

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PERFIL DE CITOCINAS PRÓ- E ANTI-INFLAMATÓRIA
E DA PROTEÍNA C-REATIVA NO TRATAMENTO DO
TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Rita Lancini Stumpf

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**PERFIL DE CITOCINAS PRÓ- E ANTI-INFLAMATÓRIA E DA
PROTEÍNA C-REATIVA NO TRATAMENTO DO TUMOR
VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO**

Ana Rita Lancini Stumpf

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Krause

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal De Santa Maria
Centro De Ciências Rurais
Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora baixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PERFIL DE CITOCINAS PRÓ- E ANTI-INFLAMATÓRIAS E DA
PROTEÍNA C-REATIVA NO TRATAMENTO DO TUMOR VENÉREO
TRANSMISSÍVEL CANINO**

elaborada por
Ana Rita Lancini Stumpf

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Alexandre Krause, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Anne Santos do Amaral, Dr^a (UFSM)

Luiz Carlos Rodrigues Junior, Dr (UNIFRA)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2014

Aos meus amores

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Tenho orgulho de dizer que são responsáveis pela minha formação.

Ao meu orientador Prof. Alexandre Krause, pela oportunidade de desenvolver esse projeto sempre auxiliando com correções e comentários pertinentes.

À Dra. Marta Duarte e ao LABIMED pela realização de alguns exames deste estudo.

Às Dras. Cinthia Melazzo Andrade Mazzanti e Sonia dos Anjos Lopes e toda a equipe do Lacvet por abrir as portas de seu local de trabalho para que eu pudesse processar minhas amostras. Agradecimento especial às residentes: vocês sempre fizeram com que me sentisse bem vinda.

A Heloisa Palma e Patrícia Wolkmer, pelo importante auxílio no processamento das amostras. Muito obrigada!

Ao Dr. Cristiano Nunes Nesi, por ter gentilmente auxiliado com as análises estatísticas.

A toda a equipe do Hospital Veterinário Universitário, principalmente as residentes Renata, Clarice e Luciane, obrigada pelo apoio e ajuda, vocês foram fundamentais para que eu buscasse sempre ser melhor no atendimento dos animais.

A todos os estagiários que me ajudaram durante os atendimentos e coletas, principalmente a Cássia, Pati, Bruna e Vanessa. Com vocês a realização deste trabalho foi muito mais divertida.

Aos meus pacientes, Begônia, Sofia, Branca, Bono, Paisano, Flora, Kiki e tantos outros. Vocês são parte fundamental neste trabalho e me motivam a continuar na profissão que escolhi.

Ao Luciano Kruel e Franciele Marconato, por serem sempre tão solícitos e disponibilizarem seus animais para coletas sanguíneas.

A toda a "PATOTA", Raquel, Maurício, Alisson, Hellen, Monique, Desydere, Vanessa, Andressa e Arícia. Vocês fizeram meus dias muito mais felizes. Agradeço à UFSM por ter colocado vocês na minha vida! Contem comigo sempre.

A Carmen, Clarissa e Hellen Hartmann por me receberem de forma tão afetuosa e me fazerem sentir como se fosse da família. Jamais vou esquecer tudo que fizeram por mim. Agradeço especialmente a Hellen, por dividir tantas horas comigo e ter me ajudado tanto. Amiga, você é uma pessoa especial.

A Bianca Bertoletti, a melhor amiga que a pós-graduação me proporcionou. Muito obrigada por estar do meu lado sempre, principalmente nos momentos de crise, proporcionando a "gatiliterapia" diária nos momentos em que o estresse era gigante. Tenho muita sorte de ter te encontrado, vou sentir saudades.

À Dra. Anne Santos do Amaral por dividir seus conhecimentos todos os dias comigo e por estar sempre disposta a ajudar. Ganhei uma amiga pra vida toda.

A Elisabeth, Waldyr, Marcelo e Helena, que me acolheram em sua família. Agradeço por vibrarem comigo a cada conquista e participarem desta etapa tão importante. Vocês são especiais pra mim e servem sempre como inspiração na conquista de meus objetivos.

Ao meu pai João. Você na verdade nunca foi um "pai invisível" e à minha mãe Marília. Obrigada pelas longas conversas com café ao telefone. Vocês são meus maiores ídolos, obrigada por sacrificarem muitas vezes seus desejos para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada por lutarem e vibrarem comigo, por ajudarem a concretizar meus sonhos e principalmente por nunca me deixarem desistir. Amo vocês.

Aos meus irmãos Minéia e Emmanuel e à minha sobrinha Lauren, vocês são os melhores irmãos que poderia desejar. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Amo vocês.

Aos meus bagunceiros, Chico, Nina e Buffy, obrigada pelo carinho e por bagunçarem meus artigos todos os dias.

Ao meu grande amor, amigo, companheiro e confidente, Felipe. Sem você isso jamais teria acontecido. Obrigada por me fazer a mulher mais feliz do mundo todos os dias, com você sinto uma felicidade inexplicável. Ich liebe dich für immer.

A todos vocês meu muito obrigada e minha eterna gratidão.

DAS UTOPIAS

Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!

Mario Quintana

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PERFIL DE CITOCINAS PRÓ- E ANTI-INFLAMATÓRIA E DA PROTEÍNA C-REATIVA NO TRATAMENTO DO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO

AUTORA: ANA RITA LANCINI STUMPF
ORIENTADOR: ALEXANDRE KRAUSE

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2014

O tumor venéreo transmissível canino (TVTc) é um tumor único em vários aspectos, sendo o principal, o fato de as células tumorais não serem originárias do animal acometido. Resultados de pesquisas recentes demonstraram que o TVTc é um tumor transplantável que surgiu em ancestrais do cão doméstico há aproximadamente 10000 anos. As células, que se propagam principalmente pelo coito, se desenvolvem como um enxerto e apresentam a capacidade de se implantar através de mecanismos de escape à resposta imunológica do hospedeiro. Essa resposta envolve a imunidade celular e humoral e varia de acordo com fatores não totalmente elucidados. Além do conhecido papel na resposta imune com o objetivo de combater tumores, a resposta inflamatória desempenha um papel involuntário e paradoxal que resulta na promoção do crescimento tumoral pela liberação de substâncias vasculogênicas, anti-apoptóticas e promotoras de crescimento celular. O fato de que os tumores possam se beneficiar da resposta inflamatória torna necessárias pesquisas visando o desenvolvimento de terapias direcionadas à modulação da resposta inflamatória para o controle do desenvolvimento tumoral. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi compreender melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do tumor através da mensuração dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α e INF- γ) e da anti-inflamatória (IL-10) e de uma proteína de fase aguda da inflamação, a Proteína C-reativa (PCR) durante o tratamento de cães naturalmente infectados pelo TVTc. A quantificação das citocinas e da PCR foi realizada no soro dos animais a partir de amostras obtidas no diagnóstico e pré-terapia, imediatamente antes de cada nova aplicação

