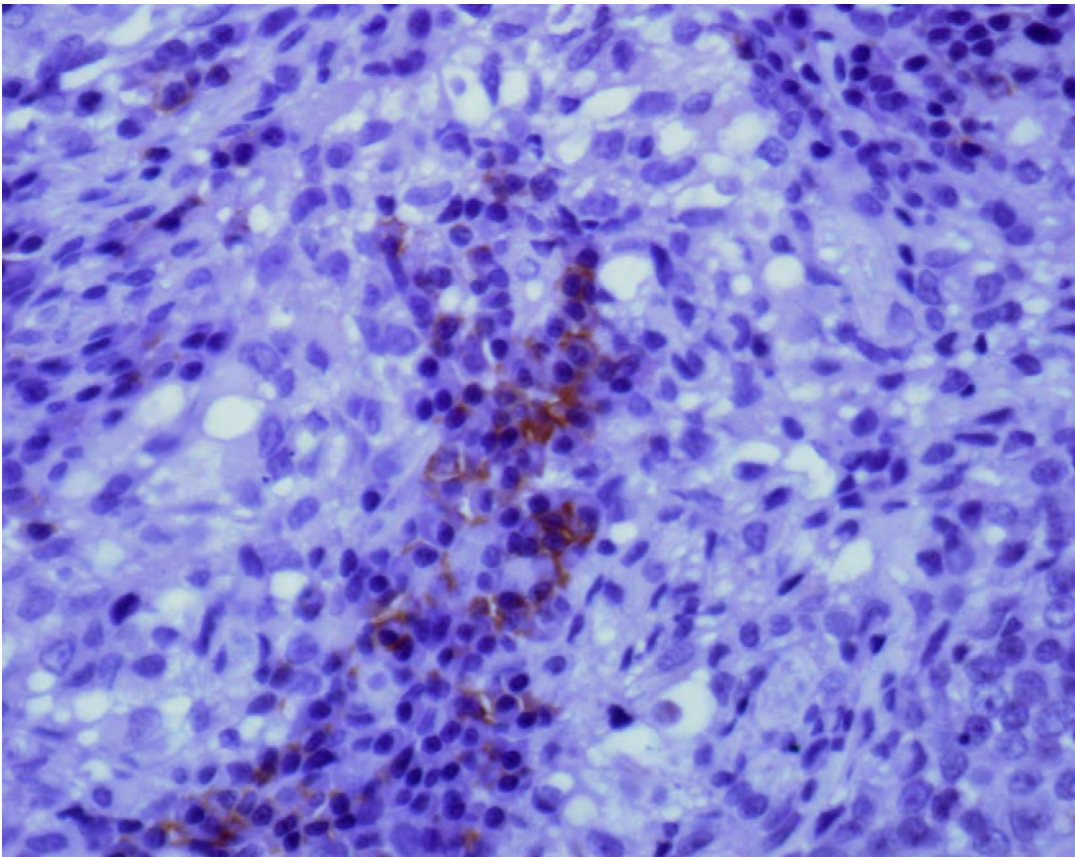


Figura 12 TVTC extragenital (11). Marcada imuno-reatividade de macrófagos intersticiais para o anticorpo anti-macrófago. Obj. 40.

4.5.4 Anticorpo monoclonal anti-CD 18 (CD 18)

Nenhuma das células tumorais dos TVTCs estudados apresentou imuno-reatividade para este anticorpo (Figuras 14 a 17). Não houve diferença entre os TVTCs genitais fixados em formaldeído e entre os fixados em paraformaldeído. Também não houve diferença entre os TVTCs genitais e extragenitais na expressão do CD18. Os macrófagos e neutrófilos presentes na inflamação de cão utilizada como controle positivo apresentaram intensa imuno-reatividade (Figura 13). Os macrófagos e neutrófilos infiltrados entre as células tumorais apresentaram intensa imuno-reatividade. A Tabela 12 sintetiza os resultados obtidos na avaliação imuno-histoquímica dos TVTCs genitais e extragenitais.

Tabela 12. Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para CD18 e a quantidade de TVTCs que apresentaram macrófagos e neutrófilos infiltrados positivos

CD 18	TVTC		TOTAL
	TVTC GENITAIS	EXTRAGENITAL	
Testados	10	6	16
Positivos	0	0	0
Macrófagos/Neutrófilos*	10	6	16

*Macrófagos e neutrófilos infiltrados no tumor

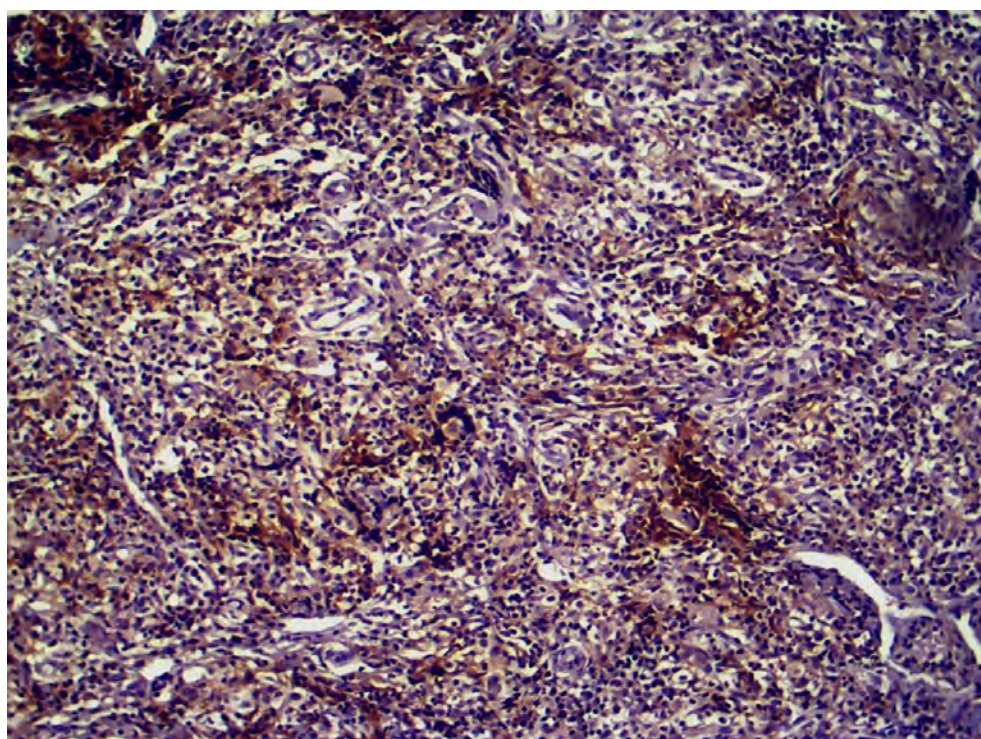


Figura 13. Controle-positivo (inflamação granulomatosa de cão). Intensa imuno-reatividade em macrófagos para o anticorpo anti-CD 18. Obj. 10.

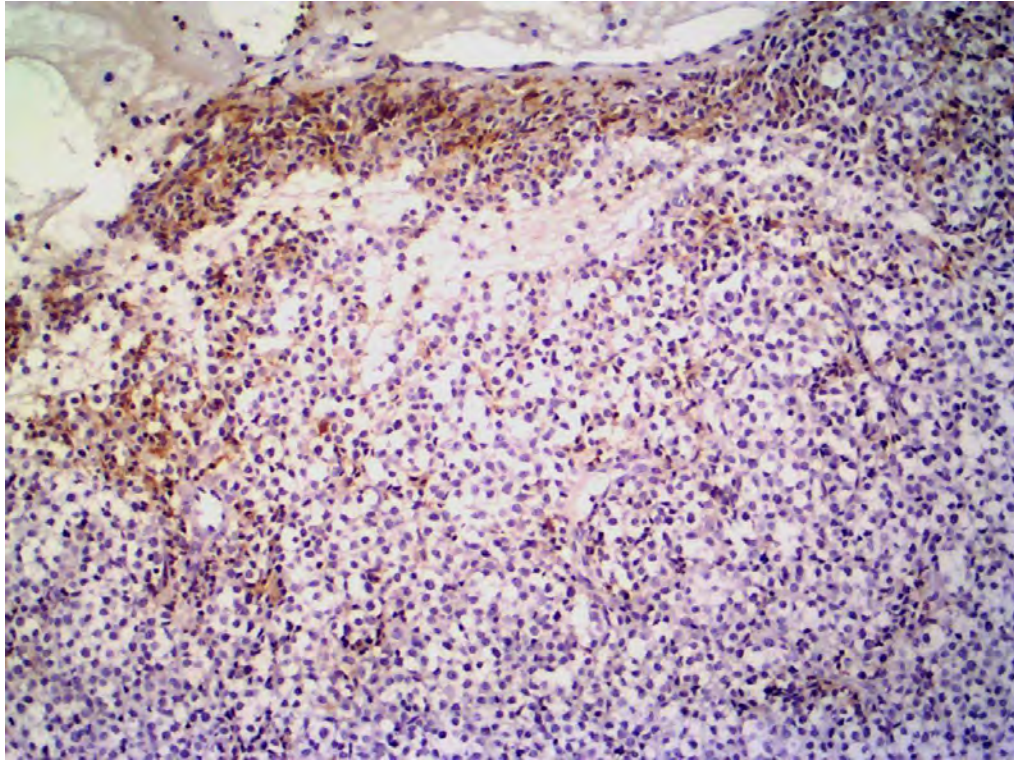


Figura 14. TVTC genital (2). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de macrófagos e neutrófilos intersticiais para o anticorpo anti-CD18. Obj. 10.

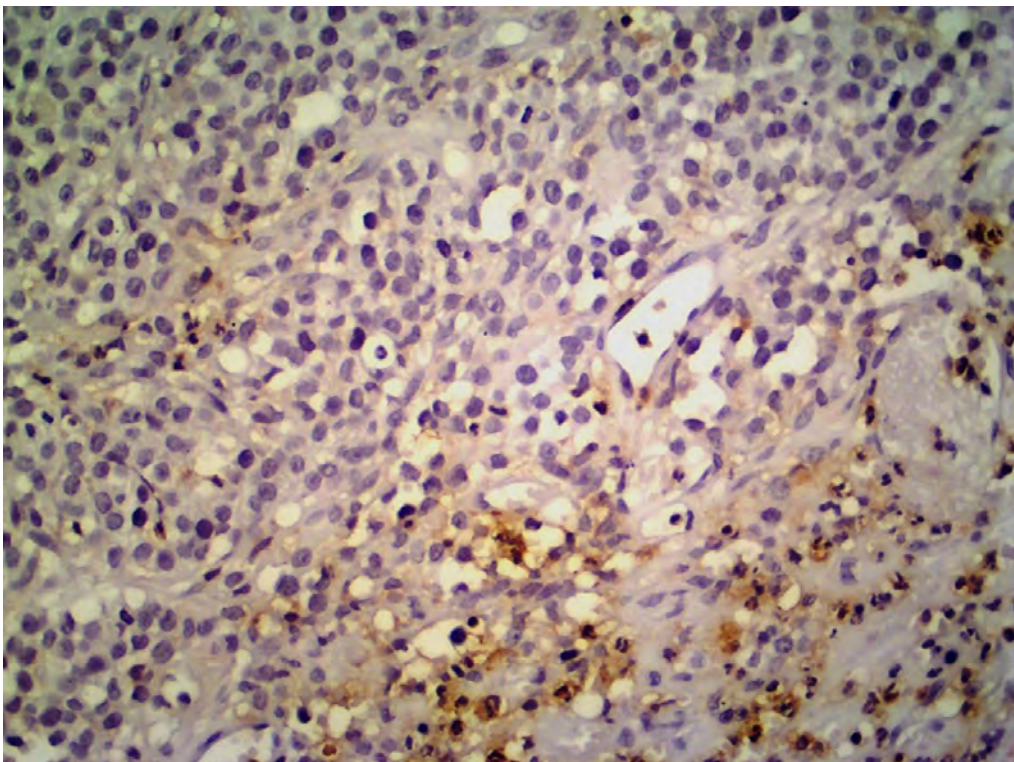


Figura 15. TVTC genital (4). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de macrófagos e neutrófilos intersticiais para o anticorpo anti-CD18. Obj. 20.

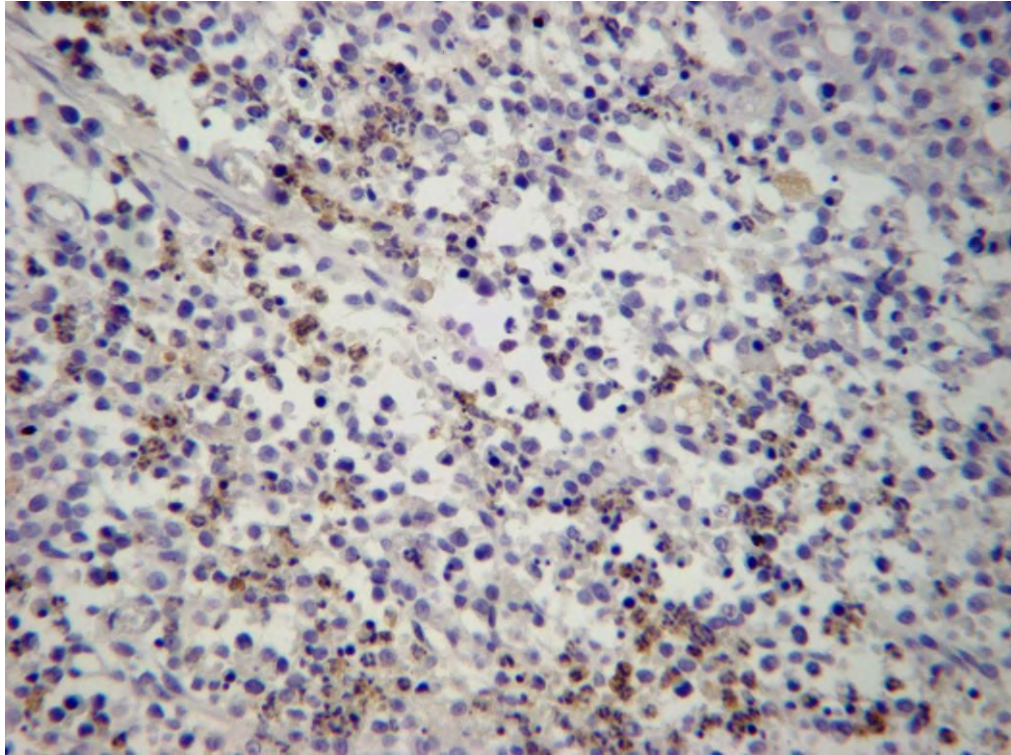


Figura 16. TVTC extragenital (12). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de macrófagos e neutrófilos intersticiais para o anticorpo anti-CD18. Obj. 10.