quimioterápica e no momento em que o animal era considerado curado. A partir da resposta à quimioterapia foram caracterizados grupos de animais de acordo com os tumores resistentes (R) e não-resistentes (NR). Foi estabelecida a probabilidade de cura em relação ao tempo de terapia, de acordo com o tipo de tumor. No grupo R, foi observada variação significativa em todos os parâmetros, sendo a expressão das citocinas pró-inflamatórias e da PCR, mais elevadas e a expressão da IL-10 inferior em relação à expressão observada em amostras dos animais do grupo NR. No caso das citocinas pró-inflamatórias e da PCR, essa diferença se manteve até a cura dos animais, diferindo da IL-10, cujas concentrações foram similares nos dois grupos ao final do tratamento. A análise estatística realizada detectou a presença de correlações entre as variáveis, demonstrando a participação das citocinas durante o processo de evolução tumoral. O papel da inflamação no desenvolvimento do câncer foi postulado, apesar de os mecanismos moleculares não terem sido elucidados, sabe-se que a inflamação crônica eleva a probabilidade do desenvolvimento de tumores. Pelo fato de o TVTc ser um tumor de células estranhas ao organismo, seu estudo é importante para verificar os mecanismos relacionados com a manutenção e desenvolvimento dos tumores, bem como da resposta imune associada.

Palavras-chaves: IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ , Proteína C-reativa, TVTc

ABSTRACT

Master's Dissertation
Graduate Program in Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria

PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES AND C- REACTIVE PROTEIN PROFILES DURING THE TREATMENT OF CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR

AUTHOR: ANA RITA LANCINI STUMPF
ADVISOR: ALEXANDRE KRAUSE

Santa Maria, February 28th 2014

The canine transmissible venereal tumor (CTVT) is unique in various aspects, and the principal is that the tumoral cells are not originated from the host. Recent findings showed that the CTVT is a transplantable tumor that first appeared in a dog ancestor approximately 10000 years ago. The tumoral cells propagate mainly through coitus, develop as a graft, and have the capability of installing themselves by mechanisms of escape from the host's immunologic response. This specific response involves cellular and humoral immunity and varies according to some factors not yet very elucidated. Beyond the well-known role of fighting the tumor cells, the inflammatory response also plays an involuntary and paradoxical role, which results in the promotion of tumor growth by releasing vasculogenic, antiapoptotic, and cellular growth-promoting substances. The fact that tumors can benefit from the inflammatory response makes the investigation of the mechanisms involved important for the development of new therapies focused on the modulation of the inflammatory response to control the tumor development. The aim of this work is to better understand the mechanisms behind tumoral growth by the measurement of the levels of pro-inflammatory (IL-1, IL-6, TNF- α and INF- γ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines and the C-reactive protein (CRP) over the treatment of dogs naturally infected with CTVT. The quantification of the cytokines and CRP was performed in the animals' serum from samples obtained at the moments of the diagnosis and pre-therapy,

immediately before chemotherapy, and after the confirmation of the cure of each animal. According to therapy response, two groups were identified, R, where the tumor was resistant to therapy and NR, which was susceptible. A cure probability was defined in relation to time of treatment and tumor response to vincristin. In group R all parameters varied significantly: The expression of pro-inflammatory cytokines and CRP were higher, and of IL-10, lower, comparing to group NR. For pro-inflammatory cytokines, this difference was maintained until cure. Statistical analysis was able to detect correlations between all variables, demonstrating the participation of cytokines during tumor evolution. The role of inflammation has been postulated and, although the mechanisms remain unclear, a correlation of chronic inflammation and cancer susceptibility has been demonstrated. Because CTVT is a tumor of foreign cells, it is a suitable model to investigate the mechanisms involved in tumor maintenance and developing, as well as the associated immune response.

Keywords: IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ , C-reactive protein, CTVT.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Formas de apresentação clínica do tumor venéreo transmissível canino: A e C. Localização vulvo-vaginal; B. Tumores cutâneos múltiplos; D. Forma genital localizada no bulbo peniano. 18
- Figura 2 - Citologia de tumor venéreo transmissível canino. Visualiza-se presença de grande número de células redondas, com núcleo redondo, cromatina granular grosseira, nucléolo proeminente e quantidades escassas de citoplasma basofílico (A). Algumas células inflamatórias como neutrófilos (N), linfócitos (L) e plasmócitos (P) podem ser observadas. Coloração: panótico rápido, aumento: 400x..... 20
- Figura 3- Representação esquemática da ativação da resposta imune por citocinas.....27

CAPÍTULO 1

- Figure 1 - Kaplan-Meier curves show the probability of non-cure versus time until cure of the resistant and non resistant animals. Chi-square test with 1% level of significance determined that there is association between the time length of the treatments and the probability of non cure of the animals.59
- Figure 2 - Data fitting to the statistical model. Determination of each concentration profile throughout the CTVT treatment: (a) IL-1, (b) IL-6, (c) TNF- α , (d) INF- γ , and (e) CRP.60
- Figure 3 - Data fitting to the statistical model. Determination of the IL-10 profile throughout the CTVT treatment.61
- Figure 4 - Variables projected in Principal Factors 1 and 2.62

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 - Statistical model parameters.....	55
Table 2 - Means comparison between initial and final concentrations for each variable.....	56
Table 3 - Pearson's coefficient of correlation (r).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