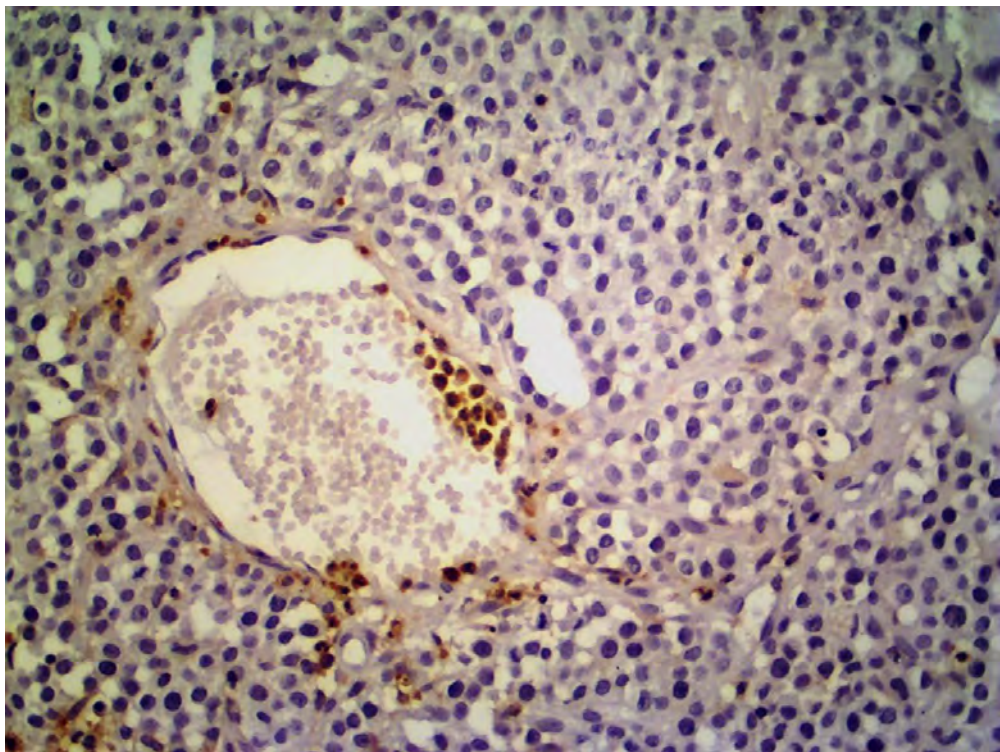


Figura 17. TVTC genital (4). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de neutrófilos intersticiais para o anticorpo anti-CD18. Obj. 20.

4.5.5 Anticorpo anti-CD3 (CD 3)

No caso do anticorpo anti-CD3 um TVTC genital (8), fixado em paraformaldeído, e um extragenital (15) não apresentaram imuno-reatividade. Dois TVTCs (1, 2) apresentaram fraca expressão (+) (Figura 19), seis moderada expressão (++) (3, 5, 6, 7, 10 e 9) (Figuras 20 e 21) e um forte expressão (+++) (4) (Figura 22) deste antígeno. Em seis TVTCs genitais (2, 4, 5, 7, 10 e 9) verificou-se forte marcação perinuclear (Figuras 19 a 22). Os linfócitos T presentes no linfonodo utilizado como controle positivo apresentaram intensa expressão (Figura 18). A Tabela 13 sintetiza os resultados obtidos na avaliação imuno-histoquímica dos TVTCs genitais e extragenitais.

Tabela 13. Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para CD3

CD3	TVTC		TOTAL
	TVTCs GENITAIS	EXTRAGENITAIS	
Testados	10	6	16
Positivos	9	5	14
Macrófagos/neutrófilos	0	0	0

*Macrófagos e neutrófilos infiltrados no tumor

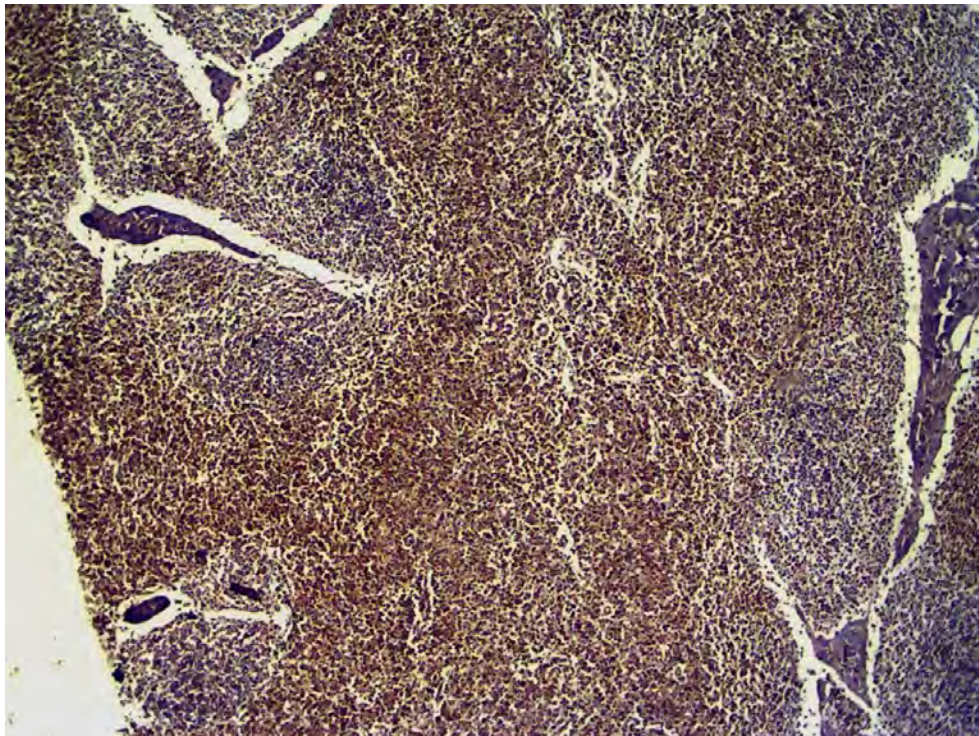


Figura 18. Controle-positivo (linfonodo de cão). Intensa imuno-reatividade em linfócitos T presentes predominantemente fora dos centros foliculares para o anticorpo anti-CD3. Obj. 10.

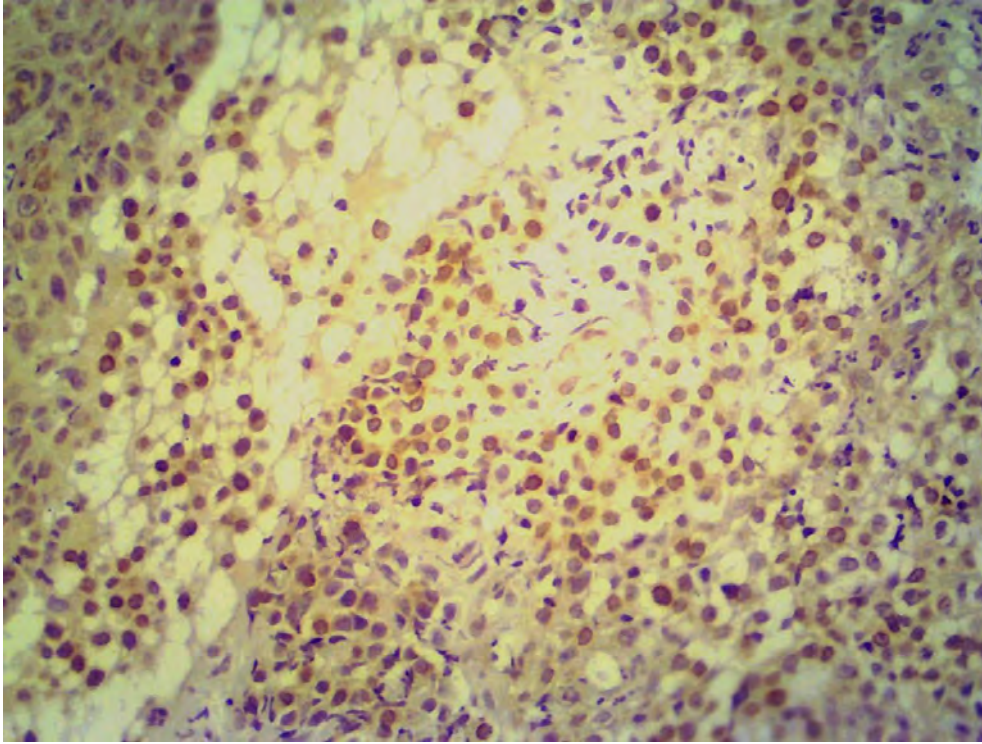


Figura 19. TVTC genital (2). Fraca imuno-reatividade para o anticorpo anti-CD3, com mais de 90% das células tumorais positivas. Forte marcação perinuclear em algumas células tumorais. Obj. 20.

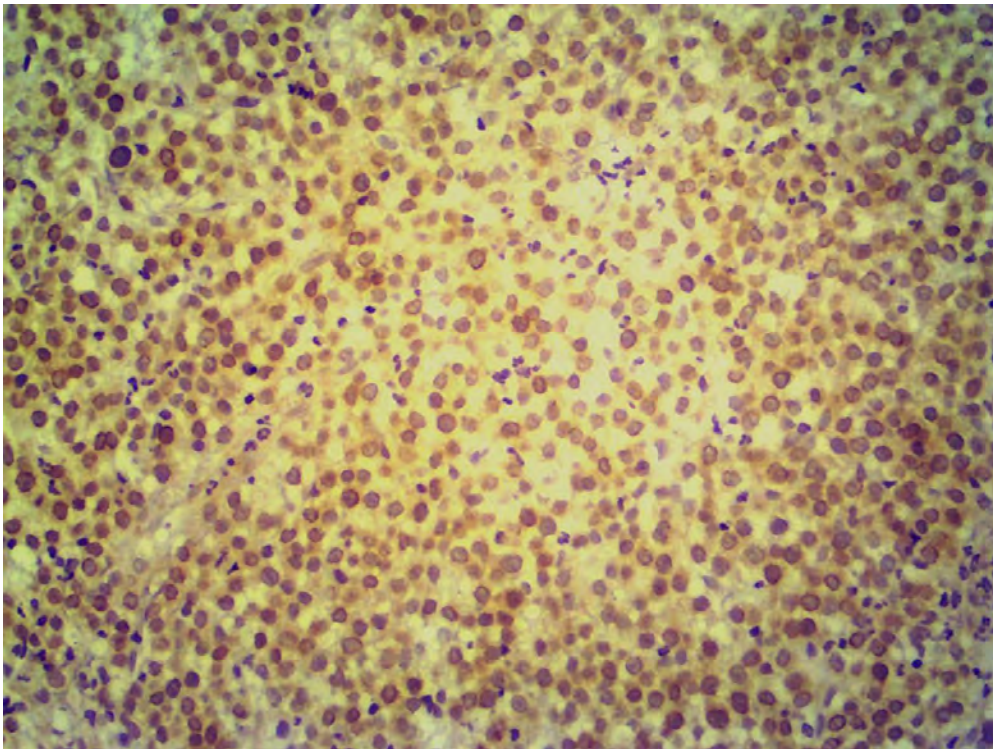


Figura 20. TVTC genital (3). Moderada imuno-reatividade para o anticorpo anti-CD3, com mais de 90% das células tumorais positivas. Forte marcação perinuclear em algumas células tumorais. Obj. 20.

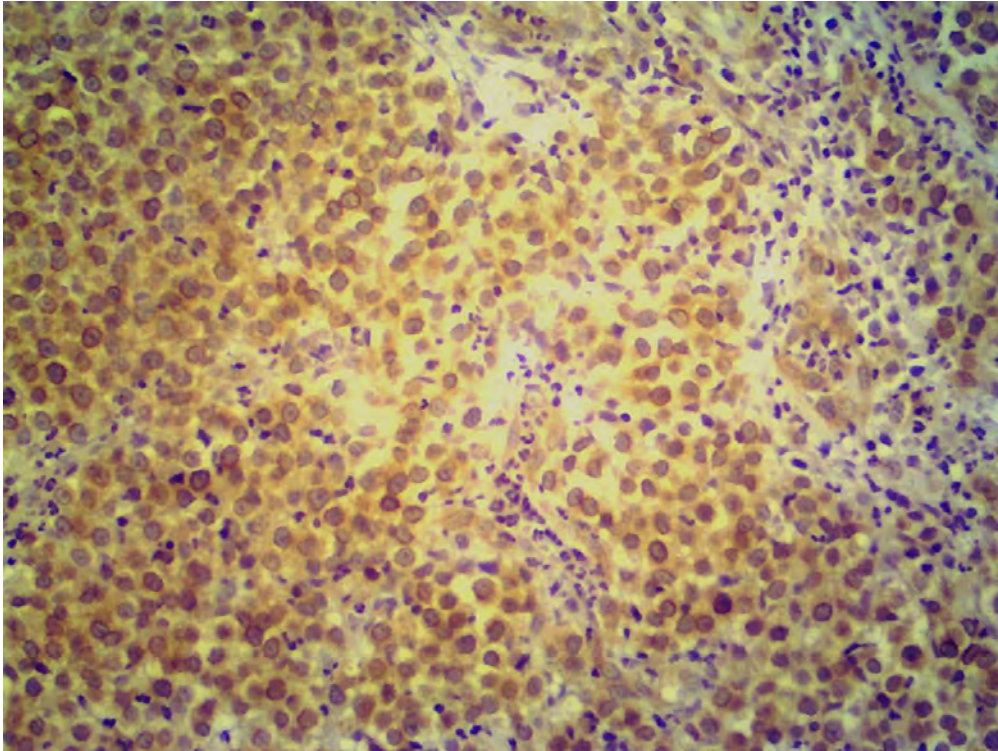


Figura 21. TVTC genital (3). Moderada imuno-reatividade para o anticorpo anti-CD3, com mais de 90% das células tumorais positivas. Forte marcação perinuclear em algumas células tumorais. Obj. 20.

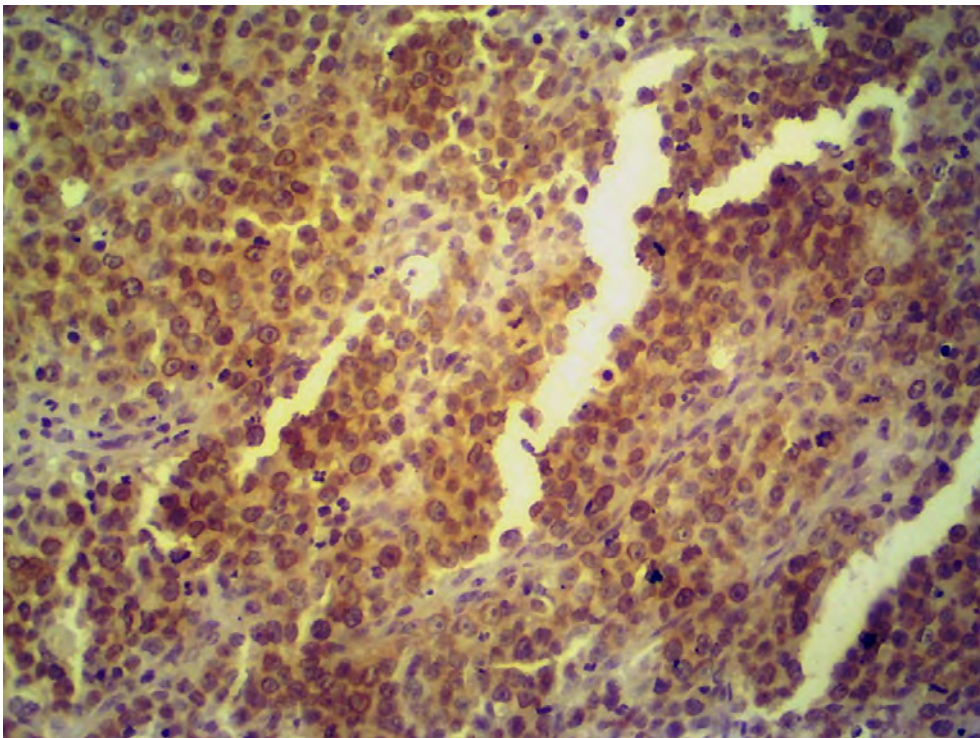


Figura 22. TVTC genital (4). Intensa imuno-reatividade, mais de 90% das células tumorais positivas, para o anticorpo anti-CD3. Forte marcação perinuclear em algumas células tumorais. Obj. 20.

4.5.6 Anticorpo anti-CD117 (CD 117)

Apenas um TVTC genital (2), fixado em formaldeído, não apresentou imuno-reatividade para o anticorpo anti-CD117. Todos os outros 9 TVTCs genitais testados apresentaram forte (+++) marcação citoplasmática das células tumorais (Figuras 24 a 26). Macrófagos e neutrófilos infiltrados na massa tumoral apresentaram imuno-reatividade para este anticorpo. O mastocitoma utilizado como controle positivo também apresentou forte marcação citoplasmática (Figura 23). A Tabela 14 sintetiza os resultados obtidos na avaliação imuno-histoquímica dos TVTCs genitais e extragenitais para o anticorpo CD117.

Tabela 14. Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para CD117

CD117	TVTC		TOTAL
	TVTCs GENITAIS	EXTRAGENITAIS	
Testados	10	6	16
Positivos	9	6	15
Macrófagos/neutrófilos	10	5	15

*Macrófagos e neutrófilos infiltrados no tumor

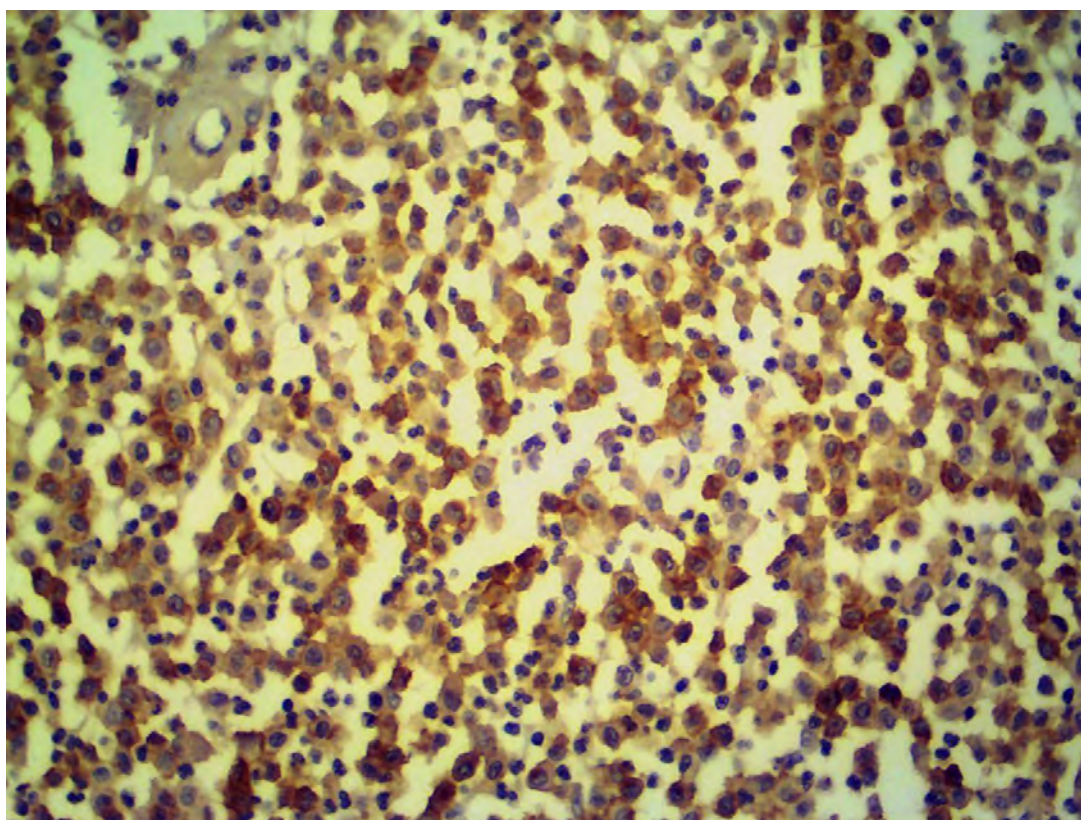


Figura 23. Controle-positivo (mastocitoma de cão). Intensa imuno-reatividade em mastócitos para o anticorpo anti-CD117. Obj. 20.

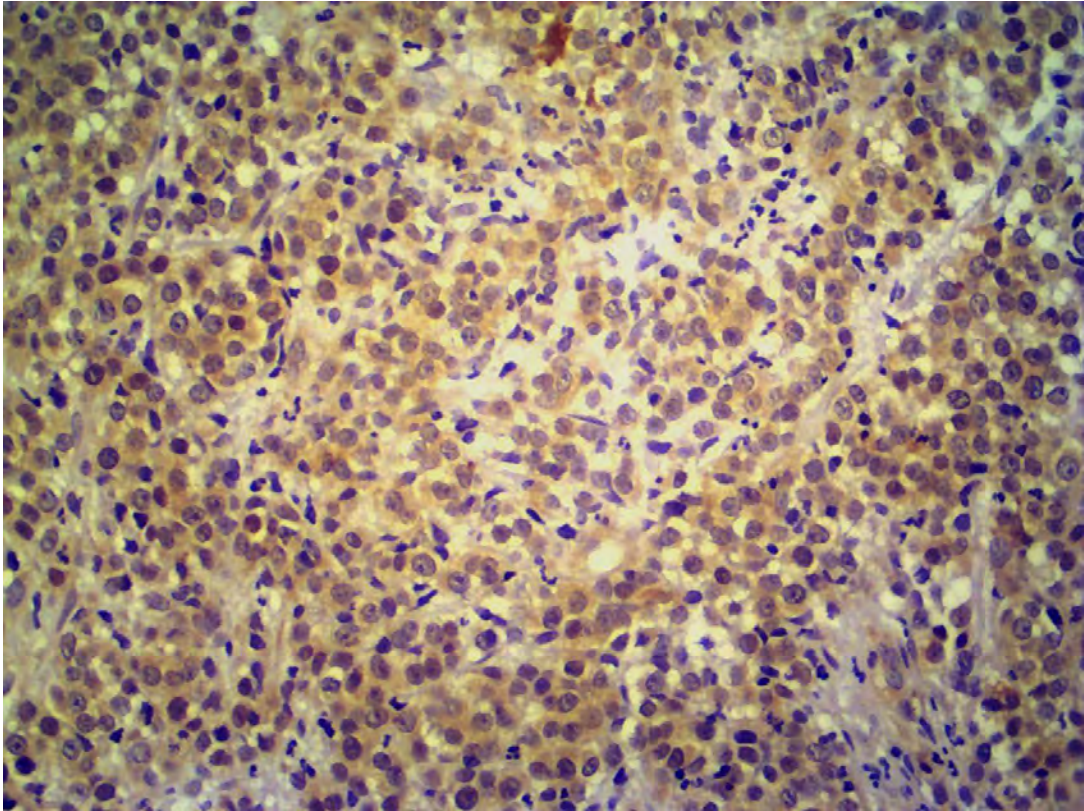


Figura 24. TVTC genital (4). Intensa imuno-reatividade, com mais de 90% das células tumorais positivas, para o anticorpo anti-CD117. Obj. 20.

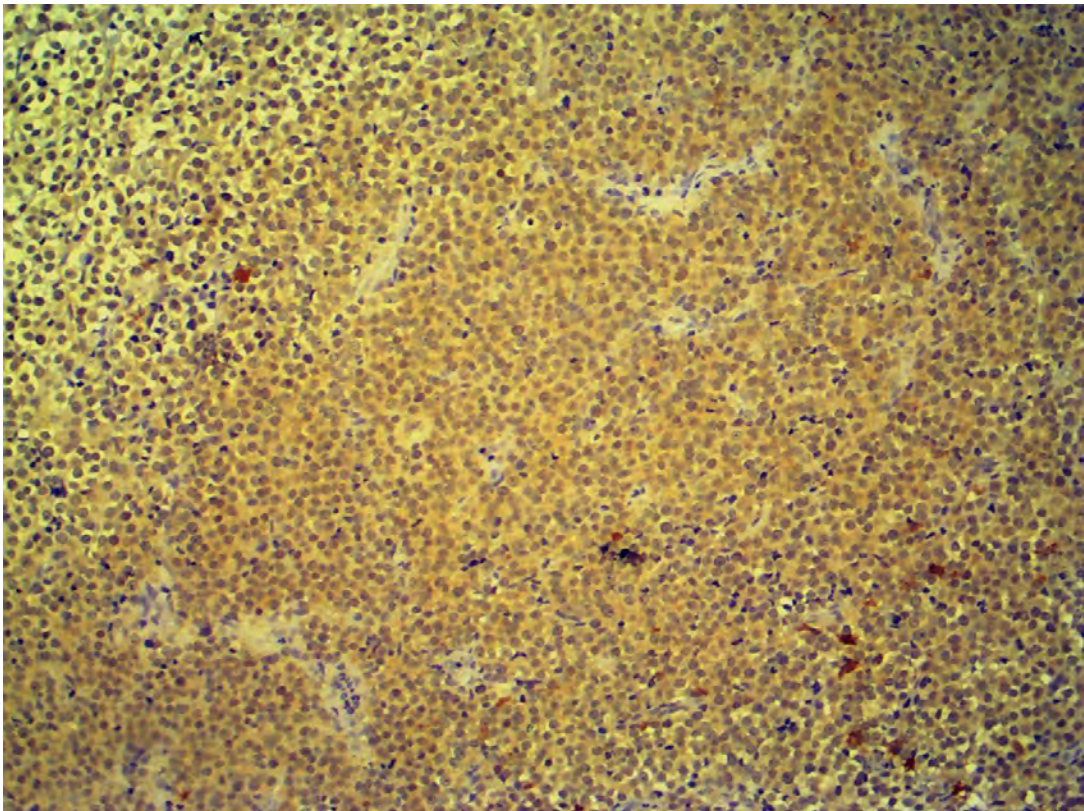


Figura 25. TVTC genital (3). Intensa imuno-reatividade, com mais de 90% das células tumorais positivas, para o anticorpo anti-CD117. Obj. 10.

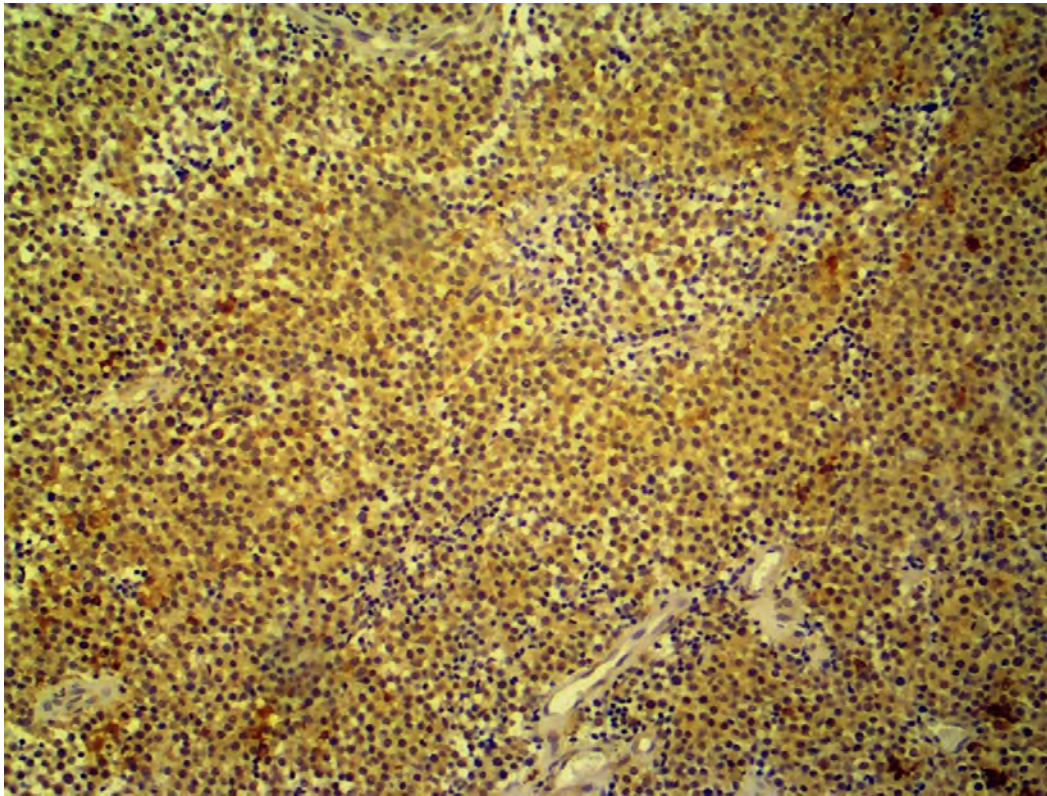


Figura 26. TVTC genital (1). Intensa imuno-reatividade, com mais de 90% das células tumorais positivas, para o anticorpo anti-CD117. Obj. 10.