TVTc - Tumor Venéreo Transmissível canino

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

INF- γ - Interferon γ

IL-10 - Interleucina 10

PCR - Proteína C-reativa

IL-8 - Interleucina 8

IL-1Ra - Receptor a de interleucina 1

IL-6R - Receptor de interleucina 6

JAK-1 - Janus Kinase 1

STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription

NF- $\kappa\beta$ - Fator Nuclear kappa beta

ITLs - Linfócitos intratumorais

TGF- β 1- Fator transformador do crescimento β

IL-15 - Interleucina 15

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 CAPÍTULO 1.....	33
Manuscrito.....	34
Abstract.....	35
Introduction.....	36
Material and methods.....	38
Animals.....	38
Experimental design.....	39
Hematological evaluation.....	40
Biochemical Assay.....	40
Blood sampling.....	40
Cytokines.....	40
C-reactive protein.....	41
Statistical analysis.....	41
Results.....	42
Clinical Evolution.....	42
Association between resistance and probability of non-cure.....	43
Serum cytokines and CRP levels.....	43
Comparison between initial and final concentrations of cytokines and CRP.....	44
Correlation analysis between initial cytokine concentration and time of treatment.....	44
Discussion.....	45
Conclusions.....	49
References.....	50
3 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, e se encontram no item “Manuscrito”. As seções “Material e Métodos”, “Resultados”, “Discussão” e “Referências” encontram-se no próprio manuscrito que representa este estudo na íntegra. O item “Conclusões”, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. As referências correspondem somente às citações que aparecem no item “Introdução” desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível canino (TVTc) é uma neoplasia de ocorrência natural que afeta principalmente a genitália externa de caninos machos e fêmeas (HIGGINS, 1966; DAS; DAS, 2000) e que possui distribuição geográfica mundial, tendo sido bem documentado nos cinco continentes, com prevalência nas regiões urbanas e de clima temperado (ROGERS, 1997). O tumor atinge com maior prevalência animais de vida livre, uma vez que estes não são submetidos ao controle reprodutivo (COHEN, 1985). A transmissão do TVTc ocorre através da transplantação de células tumorais viáveis, principalmente nos locais onde ocorrem abrasões ou perda de integridade da superfície das mucosas (COHEN, 1978). O contato prolongado e as características do coito dos cães levam a escoriações da mucosa genital, sendo um excelente meio para que ocorra a transmissão (ROGERS, 1997). Em machos, os tumores são normalmente observados na parte caudal do pênis, glândula e ocasionalmente no prepúcio (DAS; DAS, 2000), enquanto que nas fêmeas o tumor localiza-se tipicamente na vagina, vestibulo e junção vestibulo-vaginal, podendo envolver o orifício uretral. A localização das massas favorece a ocorrência de infecções do trato urinário (MOULTON, 1990). O aspecto macroscópico do TVTc é característico. Inicialmente aparecem pequenas pápulas hiperêmicas que progridem para nódulos, muitas vezes multilobulados, com aspecto de couve flor ou proliferações pedunculadas que podem atingir mais de 10 cm de diâmetro (MACEWEN, 2001). A massa é firme e friável, e a superfície inflama e ulcera com facilidade (MORALES, 1995). Alguns exemplos da apresentação clínica podem ser visualizados na Figura 1.



Figura 1- Formas de apresentação clínica do tumor venéreo transmissível canino: A e C. Localização vulvo-vaginal; B. Tumores cutâneos múltiplos; D. Forma genital localizada no bulbo peniano.

Lesões tumorais extragenitais também podem ser observadas com ou sem presença do tumor na região genital (DAS; DAS, 2000). Essas lesões são frequentemente visualizadas nas cavidades oral e nasal (NDIRITU et al., 1977; PAPAZOGLU et al., 2001), pele (PARK et al., 2006), região anal e mucosa conjuntival (BOSCOS et al., 1998). O envolvimento de locais extragenitais pode estar associado a comportamentos sociais dos cães (DAS; DAS, 2000) e a hipótese de auto-infecção por lambedura não pode ser descartada (NDIRITU et al., 1977; BATAMUZI; BITTEGEKO, 1991).

A suspeita diagnóstica ocorre através dos sinais clínicos, que incluem a presença de secreção genital geralmente sanguinolenta persistente ou intermitente, aumento ou deformação genital, odor anormal, massa visível ou lambedura no local. Com frequência esses sinais podem

estar presentes por períodos acima de um ano (ROGERS, 1997; ROGERS et al., 1998). Apesar de os sinais serem geralmente sugestivos, a confirmação diagnóstica é feita através de citologia esfoliativa, aspiração por agulha fina ou histopatologia, podendo ser realizada também através de imuno-histoquímica. A citologia é o método de escolha por se tratar de uma técnica simples, minimamente invasiva e indolor, além de produzir menor distorção da morfologia celular quando comparadas às amostras de biopsia fixadas em formaldeído (KROGER, 1991; ERUNAL-MARAL et al., 2000).

As características microscópicas do TVTc fizeram com que esse tumor recebesse diversas classificações, tais como sarcoma infeccioso, linfossarcoma infeccioso, granuloma infeccioso e sarcoma de Sticker, em referência ao pesquisador que se aprofundou no estudo deste tumor no início do século XX (COHEN, 1985; ROGERS, 1997). O aspecto citológico do TVTc é de neoplasia de células redondas, ovais ou poliédricas com um grande núcleo centralizado, cromatina condensada, normalmente contêm de um a dois nucléolos proeminentes. O citoplasma é abundante, levemente basofílico e tipicamente vacuolizado (ERUNAL-MARAL et al., 2000). Figuras de mitose e células inflamatórias, plasmócitos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos são observadas com frequência (ROGERS, 1997) (Figura 2).

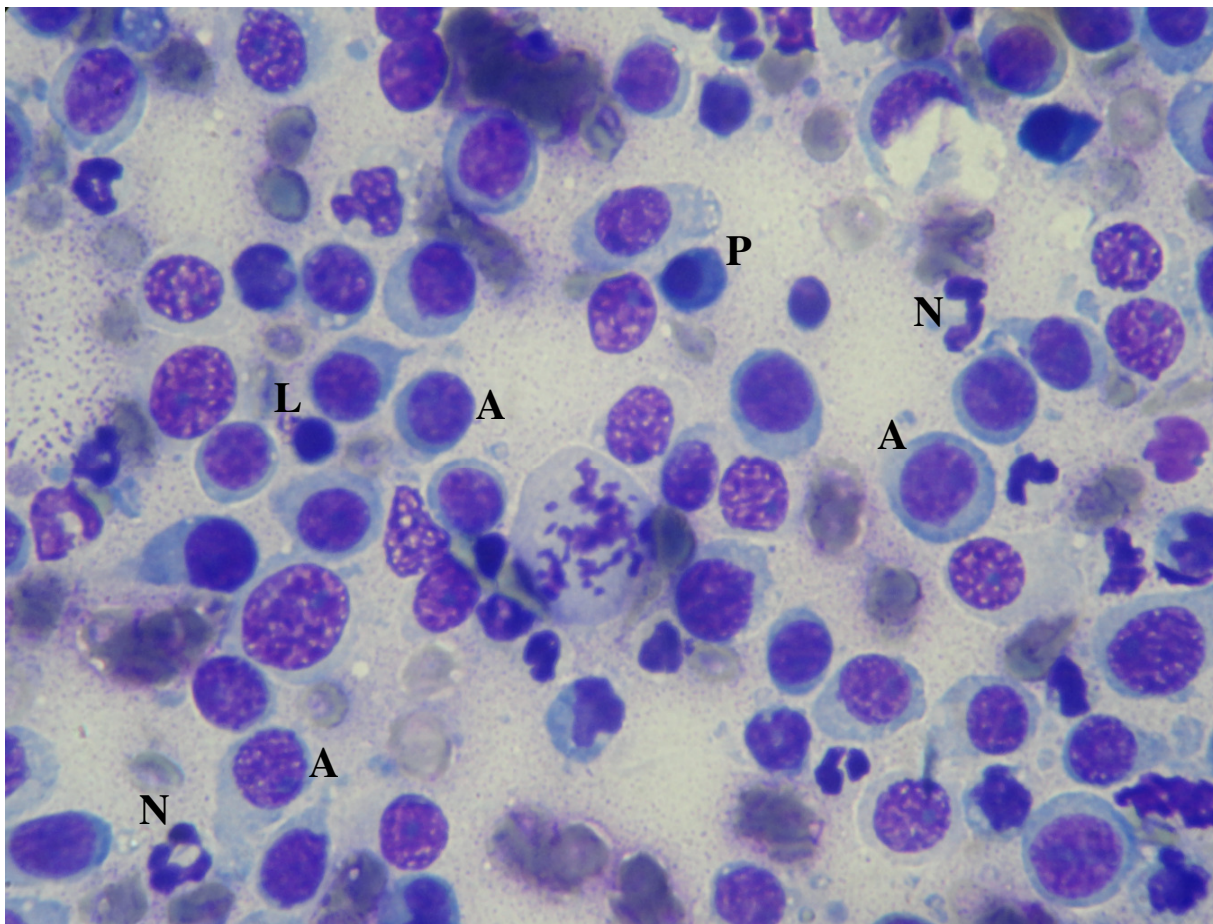


Figura 2 - Citologia de tumor venéreo transmissível canino. Visualiza-se presença de grande número de células redondas, com núcleo redondo, cromatina granular grosseira, nucléolo proeminente e quantidades escassas de citoplasma basofílico (A). Algumas células inflamatórias como neutrófilos (N), linfócitos (L) e plasmócitos (P) podem ser observadas. Coloração: panótico rápido, aumento: 400x.

O TVTc apresenta variações morfológicas e pode ser classificado em linfocitoide, plasmocitoide ou misto. São considerados linfocitoides os tumores com características típicas do TVTc citadas anteriormente e como plasmocitoide, quando há predomínio de células com morfologia ovoide, menor relação núcleo-citoplasma e núcleo localizado excentricamente (AMARAL et al., 2007). As células do TVTc foram caracterizadas por imunohistoquímica e, de acordo com a presença de moléculas de membrana e intracitoplasmáticas, pode-se sugerir a origem mesenquimal, com características histiocíticas devido à presença de vimentina, lisozima, ACM1 (activated macrophage specific antigen 1) e alfa-1-antitripsina. Células de TVTc não apresentam marcação para anticorpos dirigidos contra queratina, desmina, α -actina, CD3, IgG e

IgM, e cadeias leves λ e κ (MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997), características de células epiteliais, musculares, linfócitos e plasmócitos, respectivamente.

O crescimento do tumor ocorre geralmente no local de implantação das células e a estimativa para ocorrência de metástases no TVTc de desenvolvimento natural é de menos de 5% segundo MOULTON (1990), ou de 0-17% segundo ROGERS et al. (1998). Os locais comuns de aparecimento de metástase são linfonodos inguinais e ilíacos (NDIRITU et al., 1977; ROGERS et al., 1998; DAS; DAS, 2000), pele ou tecido subcutâneo (BOSCOS et al., 1998; DAS; DAS, 2000; ALBANESE et al., 2002; PARK et al., 2006). Outros sítios extragenitais também podem apresentar metástase, como fígado e baço (KROGER, 1991), faringe (NDIRITU et al., 1977), cérebro (ADAMS; SLAUGHTER, 1970; FERREIRA et al., 2000), adeno-hipófise (MANNING; MARTIN, 1970), olhos (BOSCOS et al., 1998; FERREIRA et al., 2000; PEREIRA et al., 2000), rins (MANNING; MARTIN, 1970) e músculos (KROGER, 1991). Animais acometidos por esse tumor não costumam apresentar nenhuma alteração em sua condição corporal, mesmo nos casos em que metástases estão presentes (FERREIRA et al., 2000; RODRIGUES et al., 2001).

Com relação às alterações clinicopatológicas, nos casos de TVTc de ocorrência natural, observa-se valores eritrocitários abaixo dos valores de referência (ROGERS, 1997). TINUCCI-COSTA (1994) observou que dos quarenta cães acometidos naturalmente pelo TVTc avaliados, 57% apresentavam valores eritrocitários abaixo dos valores de referência. Dados divergentes foram publicados por COHEN (1985) onde constatou-se policitemia em animais com grande crescimento tumoral após implante experimental, esses animais utilizados possuíam grandes concentrações intratumorais de eritropoietina. Outras alterações como as que se referem às plaquetas, são descritas apenas durante a quimioterapia com aplicação de vincristina, quando a contagem plaquetária tende a se elevar após a primeira aplicação (MACKIN et al., 1995; SHVIDEL et al., 2006). Também durante o tratamento a contagem leucocitária decresce por ação mielossupressora da droga (SOBREIRA et al., 2004).

O tratamento do TVTc é recomendado, uma vez que sua regressão espontânea não é esperada nos casos de infecção natural (ROGERS, 1997). Entre as formas de tratamento descritas estão a remoção cirúrgica, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia (DAS; DAS, 2000). A exérese cirúrgica do tumor foi, durante muito tempo, o tratamento preconizado e, apesar de ser efetiva nos casos de tumores pequenos e localizados, possui taxa de recorrência que pode chegar a 68% dos casos (IDOWU, 1984; ROGERS, 1997). Obter a margem cirúrgica necessária pode

ser difícil nas regiões onde o TVTc normalmente aparece. Durante o procedimento cirúrgico de cães machos, o cuidado deve ser dobrado para que a uretra não seja danificada (DAS; DAS, 2000). O sucesso no uso de criocirurgia para o tratamento de um cão macho com TVTc genital já foi reportado (RICKARDS, 1983). Mais recentemente cinco cães tratados com criocirurgia apresentaram resultados distintos entre si, quando três apresentaram cura enquanto os outros não obtiveram redução completa (GOLOUBEFF; OLIVEIRA, 1999).