4.5.7 Anticorpo anti-CD79a (CD79a)

Nenhuma das células tumorais dos TVTCs estudados apresentaram imuno-reatividade para este anticorpo (Figuras 28 a 31). Não houve diferença entre os TVTCs genitais fixados em formaldeído e entre os fixados em paraformaldeído. Também não houve diferença entre os TVTCs genitais e extragenitais na expressão do CD79a. As células neoplásicas do plasmocitoma de cão utilizado como controle positivo apresentaram forte expressão (Figura 27). Plasmócitos e linfócitos B infiltrados no tumor apresentaram imuno-reatividade. A Tabela 15 sintetiza os resultados obtidos na avaliação imuno-histoquímica dos TVTCs genitais e extragenitais.

Tabela 15. Número de TVTCs genitais e extragenitais positivos para CD79a

CD79a	TVTC		TOTAL
	GENITAIS	EXTRAGENITAIS	
Testados	10	6	16
Positivos	0	0	0
Macrófagos/neutrófilos*	0	0	0

*Macrófagos e neutrófilos infiltrados no tumor

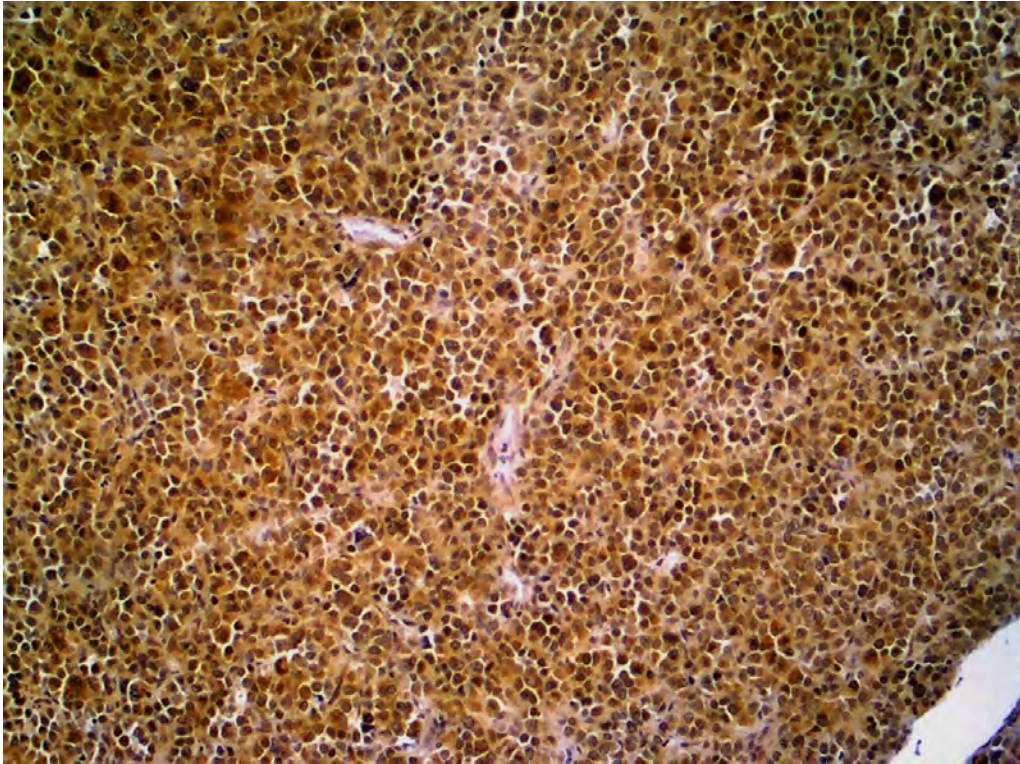


Figura 27. Controle-positivo (plasmocitoma cão). Intensa imuno-reatividade em plasmócitos neoplásicos para o anticorpo anti-CD79a. Obj. 10.

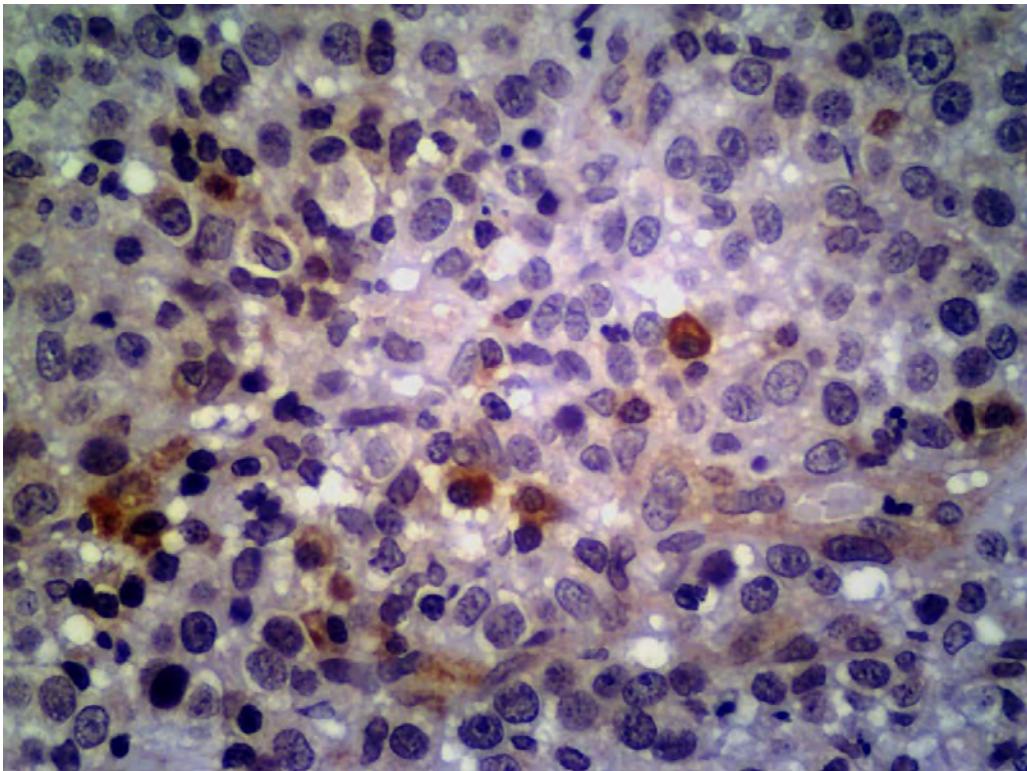


Figura 28. TVTC genital (4). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de plasmócitos e linfócitos intersticiais para o anticorpo anti-CD79a. Obj. 40.

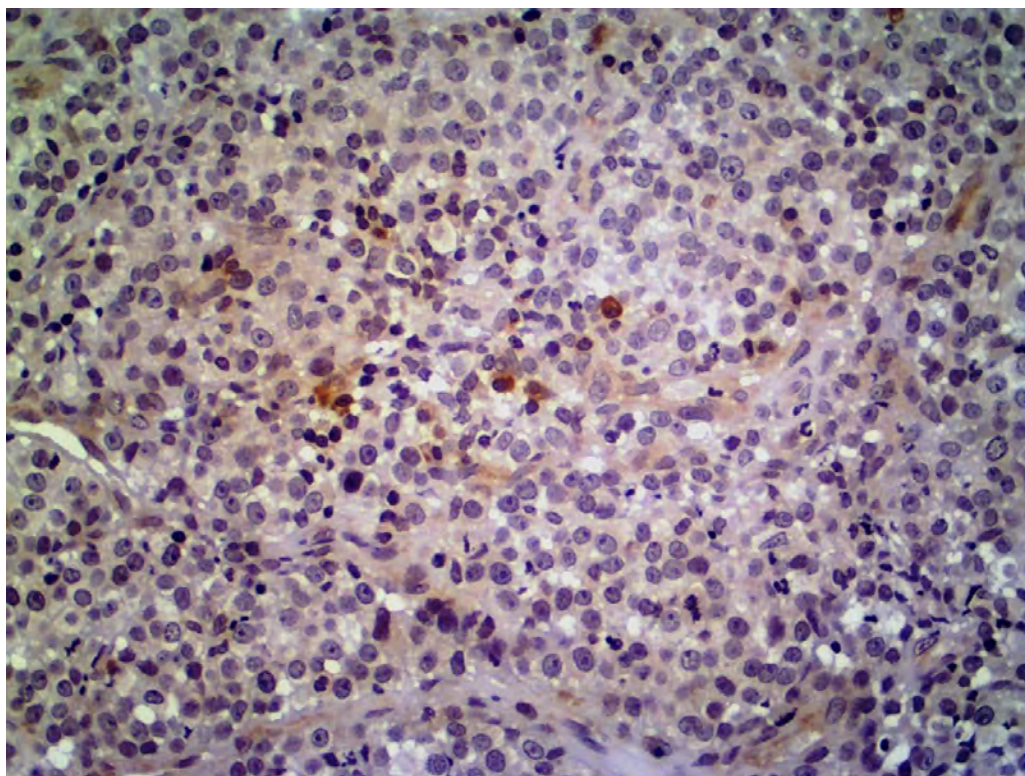


Figura 29. TVTC genital (4). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de plasmócitos e linfócitos intersticiais para o anticorpo anti-CD79a. Obj. 10.

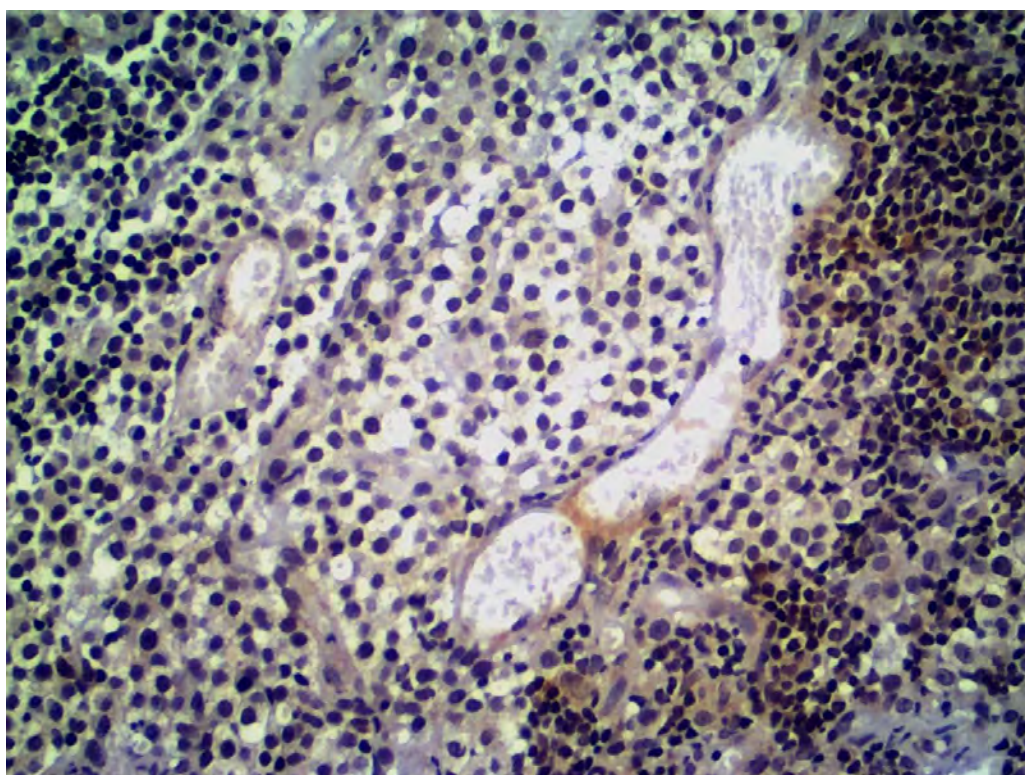


Figura 30. TVTC genital (1). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais e marcada reatividade de linfócitos intersticiais para o anticorpo anti-CD79a. Obj. 20.

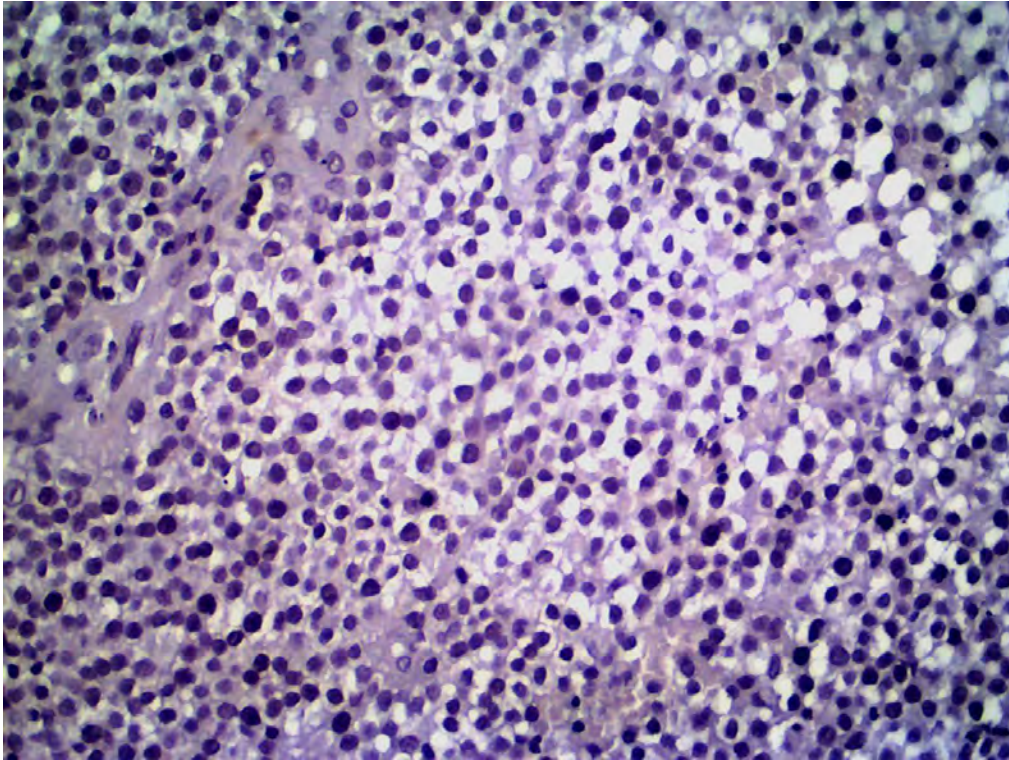


Figura 31. TVTC genital (5). Ausência de imuno-reatividade das células tumorais para o anticorpo anti-CD79a . Obj. 20.