A radioterapia é uma técnica efetiva e pode ser utilizada como forma única de tratamento nos casos de tumores solitários ou resistentes à quimioterapia (ROGERS et al., 1998). No entanto, necessita de imobilização química e equipamento especializado (DAS; DAS, 2000). THRALL (1982), utilizando a dosagem de 10 Gy (1000 rad) a cada aplicação, obteve regressão completa com 1-3 aplicações.

De todas as condutas terapêuticas descritas, a quimioterapia é a que promove resultados mais satisfatórios, tendo como característica o baixo custo, a fácil aplicação e a diversidade de protocolos quimioterápicos disponíveis (ROGERS, 1997). Dos diversos quimioterápicos utilizados pode-se citar o uso de sulfato de vincristina, sulfato de vimblastina, cloridrato de doxorrubicina, ciclofosfamida, metotrexato utilizados como agentes únicos ou combinados, demonstrando percentual de cura de 90-95% (ROGERS, 1997; DAS; DAS, 2000). O protocolo mais utilizado no tratamento do TVTc é a aplicação semanal de vincristina de 0,5 – 0,7mg/m² como agente único durante quatro a oito semanas consecutivas, ou até a remissão completa (ERUNAL-MARAL et al., 2000). Em tumores resistentes à vincristina, a droga de escolha deve ser a doxorrubicina (ROGERS, 1997). A imunoterapia tem sido estudada como alternativa aos tratamentos convencionais, mas seus resultados são variáveis. Estudos reportam a aplicação intralesional da vacina BCG (MUKARATIRWA et al., 2009), vacina para parvovírus (YANG, 1987), além do uso de interleucinas (OTTER et al., 1999; HSIAO et al., 2008; LIN et al., 2008; CHOU et al., 2009; CHUANG et al., 2009).

A facilidade intrigante que o TVTc possui de ser facilmente transmitido de um cão para o outro através do contato despertou o interesse de vários pesquisadores com o intuito de desvendar a fisiopatologia do tumor. O TVTc pode ser considerado a linhagem celular mais antiga existente, cuja origem se deu há aproximadamente 10000 anos quando os cães estavam recém sendo domesticados (REBBECK et al., 2011). Além do modo de transmissão natural, o TVTc pode ser induzido em animais adultos ou imunocompetentes através da inoculação experimental de células

tumorais viáveis para os tecidos do hospedeiro. Esta característica, observada por Nowinsky em 1876, gerou inúmeras transformações no que diz respeito aos estudos oncológicos, além de despertar o interesse da comunidade científica (COHEN, 1978; DAS; DAS, 2000). Inicialmente, cogitou-se a possibilidade de envolvimento viral, a exemplo do que ocorre com outros tumores, como o sarcoma aviário, descrito por Rous, em 1911, para o vírus do sarcoma aviário (RSV), ou o linfoma de Burkitt, induzido pelo vírus Epstein-Barr (EBV) (JAVIER; BUTEL, 2008). Para confirmar essa suposição, inóculos de filtrados livres de células foram utilizados na tentativa de expressar este agente oncogênico viral que teoricamente seria o transmissor e causador do tumor. Alguns pesquisadores demonstraram resultados positivos utilizando essa técnica (AJELLO, 1960), mas os métodos utilizados em seus estudos e a impossibilidade de reproduzir os resultados demonstraram a inveracidade dos mesmos (COHEN, 1985). Tentativas de identificação de partículas oncogênicas virais através de microscopia eletrônica também se mostraram infrutíferas (MURRAY et al., 1969; MOULTON, 1990).

A característica transplantável peculiar ao TVT e o fato de não ser identificado agente viral associado, suscitou a hipótese da origem única do tumor, ou seja, que o tumor tenha se desenvolvido em um indivíduo e que, a partir do contato com outros indivíduos, as células tenham adquirido a capacidade de se implantar e proliferar. Com o objetivo de investigar essa hipótese, foram realizados estudos citogenéticos que demonstram que amostras de tumores oriundas de diferentes partes do mundo possuíam cariótipo semelhante: 58 a 59 cromossomos e presença de cromossomos metacêntricos (IDOWU, 1977; MURCHISON, 2009; REBBECK et al., 2009). Esse número difere significativamente do cariótipo normal do cão, formado por 78 cromossomos, onde apenas os sexuais são submetacêntricos e os outros cromossomos, acrocêntricos (OSHIMURA et al., 1973). Essas semelhanças, além de sugerir que os tumores encontrados nessas regiões fossem originários de um mesmo animal, também demonstraram a estabilidade do cariótipo das células tumorais (MURCHISON, 2009).

A partir dessa constatação, através de análise filogenética, MURGIA et al. (2006) conseguiram demonstrar que tumores coletados de cães de diferentes continentes podem ser derivados de um clone neoplásico dividido anteriormente em duas subclasses. Além do cariótipo similar, o rearranjo do proto-oncogene c-MYC como resultado da inserção do elemento de transposição LINE-1 é outra alteração gênica característica do TVTc presente em todos os tumores (CHU et al., 2001; MURGIA et al., 2006). Adicionalmente, estudos imunológicos

demonstraram que todas as amostras de TVTc possuíam moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) canino, o antígeno leucocitário canino, (DLA) diferentes de seus hospedeiros, porém idênticas entre si. Esses autores observaram que todos os tumores compartilham os mesmos alelos nos quatro genes testados (DLA-88, DRB1, DQB1, DQA1), sendo que os mesmos não foram observados nos tecidos dos seus respectivos hospedeiros (MURGIA et al., 2006). Dessa forma, o TVTc é considerado um tumor de origem única, transmitido como aloenxerto e que se comporta como uma célula infecciosa com capacidade de se desenvolver de forma autônoma em seu hospedeiro (DINGLI; NOWAK, 2006)

A evolução clínica do TVTc induzido experimentalmente foi caracterizada por HSIAO et al. (2002) em diferentes estágios: progressão, estabilização e regressão. Esses estágios são diretamente influenciados pela capacidade de resposta imunológica do hospedeiro, que pode ser mais bem observada quando as células são implantadas experimentalmente e exibem um padrão de desenvolvimento previsível (CHU et al., 2001). A transição da fase progressiva para a regressiva do TVTc é marcada pelo aumento de infiltrados celulares (CHU et al., 2001; HSIAO et al., 2002; MUKARATIRWA; GRUYS, 2004). Em tumores induzidos experimentalmente, a resposta humoral e celular e o desenvolvimento de imunidade em indivíduos imunologicamente competentes é que previne a infecção por TVTc (PALKER; YANG, 1981; FENTON; YANG, 1988).

A inflamação é uma resposta de defesa produzida pelo corpo do hospedeiro que sofreu injúria tecidual, normalmente causada por infecções microbianas e virais ou por outros estímulos nocivos, como exposição à alergênicos, radiação, substâncias químicas tóxicas, doenças autoimunes ou crônicas, obesidade e consumo de álcool, tabaco e dietas com altas quantidades de calorias (SCHETTER et al., 2010). Durante a inflamação a migração celular aumenta no local que sofreu injúria e diminui no momento em que o reparo tecidual é concluído. Células em crescimento estão mais propensas a sofrer danos ao DNA e ambientes em que ocorrem altas taxas de proliferação celular propiciam agressões mutagênicas. Além disso, nos microambientes ricos em células inflamatórias são liberados fatores estimuladores de crescimento. Dessa forma, pode-se considerar que o desenvolvimento de tumores causa desequilíbrio na capacidade de reparação tecidual, fazendo com que o tumor pareça uma lesão que não cura (DVORAK, 1986).

A primeira correlação estabelecida entre a resposta inflamatória e as neoplasias foi a observação de infiltrados de leucócitos nos tumores. Atualmente, a interação entre o tumor e

células inflamatórias no microambiente tumoral, através da comunicação mediada por moléculas de superfície e citocinas tem papel reconhecido no desenvolvimento do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Vários tipos de células inflamatórias do sistema imune, células do estroma do hospedeiro e células do tumor liberam grande número de mediadores pró-inflamatórios que acabam por acelerar a invasão tumoral e a ocorrência de metástases (KUNDU; SURH, 2012). A inflamação ocasionada por envolvimento destas células permite que a maioria, senão todos os processos celulares relacionados à tumorigênese ocorram (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Citocinas são proteínas solúveis, de baixo peso molecular, mediadoras da duração e da intensidade da resposta imune, sendo produzidas em resposta a estímulos diferentes (TIZARD, 2009). São moléculas envolvidas em quase todos os processos biológicos importantes, desde a proliferação celular até o envolvimento no processo inflamatório, imunidade, migração, fibrose, reparação e angiogênese (VILČEK; FELDMANN, 2004). Na medicina, são consideradas agentes terapêuticos importantes em doenças do sistema imune e inflamatórias e vêm sendo utilizadas em muitos estudos com animais para estimular ou inibir a inflamação, imunidade e hematopoiese (ABBAS; LICHTMAN, 2004). Possuem propriedades como secreção breve e autolimitante, ligam-se a receptores de membrana específicos de outras células, exercem um efeito autócrino, parácrino ou endócrino, podem ser pleiotrópicas (agem em diferentes tipos celulares), redundantes (diferentes citocinas possuem mesmas funções) e influenciam na síntese e ação de outras interleucinas (ABBAS; LICHTMAN, 2005; TIZARD, 2009). Diferentes células são responsáveis pela síntese de citocinas, no entanto, são os macrófagos ativados os principais responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon γ (INF- γ). A interleucina 10 (IL-10), por sua vez, é considerada uma citocina anti-inflamatória que exerce papel contrário, e age como inibidora da resposta imune, principalmente em respostas que envolvem macrófagos (TIZARD, 2009).

O TNF- α é o primeiro mediador inflamatório a ser produzido em resposta às infecções, sendo considerado mediador primário do sistema imune inato e crucial para induzir proteção local (ULLOA; TRACEY, 2005). Quantidades mínimas de TNF- α contribuem para a defesa do hospedeiro e, quando a produção é excessiva e prolongada, o TNF- α torna-se deletério ao organismo (NETEA et al., 2003), causando desregulação da resposta imune e induzindo a ativação de outras citocinas, bem como do sistema oxidativo celular, os quais promovem

inflamação e lesão tecidual potencialmente letais (TRACEY, 2002; ULLOA; TRACEY, 2005). A produção de IL-1 e IL-6 ocorre logo em seguida à do TNF- α , já no início do processo inflamatório. É o aumento local de TNF- α o responsável pelos sinais cardeais da inflamação, incluindo calor, tumor, dor e rubor. Ele age sobre os neutrófilos, aumentando sua habilidade em destruir microrganismos, ativa mastócitos, amplifica e prolonga a inflamação, além de estimular a fagocitose e a produção de oxidantes. Por fim, o TNF- α pode destruir algumas células tumorais ou infectadas por vírus, ativando as caspases e induzindo a apoptose (TIZARD, 2009). A IL-1 possui função similar à do TNF- α (CUNNEEN; CARTWRIGHT, 2004), pois induz a resposta inflamatória sistêmica em resposta a um agravo inicial (LOISA et al., 2003), agindo sinergicamente com o TNF- α nesse processo (DEL VECCHIO et al., 2004). Esse sinergismo é responsável pelo aparecimento de sinais típicos de doença, como febre, letargia, mal-estar e falta de apetite (TIZARD, 2009). A IL-6 é considerada importante marcador da resposta inflamatória sistêmica, pois nas infecções alcança rapidamente picos de concentração sérica, caracterizando-se como citocina “de alarme” da infecção (CASEY, 2000). A IL-6 é a principal indutora da síntese da proteína C-reativa (PCR) pelos hepatócitos, sendo ainda capaz de ativar células T e atrair neutrófilos aos sítios de infecção (CUNNEEN; CARTWRIGHT, 2004). INF- γ é uma importante citocina produzida primariamente por células Th1, mas também pode ter sua produção estimulada por células NK e, por esse motivo, o INF- γ possui funções tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Entre suas várias funções, podem ser citadas a ativação de células endoteliais, estimulação na atividade das células NK, indução de MHC I e II, diferenciação de linfócitos B, ativação de linfócitos T e de macrófagos, entre outros (ABBAS; LICHTMAN, 2004;2005) (Figura 3).