Os resultados da imuno-histoquímica foram sintetizados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16. Imuno-reatividade dos TVTCs genitais testados para os respectivos anticorpos

	TVTC 1	TVTC 2	TVTC 3	TVTC 4	TVTC 5	TVTC 6	TVTC 7	TVTC 8	TVTC 9	TVTC 10
Lisozima	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Vimentina	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
CD18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CD117	(+++)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
CD3	(+)	(+)	(++)	(+++)	(++)	(++)	(++)	(-)	(++)	(++)
CD79a	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Anti-macrófago	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(-) negativo; (+) fraco, (++) moderado, (+++) forte

Tabela 17. Imuno-reatividade dos TVTCs extragenitais testados para os respectivos anticorpos

	TVTC 11	TVTC 12	TVTC 13	TVTC 14	TVTC 15	TVTC 16
Lisozima	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Vimentina	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
CD18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CD117	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
CD3	(+++)	(++)	(++)	(++)	(-)	(++)
CD79a	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Anti-macrófago	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(-) negativo; (+) fraco, (++) moderado, (+++) forte

4.6 Lectino-histoquímica

No estudo lectino-histoquímico, os 4 TVTCs (1, 2, 3, 4) testados apresentaram forte expressão de glicoconjugados com afinidade para Con-A, RCA, PHA-L (Figuras 32 a 35), moderada marcação com PHA-E e UEA e fraca marcação para LCA, SBA e PSA. Todos os TVTCs foram negativos com SJA, PNA, SWGA, WGA, DBA e GSL.

Os resultados da avaliação lectino-histoquímica foram sintetizados nas Tabelas 18 e 19.

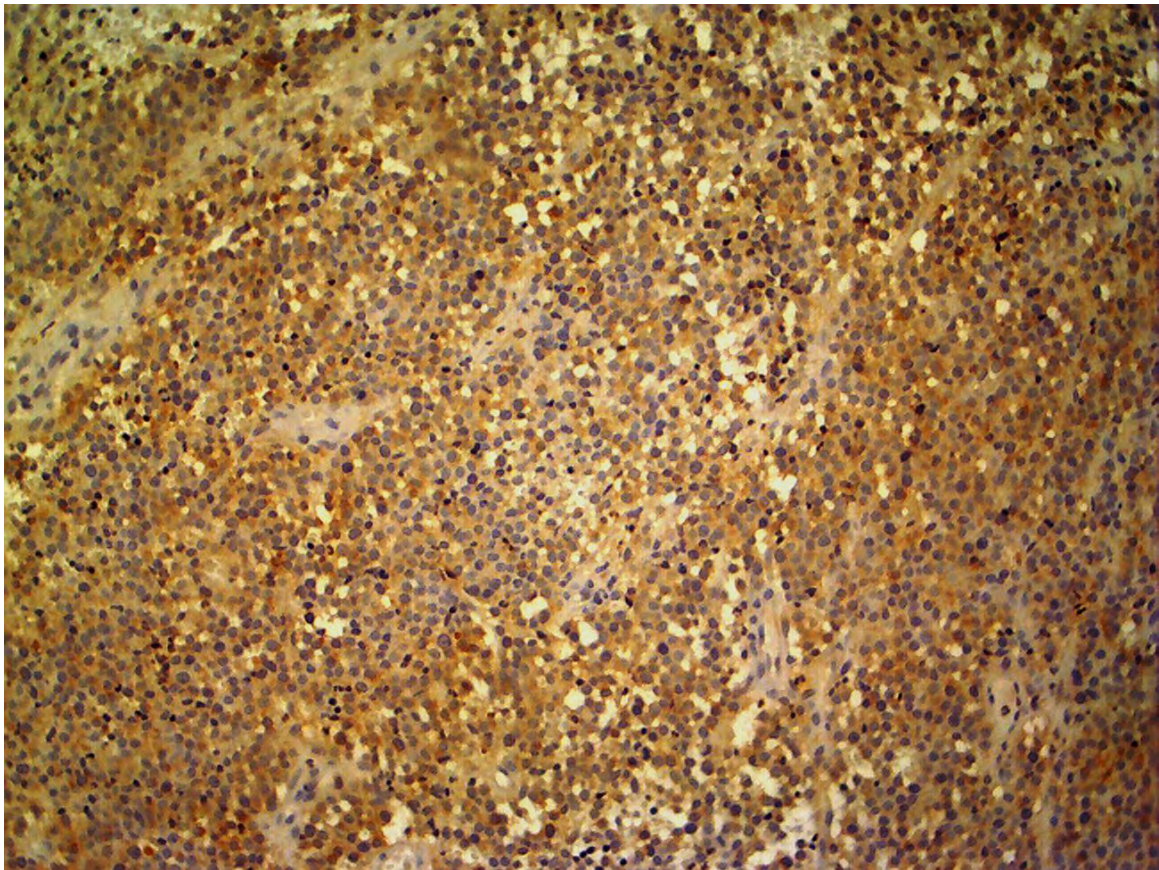


Figura 32. TVTC genital (4). Intensa marcação, com mais de 90% das células tumorais positivas, com a lectina PHA-L. Obj. 10.

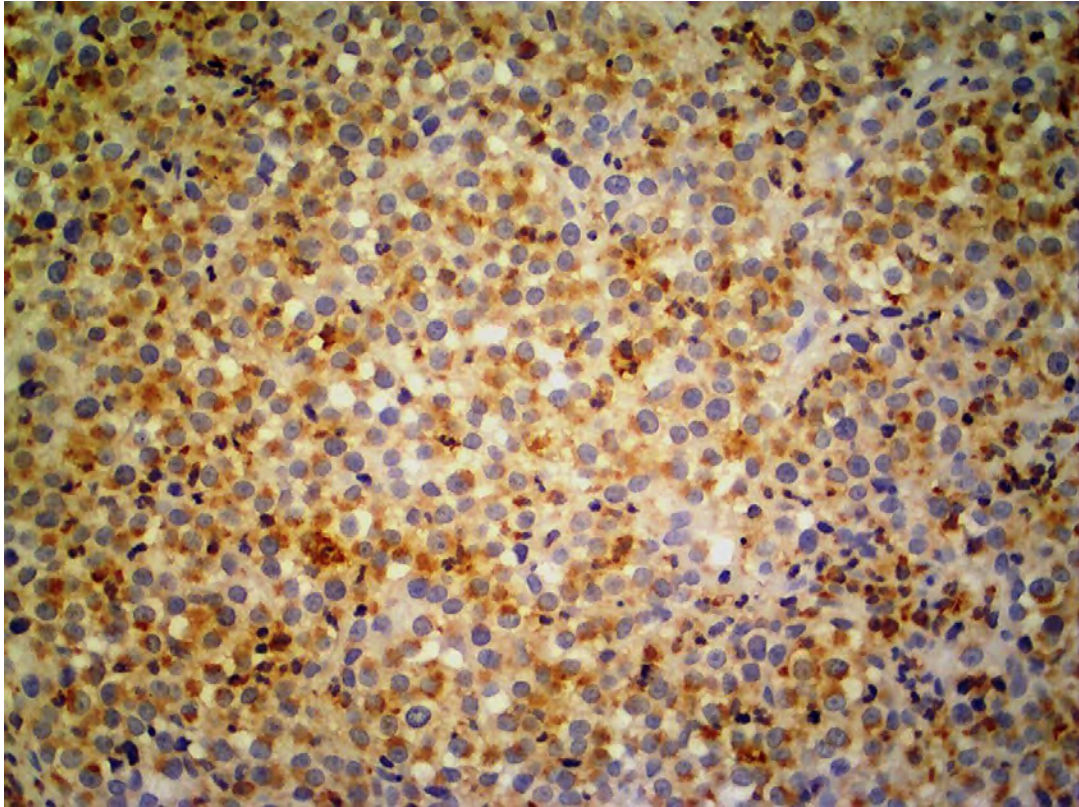


Figura 33. TVTC genital (3). Intensa marcação, com mais de 90% das células tumorais positivas, com a lectina RCA. Obj. 20.

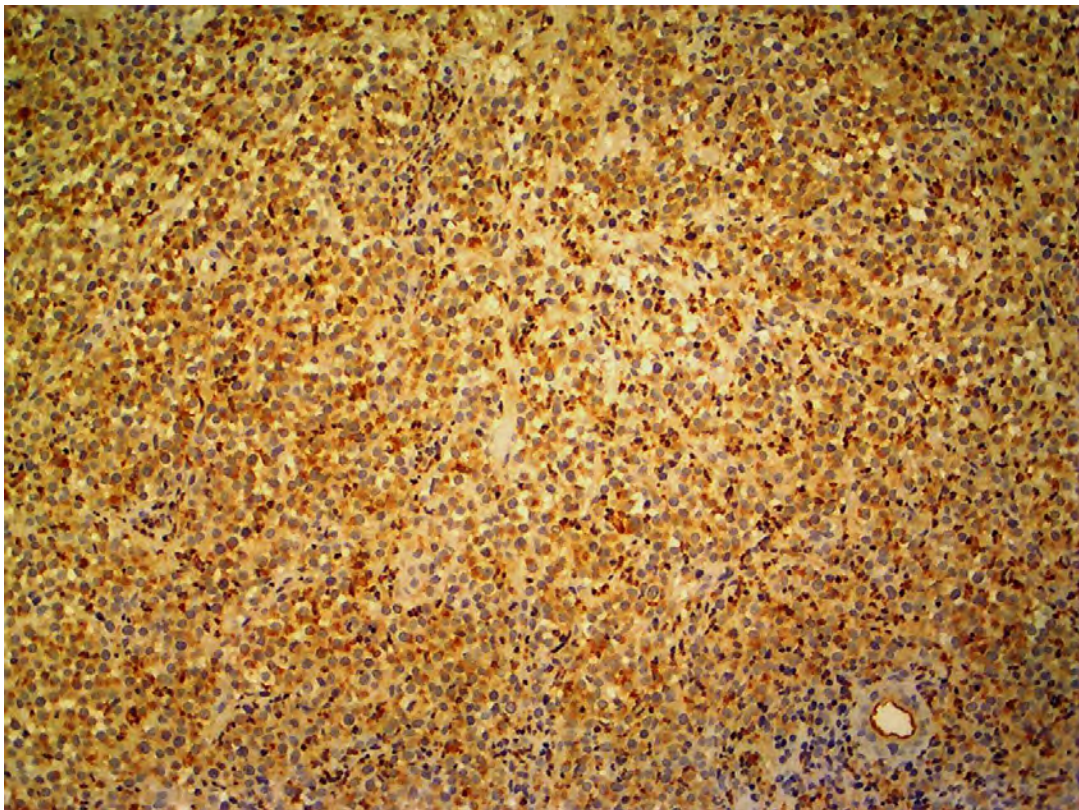


Figura 34. TVTC genital (3). Intensa marcação, com mais de 90% das células tumorais positivas, com a lectina RCA. Obj. 10.

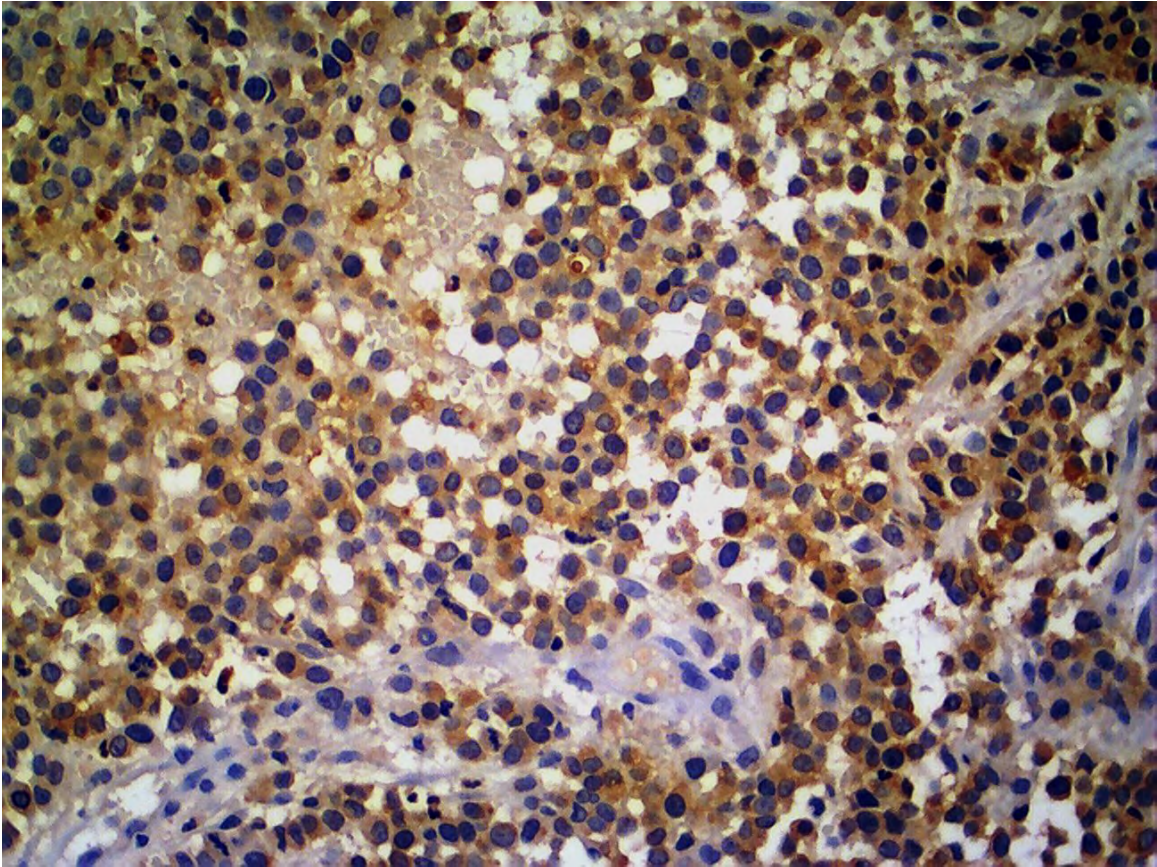


Figura 35. TVTC genital (4). Intensa marcação, com mais de 90% das células tumorais positivas, com a lectina Con-A. Obj. 20.

Tabela 19. Resultado do estudo lectino-histoquímico nos TVTCs

Lectinas	TVTC 1	TVTC 2	TVTC 3	TVTC 4
Con A	(++)	(+)	(++)	(+++)
DBA	(+)	(-)	(+)	(-)
RCA	(+++)	(+++)	(++)	(++)
SJA	(-)	(-)	(-)	(-)
PNA	(-)	(-)	(-)	(-)
PHA-L	(+++)	(+++)	(++)	(+++)
SWGA	(-)	(-)	(-)	(-)
WGA	(-)	(-)	(+)	(+++)
GSL	(-)	(-)	(-)	(-)
PHA-E	(++)	(++)	(++)	(++)
LCA	(+)	(+)	(+)	(+)
UEA	(++)	(+)	(+++)	(+)
SBA	(+)	(+)	(-)	(++)
PSA	(+)	(++)	(++)	(-)

5 DISCUSSÃO

5.1 Citopatologia e Histopatologia

O estudo citológico e histológico dos 16 TVTCs estudados não revelou aspectos morfológicos diferentes daqueles descritos na literatura (NIELSEN; KENNEDY, 1990; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001, GROSS et al., 2005). Também não foram observadas diferenças citopatológicas e histopatológicas entre os TVTCs genitais e extragenitais selecionados para este estudo.

5.2 Imuno-histoquímica

5.2.1 Marcadores das desordens histiocíticas

5.2.1.1 Anticorpo anti-lisozima (lisozima)

Não houve imuno-reatividade das células tumorais dos TVTCs ao anticorpo anti-lisozima, como já fora verificado anteriormente por Mascarenhas (2010). Este resultado, contudo, difere do relatado por Mozos et al. (1996) que verificaram reatividade em 40% dos casos e por Marchal et al. (1997) que observaram intensa expressão da lisozima em 100% dos TVTCs testados (14 tumores). Marchal et al. (1997) acreditam que essa diferença em relação ao resultado obtido por Mozos et al. (1996) deve-se ao meio de recuperação antigênica (enzimática ou calor) utilizado. Em nosso trabalho, apesar de utilizarmos a mesma técnica (recuperação antigênica pelo calor no micro-ondas) descrita por Marchal et al. (1997), não observamos reatividade das células tumorais.

Há que se lembrar que os macrófagos imuno-reativos, infiltrados entre as células tumorais, podem facilmente ser confundidos com células neoplásicas e causar erro na interpretação dos resultados. Além disto, os prolongamentos citoplasmáticos destas células inflamatórias, que foram fortemente positivas para lisozima, ficam sobrepostos ou muito associados ao citoplasma das células tumorais, o que pode, gerar essa confusão na interpretação. No presente estudo, os macrófagos e neutrófilos foram fortemente imuno-reativos para lisozima e numa análise inicial, menos acurada, também foram por nós confundidos com células tumorais.

Outro fato que poderia justificar a diferença dos achados imuno-histoquímicos seria a heterogeneidade do TVTC, que apresenta uma diversidade substancial de linhagem em todo o mundo verificada através de análise genética (LIAO et al., 2003; MURGIA et al., 2006; REBBECK et al., 2009). Este fato, poderia justificar a diferença na expressão de proteínas nas células tumorais do TVTC entre os diferentes estudos.

Apesar do anticorpo anti-lisozima expressar imuno-reatividade em tumores de origem não-histiocítica em cão, a demonstração de imuno-reatividade desta enzima em TVTC tem sido tomada como hipótese de que esse tumor tenha origem histiocítica (MARCHAL et al., 1997).

Moore (1986b), entretanto, relata que o uso da lisozima como um marcador de células de origem histiocítica tem uso limitado, pois nem todos os macrófagos expressam a proteína. Além disto, segundo este autor, as células dendríticas de Langerhans, as células foliculares e as células reticulares interdigitais também têm falhado em apresentar imuno-reatividade para a lisozima. Nos histiocitomas cutâneos (tumor de células de Langerhans) em cães, a presença da lisozima tem sido variável (MOORE, 1986b; SANDUSKY; CARLTON; WIGHTMAN,

1987) ou até nula (MARCHAL et al., 1995). Morris et al. (2002), aliás, não incluíram a lisozima no estudo por obter achados inconsistente com este anticorpo.

A fixação do material também é de suma importância para a preservação da antigenicidade (RAMOS-VARA et al., 2008, RAMOS-VARA, 2005). Problemas na fixação, que justificariam a ausência de expressão da lisozima em nossos TVTCs, afetariam também a imuno-reatividade em macrófagos e neutrófilos infiltrados na massa tumoral, o que não ocorreu nos casos do presente estudo.

5.2.1.2 Anticorpo anti-macrófago (anti-macrófago) (ACM1)

Nos TVTCs testados neste estudo não houve imuno-reatividade para o anticorpo anti-macrófago humano, enquanto macrófagos e neutrófilos infiltrados na massa tumoral reagiram e marcaram intensamente com este anticorpo. Este resultado difere do obtido por Marchal et al. (1997) que descreveram 80% de positividade com o uso do anticorpo monoclonal murino contra macrófagos de cão (ACM1). Esse anticorpo reconhece uma grande variedade de epítomos de macrófagos de cão em diferentes tecidos. Esta discrepância no resultado poderia ser decorrente da diferença de anticorpos utilizados (utilizamos anticorpo anti-macrófago humano), entretanto, essa possibilidade é improvável já que macrófagos caninos infiltrados nos TVTCs deste estudo coraram intensamente pelo anticorpo anti-macrófago humano, onde mais uma vez, as células tumorais falharam em apresentar imuno-reatividade para marcadores de origem histiocítica. Tal fato corrobora o afirmado por outros autores (GROSS et al., 2005), que o TVTC tem constantemente falhado em demonstrar a expressão de glicoproteínas características para histiócitos (macrófagos e células dendríticas). Segundo Marchal et al. (1997), a marcação do TVTC por ACM1 fortaleceria a hipótese da origem histiocítica deste tumor. Os resultados do presente estudo foram contrários a esta hipótese visto que o anticorpo anti-macrófago não se apresentou como um marcador das células neoplásicas dos TVTCs avaliados.

5.2.1.3 Anticorpo anti-CD 18 (CD 18)

Atualmente, o critério imuno-histoquímico mais utilizado para a identificação de células histiocíticas em tecidos previamente fixados em formol e emblocados em parafina é a verificação da imuno-reatividade para o CD18 e a utilização do CD3 e CD79a para a eliminação de possível origem linfocítica (AFFOLTER; MOORE, 2002).

Nenhum dos TVTCs avaliados neste estudo apresentaram imuno-reatividade para o anticorpo CD18, o que, mais uma vez, enfraquece a hipótese de que o TVTC teria origem histiocítica. Adicionalmente, Goldschmidt e Hendrick (2002) relatam que estudos mais recentes indicam que o TVTC seria constituído por leucócitos imaturos, o que sugere origem mielóide.

5.2.2 Marcadores das desordens linfocíticas

5.2.2.1 Anticorpo anti-CD3 (CD3)

Diferente do observado em outros trabalhos (MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002), os TVTCs testados neste estudo apresentaram imuno-reatividade com o anticorpo anti-CD3. Este anticorpo é considerado um marcador muito específico para linfócitos T (RAMOS-VARA, 2012). Dos 16 TVTCs testados, 14 foram positivos para CD3, o que poderia sugerir uma possível origem linfoide. As células tronco pluripotentes da medula óssea originam células progenitoras mieloides e linfoides. Os progenitores linfoides, por sua vez, irão originar os linfócitos T, B e células NK (JUNIOR et al., 2010).

Em 6 TVTCs foi observada forte marcação perinuclear com o uso do anticorpo CD3. Ramos-Vara (2012) informa que nas células do timo, o CD3 aparece predominantemente como um constituinte intracitoplasmático, enquanto que nos linfócitos T maduros este antígeno apresenta-se na superfície (na membrana citoplasmática). Estes dados estão de acordo com o citado por Goldschmidt e Hendrick (2002), que o TVTC seria constituído por leucócitos imaturos, já que existe uma marcação intracitoplasmática perinuclear.

Já Mozos et al. (1996) e Marchal et al. (1997) descartaram a possibilidade da hipótese de origem linfocítica e plasmocítica do TVTC, uma vez que, este tumor não apresentou imuno-reatividade para CD3 e para imunoglobulina de cadeia leve lambda. Mozos et al. (1996) utilizaram a técnica da recuperação enzimática com o uso da pronase para a recuperação antigênica, enquanto neste estudo foi utilizada a recuperação antigênica feita pelo calor no microondas. Esta diferença na técnica da recuperação antigênica poderia justificar as diferenças encontradas. Marchal et al. (1997), no entanto, utilizaram o calor como recuperação antigênica e diferente do nosso resultado não observaram reatividade das células tumorais. É difícil determinar, com certeza, a causa dessas discrepâncias.

Outro fato que poderia justificar a diferença dos achados imuno-histoquímicos seria a já citada heterogeneidade do TVTC, verificada através de análise genética (MURGIA et al., 2006; REBBECK et al., 2009). Este fato, poderia justificar a diferença na expressão de proteínas nas células tumorais do TVTC.

5.2.2.2 Anticorpo anti-CD79a (CD79a)

A exemplo do observado em outros trabalhos, (MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997, MEUTEN, 2002) não houve imuno-reatividade nos TVTCs testados nesse estudo para CD79a, anticorpo utilizado para marcar linfócitos B (FERNANDEZ et al., 2005).

Por outro lado, a hipótese da origem linfocítica/mieloide não deve ser descartada, pois nesse estudo verificou-se marcação para o anticorpo CD3.

5.2.3 Marcador de células mesenquimais

5.2.3.1 Anticorpo anti-vimentina (vimentina)

A imuno-reatividade das células tumorais do TVTC para a vimentina foi intensa, com mais de 90% das células positivas, em todos os tumores testados (16) no presente trabalho. Este resultado está de acordo com estudos previamente publicados (SANDUSKY; CARLTON; WIGHTMAN, 1987; MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997; MASCARENHAS, 2010). Também não verificamos diferença entre os TVTCs genitais e extragenitais na expressão deste anticorpo.

Portanto, a vimentina é uma boa opção de anticorpo para auxiliar no diagnóstico do TVTC, pois a marcação foi intensa e difusa. Por outro lado, devido a ampla expressão deste anticorpo em células mesenquimais e tumores de origem neural este auxílio é apenas parcial na descoberta da origem citogenética do TVTC (MARCHAL et al., 1997).

Em humanos, a marcação da vimentina em tecidos linfóides é variada em diferentes linhagens, entretanto, a expressão deste anticorpo em linfócitos T é constante em todos os estágios de maturação. Nos linfócitos B, no entanto, a síntese deste filamento é reduzida de acordo com a maturação desta célula (LILIENBAUM et al., 1986). Este fato, também pode corroborar com a origem linfóide/mieloide do TVTC uma vez que este tumor expressa filamentos de vimentina assim como os linfócitos T.

A imuno-reatividade deste anticorpo em macrófagos e neutrófilos como observada no presente estudo também já foi verificada em humanos. O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica composta por inúmeras proteínas que são expressas de acordo com a função celular. Várias funções dos neutrófilos como a quimiotaxia, a fagocitose, a degranulação e a apoptose, desencadeiam um rearranjo das proteínas do citoesqueleto. Moisan e Girard (2006) verificaram a expressão da vimentina em neutrófilos em apoptose. Já Mor-Vaknin et al. (2003) demonstraram que macrófagos ativados expressam este filamento intermediário.

5.2.4 Marcadores de tumores germinativos

5.2.4.1 Anticorpo anti-CD117 (c-Kit)

Com exceção de um caso, todos os tumores testados apresentaram moderada a forte marcação citoplasmática para o c-Kit. Em neoplasias de tecidos de animais tem-se relatado forte marcação deste anticorpo nos mastocitomas, nos tumores mesenquimais gastrointestinais, no “carcinoma ovariano canino” (MORINI, et al., 2004) e nos seminomas caninos (CHI-HO-YU et al., 2004). O padrão de coloração é fraco e inconstante nos tumores de mama benignos e malignos, nos melanomas, nos tumores de células intersticiais testiculares e nos tumores de células da granulosa (MORINI et al., 2004). A ampla expressão deste anticorpo em tumores de diferentes origens não auxilia muito na investigação da origem citogenética do TVTC, entretanto a marcação do c-Kit em leucemias mieloides agudas (MIETTINEN; LASOTA, 2005), corrobora uma possível origem mioeloides/linfóide. O c-kit é uma boa opção de anticorpo para o diagnóstico do TVTC, pois a marcação é intensa e difusa.

A imuno-reatividade de neutrófilos para o CD117 também está de acordo com a literatura pois neutrófilos humanos podem expressar este anticorpo. A expressão é influenciada pelo

gene que codifica o CD117 e varia de pessoa para pessoa (GALLI; BORREGAARD; WYNN, 2011).

Recentemente, tem-se relacionado o Kit na patogênese de múltiplas doenças neoplásicas em humanos (WEBSTER ET al., 2006). Uma deficiência neste receptor, associada a mutações hereditárias, pode acarretar alterações das funções Kit-dependentes, como a eritropoiese, pigmentação da pele, fertilidade e motilidade gastrointestinal. Por outro lado, uma ativação patológica do KIT, leva ao desenvolvimento de neoplasias Kit-dependentes e Kit positivas como os mastocitomas, as leucemias mieloides agudas, os seminomas, os tumores gastrintestinais estromais (GISTs) (MIETTINEN; LASOTA, 2005), os melanomas malignos e os carcinomas de pulmão (MORINI et al., 2004).

Como as células tumorais do TVTC foram Kit-positivas deve-se investigar uma possível alteração do receptor tirosina-quinase neste tumor, pois uma possível alteração patológica do receptor Kit pode estar relacionada à patogênese do TVTC.

5.3 Lectino-histoquímica

No estudo lectino-histoquímico, os 4 TVTCs testados apresentaram forte expressão para Con-A, RCA, PHA-L, moderada marcação para PHA-E e UEA e fraca expressão para LCA, SBA e PSA. Todos foram negativo para SJA, PNA, SWGA, WGA e GSL.

Este resultado foi, em parte, semelhante ao de Gimeno et al. (1995) que verificaram expressão nas células do TVTC de glicoconjugados para WGA, Con A e RCA-I e falha na imunoexpressão para UEA-I, PNA, SBA e DBA. Segundo estes autores, a expressão de Con A, WGA e RCA-I indica a presença de manose, glucose, galactose, N-acetyl-glucosamina e ácido siálico nas células do TVTC. A expressão de glicoconjugados com afinidades para estas lectinas nas células tumorais coincide com a expressão das células de Reed-Sternberg em linfomas de Hodgkin. Outros tumores derivados desta linhagem celular ou de neoplasias mesenquimais em humanos, como tumores de linfócitos B e T, histiócitos, linfoma de Burkitt, promielócito e mieloma também são Con A, WGA e RCA-I positivos (GIMENO et al., 1995).

Segundo Ree, Laurence, Crowley (1982) as células linfóides, macrófagos e histiócitos expressaram de maneiras variadas RCA, WGA, PNA, Con A, PHA, LCA e PSA. Esta expressão de maneira variada poderia justificar a não expressão dos TVTCs deste estudo para WGA, que diferiu do descrito por Gimeno et al. (1995).