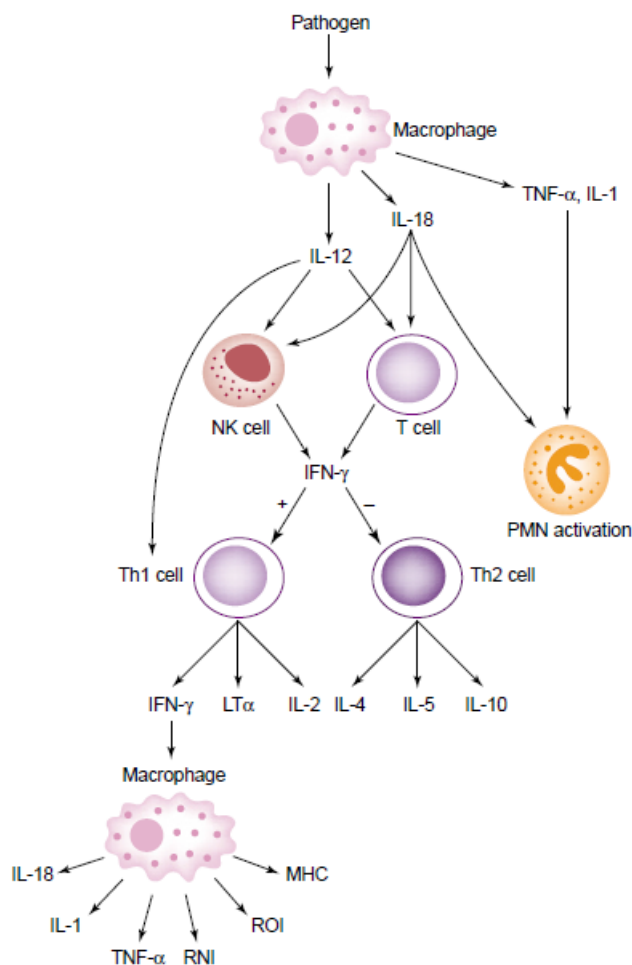


Figura 3 – Representação esquemática da ativação da resposta imune por citocinas. Fonte: NETEA et al.(2003).

Células dendríticas (CD), assim como macrófagos são células sentinelas da imunidade inata e excelentes apresentadoras de antígenos (TIZARD, 2009), estão presentes em quase todos os locais de entrada dos antígenos e processam antígenos tumorais de forma que sua apresentação ao MHC I e II seja facilitada (ONISHI et al., 2004; TOURKOVA et al., 2005). As CD expressão altos níveis de moléculas estimuladoras da inflamação produzindo grande variedade de citocinas e quimiocinas (NIMURA et al., 2006). O processamento do antígeno e a presença dos fatores estimuladores acaba promovendo o estímulo necessário para a resposta imune inata e adaptativa (TIZARD, 2009). A indução de apoptose das CD por fatores derivados do tumor são reportados em alguns estudos com o sistema humanos e murinos (HIRANO et al., 1997; HARIZI et al., 2002) está atividade parece ser um mecanismo chave para que as células tumorais escapem ao

reconhecimento imunológico (HIRANO et al., 1997). O TVTC parece debilitar a diferenciação das CD inibindo o reconhecimento do antígeno e sua apresentação causando apoptose de monócitos e CD (LIU et al., 2008).

No papel de inibir as citocinas pró-inflamatórias está a IL-10, principal citocina contra reguladora da resposta imune inata (OBERHOLZER et al., 2002). Atua como citocina anti-inflamatória e age por *feedback* negativo, ou seja, inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias (CASEY, 2000). Elevadas concentrações de IL-10 reduzem a produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 pelos monócitos, enquanto ativam (por *feedback* positivo) a produção de IL-1Ra (HOWARD; O'GARRA, 1992). A supressão de IL-10 resulta em aumento dos níveis séricos circulantes de TNF- α e IL-6, o que sugere que esta citocina possua grande poder anti-inflamatório (CUNNEEN; CARTWRIGHT, 2004). OBERHOLZER et al. (2002) sugeriram que a magnitude da resposta da IL-10 parece correlacionar-se com a gravidade do processo inflamatório e a concentração de citocinas pró-inflamatórias com a ativação do TNF- α . Existe, de fato, um mecanismo homeostático que envolve a IL-10 e as citocinas pró-inflamatórias. Enquanto o TNF- α e outras citocinas estimulam a síntese de IL-10, na vigência de estímulo inflamatório, esta bloqueia a síntese de TNF- α de forma diretamente proporcional à resolução do processo inflamatório, levando à normalização dos níveis séricos das citocinas (BORISH; STEINKE, 2003) e restaurando a homeostase (BONE et al., 1997).

Estudos sugerem que a resposta aguda iniciada pelos leucócitos infiltrados tumorais, acaba por não exercer normalmente seus mecanismos imunológicos capazes de conduzir a erradicação do desenvolvimento do tumor. Ao contrário, produzem mediadores pró-inflamatórios de forma excessiva e crônica contribuindo para a promoção e progressão tumoral, seja por estímulos proliferativos diretos às células tumorais, seja pela liberação de substâncias vasculogênicas que irão proporcionar melhores condições de desenvolvimento tumoral pelo incremento no aporte sanguíneo ao local (BERGMAN, 2009). As interleucinas e o TNF- α são exemplos de citocinas associadas à carcinogênese (TSELEPIS et al., 2002; LIN; KARIN, 2007). Sabe-se até o momento que a IL-6 liga-se ao seu receptor (IL-6R), resultando na ativação do gene Janus Kinase 1 (JAK-1) e conseqüentemente na fosforilação e dimerização do Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT), particularmente o STAT3, um fator de transcrição que regula a ativação dos genes envolvidos na proliferação celular, inflamação e angiogênese (KUNDU; SURH, 2012). O STAT já foi relacionado à tumorigênese em muitos tecidos e está

relacionado aos processos inflamatórios de tumores gástricos, fígado, cólon, pâncreas e pulmão (GAO et al., 2007; GRIVENNIKOV et al., 2009; LESINA et al., 2011). Níveis de IL-1 também aparecem aumentados em muitos tumores, onde a IL-1 β faz o papel de promover o crescimento tumoral enquanto a IL-1 α promove imunidade anti-tumoral (APTE; VORONOV, 2002). O mesmo ocorre com o TNF- α , também presente em vários cânceres humanos como o câncer de mama, próstata, bexiga, linfoma e leucemias (BURKE et al., 1996; BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Todos esses mediadores promovem estímulo inflamatório que ativa a via do Fator Nuclear kappa B (NF- $\kappa\beta$), resultando na expressão dos genes pró-inflamatórios, proliferativos e anti-apoptóticos (KUNDU; SURH, 2012; ELINAV et al., 2013).