A lectina presente em *Phaseolus vulgaris*, fitohemaglutinina (PHA), possui potente atividade aglutinadora sobre eritrócitos (PHA-E) e mitogênica para linfócitos (PHA-L). A PHA-L não se liga significativamente aos eritrócitos, apesar de se ligar com alta afinidade aos linfócitos e agir como mitógeno (SELL; COSTA, 2000). Kanellopoulos et al. (1985) descreveram que a molécula de PHA liga-se à superfície dos linfócitos através da interação com os carboidratos presentes nos receptores para antígenos de células T (Ti). O receptor de ligação de PHA é diferente de Con A, o qual se liga à T3. A forte expressão das células do TVTC com estas lectinas PHA-L e Con-A reforçam, então, a hipótese de uma possível origem linfóide/mielóide deste tumor, o que está de acordo com descrito por Gimeno et al. (1995).

5.4 Possível Origem do TVTC

Parte dos achados imuno-histoquímicos e lectino-histoquímicos verificados neste estudo indicam a possibilidade das células tumorais dos TVTCs apresentarem origem linfóide/mielóide, como já foi sugerido por Goldschmidt e Hendrick (2002). A marcação das células tumorais pelo anticorpo CD3, que na literatura é muito específico para linfócito T

(RAMOS-VARA, 2012), a também expressão da vimentina, que em humanos está presente em todas as fases de maturação do linfócito T (LILIENBAUM et al.,1986) e a marcação do c-Kit imuno-reativo em leucemias mieloides (MIETTINEN; LASOTA, 2005) são indicativos que fortalecem a teoria da origem linfóide/mieloide. Na avaliação lectino-histoquímica, a marcação por Con A e, principalmente, pela lectina PHA-L (se liga com alta afinidade a linfócitos) (SELL; COSTA, 2000) também fortalecem esta teoria.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do estudo imuno-histoquímico indicam que os TVTCs testados não demonstraram origem histiocítica, uma vez que não houve imuno-reatividade para os anticorpos anti-lisozima, anti-macrófago e anti-CD 18.

Os resultados das avaliações imuno-histoquímica (reatividade aos anticorpos anti-CD3, anti-vimentina e anti-CD117) e lectino-histoquímica (reatividade às lectinas ConA e, principalmente, à PHA-L) fortalecem a possibilidade das células tumorais dos TVTCs testados, apresentarem origem linfoide/mieloide.

A imuno-reatividade das células tumorais do TVTC para a vimentina, CD3 e CD117 foi intensa, com mais de 90% das células positivas, na grande maioria dos tumores testados. Este grupo de anticorpos é uma boa opção para o diagnóstico imuno-histoquímico do TVTC.

Como a imuno-reatividade das células tumorais do TVTC para CD117 foi intensa, com mais de 90% das células positivas, na grande maioria dos tumores testados, uma possível alteração patológica do receptor KIT pode estar relacionada ao desenvolvimento do TVTC.

As diferenças entre a expressão de proteínas para os anticorpos testados neste estudo, com os achados por outros autores, podem estar associadas à heterogeneidade genética deste tumor que apresenta uma diversidade substancial de linhagem em todo o mundo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, E.W., SLAUGHTER, L.J. A canine venereal tumor with metastasis to the brain. *Pathol.Vet.*, v. 7, p.498-502, 1970.
- AFFOLTER, V.K.; MOORE, P.F. Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. *Vet Pathol*, v. 39, p. 74-83, 2002.
- ALMEIDA, J. R. C., PEDROSA, N. L., LEITE, J.B., FLEMING, T. R. P., CARVALHO, V. H., CARDOSO, A. A. A. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53(3), p. 305-316, 2007.
- AMBER, E.I., ADEYANJU, J.B. Oronasal transmissible venereal tumor in a dog. *Modern Vet Pract*, v. 67, n. 12, p. 154, 1986.
- AMROLIA, P. J., REID S. D., GAO L., SCHULTHEIS, B., DOTTI, G., BRENNER M. K., MELO J. V., GOLDMAN, J. M., STAUSS, H. J. Allorestricted cytotoxic T cells specific for human CD45 show potent antileukemic activity. *Blood*, v. 101, p.1007-1014. 2003.
- FASSATI, A., MITCHISON, N. A. Testing the theory of immune selection in cancers that break the rules of transplantation. *Cancer Immunol. Immunother.* v.59, p. 643–651, 2010.
- BARRON, C., SAUNDERS, L.Z., SEIBOLD, H.R., *et al.* Intra-ocular tumors in animals. V. Transmissible venereal tumor of dogs. *Am J Vet Res*, v. 24, p. 1263-1269, 1963.
- BARROS, F.R.O. Identificação de marcadores de pluripotência em células tronco embrionárias e embriões de suínos, 2008, 86f. São Paulo- SP. Dissertação (Mestrado em reprodução animal) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- BATAMUZI, E.K., BITTEGEKO, S.B.P. Anal and perianal transmissible venereal tumour in a bitch. *Vet Rec*, v. 129, p. 556, 1991.
- BLOOM, F., PAFF, G.H., NOBACK, C.R. The transmissible venereal tumor of the dog studies indicating that the tumor cells are mature end cells of reticulo-endothelial origin. *Amer J Pathol*, v. 27, p. 119-139, 1951.
- BOSCOS, C. Canine transmissible venereal tumor: clinical observations and treatment. *Animal Famil.*, v. 3, p. 10-15, 1988.
- BRIGHT, R.M., GORMAN, N.T., PROBST, C.W., GORRING, R.L.. Transmissible venereal tumor of the soft palate in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, v. 183, p. 893-895, 1983
- BROWN, N.O., CALVERT, C., MACEWEN, E.G. Chemotherapeutic management of transmissible venereal tumour in 30 dogs. *J. Am. Vet. Med.Assoc.*, v.176, p.983-6, 1980.
- CARLSON, J.A., ROGERS, B.B., SIFERS, R.N., HAWKINS, H.K., FINEGOLD, M.J., WOO, S.L.C. Multiple tissues express alpha-1-antitrypsin in transgenic mice and man. *J. Clin. Invest.*, vol. 82, p. 26-36, 1988.

CHI-HO, YU1, DU-NA HWANG1, JI-YOUNG YHEE1, JONG-HYUK KIM1, KEUM-SOON IM1, WHAN-GOOK NHO2, YOUNG-SOO LYOO1, JUNG-HYANG SUR1
Comparative immunohistochemical characterization of canine seminomas and sertoli cell tumors. *J. Vet. Sci.*, v. 10, p. 1-7, 2009.

CHOI, Y.K., KIM, C.J. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 gene in canine transmissible venereal tumor. *J. Vet. Sci.*, v. 3, p. 285-92, 2002.

COBBOLD, S.P., METCALF, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the first international canine leukocyte antigen workshop (CLAW). *Tissue Antigens*, v. 43, p.137-154, 1994.

COHEN, D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. *Adv Cancer Res*, v. 43, p. 75-112, 1985.

COWELL, R.L., TYLER, R.D. Cytology of cutaneous lesions. *Vet Clin of North America: Small Animal Practice*, v. 19, n. 4, p. 769-794, 1989.

DAS, U., DAS, A.K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Vet Res Commun*, v. 24, n. 8, p. 545-556, 2000.

DENADAI, M. V. A., SILVA, S. R. M., WAITZBERG, A. F. L., ARTIGIANI, R.; SAAD, S. S., MATOS, D. Estudo da relação entre a imunexpressão das proteínas caderina-E e DCC com o grau de diferenciação celular e o estadiamento TNM do adenocarcinoma colorretal. *J. Brás. Patol. Med. Lab.*, v. 43, n. 5, p. 355-361, 2007.

DRABEROVA, L., DRABER, P. Thy-1 glycoprotein and src-like protein-tyrosine kinase p53/p56^{lyn} are associated in large detergent-resistant complexes in rat basophilic leukemia cells (tyrosine phosphorylation/mast cells/IgE receptor). *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 90, p. 3611-3615, 1993.

DUNCAN, J.R., PRASSE, K.W. Cytology of canine cell tumors (Mast cell tumor, histiocytoma, lymphosarcoma and transmissible venereal tumor). *Vet Pathol*, v. 16, n. 4, p. 673-679, 1979.

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

ESTEXHE, E. D, LESPAGNARD, L., EGEYTER, M. D., EYMANN, R. H, COIGNOUL, F. Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, v. 30, p. 146-154, 1993.

FASSATI, A., MITCHISON, A. Testing the theory of immune selection in cancers that breaks the rules of transplantation. *Cancer Immunol. Immunother.* v. 59, p. 643-651.

FERNANDEZ, N. J., WEST, K.H., JACKSON, M.L., KIDNEY, B.A. Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine round cell tumors. *Vet Pathol*, v. 42, p. 437-445, 2005.

FERRER L, FONDEVILA D, RABANAL R, TARRES J, RAMIS A. Immunohistochemical detection of CD3 antigen (pan T marker) in canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest.*, v. 5, p. 616-620, 1993.

FULMER, A. K.; MAULDIN, G.E. Canine histiocytic neoplasia: an overview. *Can Vet J.*, v. 48, n. 10, p. 1041-1450, 2007.

GALLI, S. J., BORREGAARD, N., WYNN, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.*, v. 12, n. 11, p. 1035–1044, 2011.

GIMENO, E. J., MASSONE, A. R., MARINO, F. P., IDIART, J. R. Intermediate filament expression and lectin histochemical features of canine transmissible venereal tumour. *APMIS.* v. 103, p. 645-650, 1995.

GOLDSCHMIDT, M. H., HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissue. In: MEUTEN, D.J., Tumors in domestic animals. 4th ed. Blackwell Publishing Company, 2002, p. 45-117.

GROSS, T. L., IRHKE, P.J., WALDER, E.J., AFFOLTER, V.K. Skin diseases of the dog and cat. Clinical and histopathologic diagnosis. 2nd ed. Blackwell Science, 2005.

HAINES, D.M., CHELACK, B.J. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemistry staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diag Invest*, vol. 3, p. 101-112, 1991.

HOOGSTEDEN, H. C., VAN HAL, P. T., WIJKHUIJS, J. M., HOP, W., VERKAIK, A. P., HILVERING, C. Expression of the CD11/CD18 cell surface adhesion glycoprotein family on alveolar macrophages in smokers and nonsmokers. *Chest*, n.100; p.1567-1571, 1991.

HSIAO, Y.W., LIAO, K.W., HUNG, S.W., CHU, R.M. Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF-beta 1 and restores the lymphokine-activated killing activity. *J. Immunol.*, v. 172, p. 1508–14, 2004.

HSIAO, Y.W., LIAO, K.W., CHUNG, T.F., LIU, C.H., HSU, C.D., CHU, R.M. Interactions of host IL-6 and IFN-gamma and cancer-derived TGF-beta1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *Cancer Immunol. Immunother.* v. 57, p. 1091-1104, 2008.

ISAACSON, P., JONES, D.B., MILLWARD-SADLER, G.H., JUDD, M.A., PAYNE, S. Alpha-1-antitrypsin in human macrophages. *J. Clin Pathol.*, vol. 34, p. 982-990, 1981.

JUBB, K.F.V., KENNEDY, P.C., PALMER, P.C. Pathology of Domestic Animals. 5th ed., San Diego: Academic Press, 2007.

JÚNIOR, D. M., ARAÚJO J. A. P., CATELAN T. T. T., SOUZA, A. W. S., CRUVINEL, W. M., ANDRADE, L. E.C., SILVA N. P. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol.* v. 50(5), p.552-80, 2010.

- KANELLOPOULOS, J.M., PETRIS, S., LECA, G., CRUMPTON M. J. The mitogenic lectin from *Phaseolus vulgaris* does not recognize the T3 antigen of human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* v.15, p. 457-486, 1985.
- KENNEDY, J.R., YANG, T-J., ALLEN, P.L. Canine transmissible venereal sarcoma: electron microscopic changes with time after transplantation. *Br. J. Cancer.* v.36, p. 375-385, 1977.
- KIM, JONG-HYUK, YU, CHI-HO, YHEE, JI-YOUNG, IM, KEUM-SOON, KIM, NA-HYUN, SUR, JUNG-HYANG. Canine classical seminoma: a specific malignant type with human classifications is highly correlated with tumor angiogenesis. *BMC Cancer.* v. 10, p. 243, 2010.
- KIUEP, M., WEBSTER, J. D., KANEENE, J. B., MILLER, R., YUZBASCIYAN-GURKAN, V. The Use of KIT and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet. Pathol.* v. 41, p. 371–377, 2004.
- KREISS, A., TOVAR, C., OBENDORF, D. L., DUN, K., WOODS, G. M. A Murine Xenograft Model for a Transmissible Cancer in Tasmanian Devils. *Vet Pathol.* v. 48, p. 475-481, 2011.
- LEROY, X., AUGUSTO, D., LETEURTRE, E., GOSSELIN, B. CD30 and CD117 (c-kit) used in combination are useful for distinguishing embryonal carcinoma from seminoma. *J Histochem Cytochem.* v. 50(2), p. 283-285, 2002.
- LIAO, K.W., LIN, Z.Y., PAO, H.N., KAM, S.Y., WANG, F.I., CHU, R.M. Identification of canine transmissible venereal tumor cells using in situ polymerase chain reaction and the stable sequence of the long interspersed nuclear element. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.15, p.399-406, 2003.
- LILIEBAUM, A., LEGAGNEUX, V., PORTIER, M-M., DELLAGI, K., PAULIN, D. Vimentin gene: expression in human lymphocytes and in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J.*, v.5, n. 11, p.2809 -2814, 1986.
- LOORINGH VAN BEECK, F. A., ZAJONC, D. M., MOORE, P. F., SCHLOTTER, Y. M., BROERE, F., RUTTEN, V. P. M. G., WILLEMSE, T., RHIJN, I. V. Two canine CD1a proteins are differentially expressed in skin. *Immunogenetics.*, v. 60, p. 315–324. 2008.
- LORIMIER, L.P., FAN, T. M. Canine Transmissible Venereal Tumor. In: WITHROW, S.J., MacEWEN, E.G. *Small animal clinical oncology.* 2nd. ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 2007.
- MAKINO, S. Some epidemiologic aspects of venereal tumors of dogs as revealed by chromosome and DNA studies. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* v. 108, p. 1106-1122, 1963.
- MARCHAL, T., CHABANNE, L., KAPLANSKI, C., RIGAL, D., MAGNOL, J.P. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumor. *Vet Immunol Immunopathol.* v. 57, n. 1-2, p. 1-11, 1997.
- MASCARENHAS, M.B. Estudo imuno-histoquímico e diagnóstico diferencial de formas genitais e extragenitais do tumor venéreo transmissível canino no Brasil. 2010, 78p.

Seropédica – RJ. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

MASON, D. Y., CORDELL, J. L., BROWN, M. H., BORST, J., JONES, M., PULFORD, K., JAFFE, E., RALFKIAER, E., DALLENBACH, F., STEIN, H., PILERI, S., GATTER, K. C. CD79a: A Novel Marker for B-Cell Neoplasms in Routinely Processed Tissue Samples. *Blood*. v. 86, n. 4, p. 1453-1459, 1995.

MIETTINEM, M., LASOTA, J. KIT (CD117): A review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* v. 13, n. 3, p. 205-219, 2005.

MOISAN, E., GIRARD, D. Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *J. Leuk. Bio.*, v. 79, p. 489-498, 2006.

MOORE, P.F., ROSIN, A. Malignant histiocytosis of Bernese mountain dogs. *Vet Pathol.*, v. 23, p. 1-10, 1986.

MOORE, P.F. Utilization of cytoplasmic lysozyme as a histiocytic marker in canine histiocytic disorders. *Vet. Pathol.*, v. 23, p. 757-762, 1986b.

MOORE, P. F., AFFOLTER, V. K., VERNAU, W. Canine Hemophagocytic Histiocytic Sarcoma: A Proliferative Disorder of CD11d+ Macrophages. *Vet. Pathol.*, n. 43, p. 632-645, 2006.

MOORE, P.F. Homepage. Disponível em: <http://www.histiocytosis.ucdavis.edu/> Acesso em 22 de junho de 2011.

MOR-VAKNIN, N., PUNTURIERI, A., SITWALA, K., MARKOVITZ, D. M. Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat. Cell Biol.*, v. 5, p. 59-63, 2003.

MORINI, M., BETTINI, G., PREZIOSI, R., MANDRIOLI, L. C-Kit gene product (CD 117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections. *J. Histochem. Cytochem.* v. 52, p. 705-708, 2004.

MORO, J.V., TINUCCI-COSTA, M., SILVEIRA, A.C.T., GERALDI, D.G., ALESSI, A.C. Reactivity of p53 protein in canine transmissible venereal tumor. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, 2, p.318-23, 2010.

MORRISON, W.B. *Cancer in dogs and cats: medical and surgical management*. Baltimore, Williams & Wilkins Co. 1998, p. 795.

MOURA, A.R., LAUSMANN, C.W. Tratamento quimioterápico de tumor (TVT) venéreo transmissível em caninos. *A Hora Veterinária*, v. 78, p. 16-18, 1994.

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

- MUKARATIRWA, S., GRUYS, E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *Vet. Q.*, v.25, p.101-111, 2004.
- MURCHISON, E.P. Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. Review. *Oncogene*, v. 27, p. S19-S30.48, 2009.
- MURCHISON, E.P., TOVAR, C., HSU, A., BENDER, H.S., KHERADPOUR, P.,REBBECK, C.A., OBENDOR, D., COLAN,C., BAHLO,M. et al. The Tasmanian devil transcriptome reveals Schwann cell origins of a clonally transmissible cancer. *Science*.v. 327, p. 84-87, 2010.
- MURGIA, C., PRITCHARD, K.J., KIM, S., FASSATI, A., WEISS, A.R. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*, v.126,p. 447-87, 2006.
- MURRAY, M.M., JAMES, Z.H., MARTIN, W.B. A study of the cytology and caryotype of the canine transmissible venereal tumor. *Res Vet Sci*, v. 10, p. 565-568, 1969.
- NDIRITU, C.G., MBOGWA, S.W., SAYER, P.D. Extragenitally located transmissible venereal tumor in dogs. *Mod Vet Pract*, v. 58 p. 940-946, 1977.
- NEUPATIMAGEM-UNICAMP web site. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/nptgerminoma3b.html>. Acesso em 18 de outubro de 2011.
- NIELSEN, S.W., KENNEDY, P.C. Tumor of the genital systems: transmissible venereal tumors of the dog. In: MOULTON, J.E., *Tumors in domestic animals*. Berkeley Calif Press, 1990, p. 498-502.
- OGILVIE, G.K.; MOORE, A.S. *Managing the veterinary patient – a practice manual*. New Jersey, Veterinary Learning systems. 1995. p. 415-421.
- OWSTON, M.A, RAMOS-VARA, J.A. Histologic and immunohistochemical characterization of a testicular mixed germ cell sex cord-stromal tumor and a leydig cell tumor in a dog. *Vet. Pathol.* v. 44, n.6, p. 936-943, 2007.
- PATNAIK, A. K., MOSTOFI, F. K. A clinicopathologic, histologic, and immunohistochemical study of mixed germ cell-stromal tumors of the testis in 16 dogs. *Vet. Pathol.* v. 30, p. 287-295, 1993.
- PAPAZOGLU, L.G., KOUTINAS, A.F., PLEVRAKI, A.G., TONTIS, D. Primary intranasal transmissible venereal tumor in the dog: a retrospective study of six cases. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, v. 48, n. 7, p. 391-400, 2001.
- PEREZ, J., DAY, M.J., MOZOS, E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v .64,p.133–47, 1998.
- RAMADINHA, R.R., RAMADINHA, L.S., KUNER, A. Tumor venéreo transmissível canino em cavidade oral sem lesão genital. XV Congresso Brasileiro da Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (Anais), Rio de Janeiro, 1993.

RAMADINHA, R.R., VIANNA, L.F.C.G., RAMADINHA, L.S. Tumor venéreo transmissível com metástases múltiplas: descrição de um caso. Rev Bras Med Vet, v. 145, n. 6, p. 178-180, 1985.

RAMOS-VARA, J. A., KIUPEL, M., BASZLER, T.; BLIVEN, L., BRODERSEN, B., CHELACK, B., CZUB, S., PIERO, F.D., DIAL, S., EHRHART, E.J., GRAHAN, T., MANNING, L., PAULSEN, D., VALLI, V.E., WEST, K. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. J Vet Diagn Invest, v. 20, p. 393-413, 2008.

RAMOS-VARA, J.A. Homepage. Disponível em: <<http://web.ics.purdue.edu/~jramosva/index.htm>> Acesso em 1 de junho 2012.

REBBECK, C.A., THOMAS, R., BREEN, M., LEROI, A.M., BURT, A. Origins and evolution of a transmissible cancer. Evolution. v. 63, p. 2340–2349, 2009.

RODRIGUES, M.G.J., RAMADINHA, R.H.R., PEREIRA, J.T. Tratamento do tumor venéreo transmissível canino com vincristina associada a prednisona. Arquivos da Universidade Rural, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 175-179, 1992.

ROGERS, K.S. Transmissible venereal tumor. Comp Cont Educ for Practicing Veterinaries, v. 19, n. 9, p. 1036-1045, 1997.

SÁNCHEZ-SERVÍN A., MARTÍNEZ S.,CÓRDOVA-ALARCON E., FAJARDO R. TP53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor. J.Vet. Sci., v.10, 4, p.353-5, 2009.

SANDUSKY, G.E., CARLTON, W.W., WIGHTMAN, K.A. Diagnostic Immunohistochemistry of Canine Round Cell Tumors. Vet Pathol., v. 24, p. 495-499, 1987.

SANTOS, F.G.A., VASCONCELOS, A.G., NUNES, J.E.S., CASSALI, G.D., PAIXÃO, T.A., MORO, L. O tumor venéreo transmissível canino – aspectos gerais e abordagens moleculares (revisão de literatura). Biosci. J., v. 21, n. 3, p. 41-53, 2005.

SCOTT, D.W., MILLER, W.H., GRIFFIN, C.E. Muller e Kirk's Small Animal Dermatology. 6 ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 2001. p. 1365-1369.

SELL, A. M., COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. Acta Scientiarum. v. 22(2), p. 297-303, 2000.

SINGH, T.P., PANGAWKAR, G.R. Hemostatic disorders in dogs infected with transmissible venereal tumor. Indian. Vet. J., n 75, p. 879, 1998.

SODRÉ, L.P. Validação de anticorpo monoclonal anti-CD45 obtido in house para utilização em citometria de fluxo e imuno-histoquímica. 2009. Boucatu –S.P. Dissertação Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina de Botucatu, 2009.

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

- TASHBAEVA, R. E., HWANG, D.N., SONG, G.-S., CHOI, N.-H., LEE, J.-H., LYOO, Y.-S., LEE, S.-J., JUNG, D.-I., KIM, H.-Y., SUR J.-H. Endothelium-Associated Antigens in Canine Hepatocellular Carcinoma and Cirrhotic Liver Cellular Characterization of Multidrug Resistance P-glycoprotein, Alpha Fetoprotein, and Neovascular. *Vet Pathol.* v. 44, p.600-606, 2007.
- THRALL, M.A. Diagnostic cytology in clinical oncology. In: WITHROW, S.J., MacEWEN, E.G. *Small animal clinical oncology.* 2nd. ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 2007.
- TRAIL, P.A., YANG, T.J. Canine transmissible venereal sarcoma: quantitation of T-lymphocyte subpopulations during progressive growth and spontaneous tumor regression. *Jpn Natl Cancer Inst,* v. 74, p. 461-467, 1985.
- THEILEN, G.H., MADEWELL, B.R. Clinical applications of cancer chemotherapy. *Veterinary cancer medicine.* 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987. p. 183-196.
- VERMOOTEN, M.I. Canine transmissible venereal tumor (TVT) - a review. *J South African Vet Assoc,* v. 58, p. 147, 1987.
- WEBER, W.T., NOWELL, P.C., HARE, W.C. Chromosome studies of a transplanted and a primary canine venereal sarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.,* v.35, p.537-47, 1965.
- WEBSTER, J. D., YUZBASIYAN-GURKAN, V., MILLER, R. A., KANEENE, J. B., KIUPEL M. The role of c-KIT in tumorigenesis: Evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia.* v. 8, n. 2, p. 104-111, 2006.
- WEBSTER, J. D., YUZBASIYAN-GURKAN, V., MILLER, R. A., KANEENE, J. B., KIUPEL M. Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication. *Vet. Pathol.* v. 44, p.298–308, 2007.
- WELSH, J.S. Contagious cancer. *The Oncologist.* v. 16, p. 1- 4, 2011.
- WHITE, R.A. *Manual of small animal oncology.* British Small Animal Veterinary Assoc ed, Londres, 1991, p. 380.
- WITHROW, S.J., MacEWEN, E.G. *Small animal clinical oncology.* 2nd. ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 2007, p. 87.
- YANG, T.J., PALKER, T.J., HARDING, M.W. Tumor size, leukocyte adherence inhibition and serum levels of tumor antigen in dogs with canine transmissible venereal sarcoma. *Cancer Immunol. Immunother.,* vol. 33, p. 255-262, 1991.

Tabela 22. Resultado da expressão das células tumorais dos TVTCs extragenitais, para cada anticorpo testado

ANTICORPOS	TVTC EXTRAGENITAL 11	Células inflamatórias 11	TVTC EXTRAGENITAL 12	Células inflamatórias 12	TVTC EXTRAGENITAL 13	Células inflamatórias 13	TVTC EXTRAGENITAL 14	Células inflamatórias 14	TVTC EXTRAGENITAL 15	Células inflamatórias 15	TVTC EXTRAGENITAL 16	Células inflamatórias 16	CONTROLES
Lisozima	Não houve marcação nas células tumorais	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Não houve marcação nas células tumorais	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Não houve marcação nas células tumorais	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Não houve marcação nas cels. tumorais	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Não houve marcação nas cels. tumorais	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Não houve marcação nas cels. tumorais	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos - inflamação
Vimentina	Forte marcação citoplasmática das células tumorais	Moderada marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Forte marcação citoplasmática das células tumorais	Moderada marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Forte marcação citoplasmática das células tumorais	Moderada marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Forte marcação citoplasmática das células tumorais	Moderada marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Forte marcação citoplasmática das células tumorais	Moderada marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Forte marcação citoplasmática das células tumorais	Moderada marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Forte marcação citoplasmática das células tumorais - Melanoma amelanótico
CD18	Não houve marcação nas células tumorais	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Não houve marcação nas células tumorais	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Não houve marcação nas células tumorais	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Não houve marcação nas cels. tumorais	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Não houve marcação nas cels. tumorais	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Não houve marcação nas cels. tumorais	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos	Forte marcação citoplasmática de neutrófilos e macrófagos - inflamação granulomatosa
CD117	Forte marcação citoplasmática das células tumorais	Fraca marcação citoplasmática de alguns neutrófilos e macrófagos	Forte marcação citoplasmática das células tumorais	Forte marcação citoplasmática de alguns neutrófilos	Forte marcação citoplasmática das células tumorais	Forte marcação citoplasmática de alguns neutrófilos	Forte marcação citoplasmática das células tumorais	Forte marcação citoplasmática de alguns neutrófilos	Fraca marcação citoplasmática das células tumorais	Não houve marcação de neutrófilos e macrófagos.	Forte marcação citoplasmática das células tumorais	Forte marcação citoplasmática de alguns neutrófilos	Forte marcação de membrana das células tumorais - mastocitoma
CD3	Forte marcação citoplasmática nas células tumorais	Forte marcação de alguns linfócitos	Moderada marcação citoplasmática nas células tumorais	Moderada marcação de linfócitos	Moderada marcação citoplasmática em mais de 90% das células tumorais	Não houve marcação	Moderada marcação citoplasmática de células tumorais	Não houve marcação	Não houve marcação	Não houve marcação	Moderada marcação citoplasmática das células tumorais. Algumas células apresentam forte marcação perinuclear.	Linfócitos infiltrados apresentaram moderada marcação citoplasmática	Forte marcação de membrana em linfócitos T - linfonodo
CD79a	Não houve marcação nas células tumorais	Forte marcação de membrana e citoplasmática de plasmócitos e linfócitos B	Não houve marcação nas células tumorais	Forte marcação de membrana e citoplasmática de plasmócitos e linfócitos B	Não houve marcação nas células tumorais	Não houve marcação em células inflamatórias	Não houve marcação nas cels. tumorais	Forte marcação de membrana e citoplasmática de plasmócitos e linfócitos B	Não houve marcação nas cels. tumorais	Forte marcação de membrana e citoplasmática de plasmócitos e linfócitos B	Não houve marcação nas cels. tumorais	Forte marcação de membrana e citoplasmática de plasmócitos e linfócitos B	Forte marcação citoplasmática e de membrana em linfócitos B - linfonodo
Anti-macrófago	Não houve marcação nas células tumorais	Forte marcação citoplasmática de macrófagos e alguns neutrófilos	Não houve marcação nas células tumorais	Forte marcação citoplasmática de macrófagos e alguns neutrófilos	Não houve marcação nas células tumorais	Forte marcação citoplasmática de macrófagos e alguns neutrófilos	Não houve marcação nas cels. tumorais	Forte marcação citoplasmática de macrófagos e alguns neutrófilos	Não houve marcação nas cels. tumorais	Forte marcação citoplasmática de macrófagos e alguns neutrófilos	Não houve marcação nas cels. tumorais	Forte marcação citoplasmática de macrófagos e alguns neutrófilos	Forte marcação de membrana em macrófagos - inflamação granulomatosa