Além da resposta inflamatória mediada pelas interleucinas já discutidas anteriormente, ocorre uma reação complexa e inespecífica chamada de “resposta de fase aguda”, que se desenvolve rapidamente após qualquer injúria tecidual. A origem desta resposta pode ser atribuída a causas infecciosas, imunológicas, neoplásicas, traumáticas ou outras, e o seu propósito é restaurar a homeostase e remover a causa do desequilíbrio (CERON et al., 2005). A maioria das proteínas de resposta de fase aguda é formada por glicoproteínas sintetizadas, principalmente por hepatócitos (JAIN, 1989), e sua produção é mediada por citocinas pró-inflamatórias, das quais as mais importantes são as interleucinas (IL-6, IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (CERON et al., 2005). Após o estímulo gerado pelas citocinas, principalmente as interleucinas IL-1, IL-6 e o TNF- α , liberadas por células de defesa, o fígado sintetiza e libera a maioria das proteínas de fase aguda, o que resulta em seu aumento na corrente sanguínea (PETERSEN et al., 2004). A resposta de fase aguda é muito rápida e antecede ao estímulo do sistema imune e, em muitos casos, o surgimento dos sinais clínicos (CERON et al., 2005). Dependendo da espécie animal, as proteínas de fase aguda são consideradas indicadores fiéis da resposta sistêmica frente aos processos inflamatórios e infecciosos, quando comparadas a outras variáveis, tais como febre, aumento na taxa de hemossedimentação e/ou presença de leucocitose associados à neutrofilia (WEISS; WARDROP, 2010). Apesar da falta de especificidade dessas proteínas, que pode representar limitação significativa, sua determinação oferece vantagens do ponto de vista diagnóstico, uma vez que o aumento dessas proteínas significa que o organismo está combatendo um evento potencialmente perigoso. As altas concentrações dessas proteínas, embora não nos ajudem a compreender qual patógeno está (ou estava) presente, demonstram que o organismo ainda está lutando contra o microrganismo (PALTRINIERI, 2007).

Tumores são frequentemente infiltrados por linfócitos T e células natural killer (NK) (BURNET, 1970) cujo papel depende do nível de expressão do MHC na superfície das células tumorais (MUKARATIRWA; GRUYS, 2004). Dessa forma, a eliminação das células tumorais por mecanismos imunológicos é também determinada pela resposta inflamatória por elas desencadeada. Os tumores fortemente imunogênicos induzem potentes respostas mediadas por linfócitos T após seu processamento por células dendríticas. Já os fracamente imunogênicos tendem a crescer como nódulos isolados que podem não ser suficientes para desencadear respostas imunológicas eficazes (TIZARD, 2009). Os antígenos do MHC funcionam como marcadores celulares que sinalizam para os linfócitos T citotóxicos (MHC I) e linfócitos T *helper* (MHC II) e são indispensáveis para a apresentação de antígenos para as células T citotóxicas (ZINKERNAGEL; DOHERTY, 1979). A ausência de antígenos do MHC pode levar ao não reconhecimento dessas células tumorais pelo sistema imune (MUKARATIRWA; GRUYS, 2004). Tanto o MHC I quanto o MHC II não são expressos durante a fase de crescimento progressiva do TVTc (HSIAO et al., 2002; MURGIA et al., 2006), e o mecanismo que permite a não expressão de MHC pelo TVTc durante toda sua fase progressiva e o aumento da sua expressão na fase regressiva do tumor ainda não foram explicadas (HSIAO et al., 2002). Certos tumores humanos, como os de pele e os carcinomas cervicais, também apresentam baixos ou indetectáveis níveis de MHC I, sugerindo um mecanismo de escape à vigilância imunológica (HOLDEN et al., 1983; CONNOR; STERN, 1990).

Células de TVTc podem ser induzidas a expressar MHC quando expostas ao sobrenadante da cultura celular de TVTc que encontram-se na fase regressiva e linfócitos intratumorais (ITLs), mas não por células da fase progressiva e ITLs (HSIAO et al., 2002). A transição da fase progressiva para a regressiva do TVTc pode ser desencadeada através da indução da expressão de MHC, causado por citocinas através de ITLs (MURCHISON, 2009).

Enquanto linfócitos T citotóxicos reconhecem apenas antígenos tumorais apresentados por MHC I, as células NK são citotóxicas para as células tumorais que não expressam MHC I. Portanto, a perda da expressão de MHC I ativa as células NK, proporcionando a destruição das células tumorais. Esse mecanismo não é eficiente quando se trata da resposta ao TVTc e a razão para isso ainda não está esclarecida completamente (PORGADOR et al., 1997; MUKARATIRWA; GRUYS, 2004). Uma explicação possível para o fato seria a produção do fator transformador do crescimento beta (TGF- β 1) pelas células tumorais. Essa citocina parece

inibir a atividade das células NK, bem como a citotoxicidade dos ITLs. O efeito supressivo de TGF- β 1 sobre as células NK pode ser antagonizado pela citocina pró-inflamatória IL-6, que é secretada pelos ITLs (HSIAO et al., 2004).

Em conjunto com a IL-6 para induzir a expressão do MHC estão o IFN- γ (HSIAO et al., 2008) e a IL-15 (CHOU et al., 2009). Acredita-se que, uma vez que um determinado limite de IL-6 secretado por ITLs é alcançado, ocorre a supressão de TGF- β 1 nas ITLs e o aumento da atividade de IFN- γ , permitindo que as ITLs induzam a expressão de MHC I e II nas células de TVTc, iniciando a regressão (HSIAO et al., 2004; HSIAO et al., 2008).

A resposta imunológica ao TVTc é de vital importância, pois pode determinar a inibição ou o crescimento tumoral no indivíduo. A regressão completa do tumor ocorre no momento em que a resposta imune contra o TVTc torna-se eficaz (COHEN, 1978). A implantação do TVTc de forma experimental em caninos imunologicamente comprometidos, como filhotes recém-nascidos (YANG; JONES, 1973) ou caninos irradiados (COHEN, 1973), resultou na progressão contínua desse tumor e no aparecimento de metástases, enquanto que cães recuperados apresentavam imunidade contra a re-infecção (POWERS, 1968). Por isso, filhotes nascidos de mães já expostas ao TVTc são menos susceptíveis à doença (YANG; JONES, 1973).

A presença de um antígeno associado ao TVTc foi confirmada através de microscopia imunoeletrônica durante todos os estágios de desenvolvimento tumoral através da utilização de anticorpos contra o antígeno tumoral (HILL; YANG, 1985). Este antígeno pode ser detectado durante toda a fase de crescimento tumoral, sendo que sua concentração no soro aumenta proporcionalmente ao volume do tumor, não sendo mais encontrado em até 72 horas após a remoção cirúrgica do tumor (YANG et al., 1991).

A presença de imunidade em filhotes nascidos de mães que possuem ou já possuíram o TVTc e a incapacidade de reinfecção nos cães já curados são dois exemplos já citados anteriormente que confirmam a importância da imunidade humoral nos casos de TVTc. Adicionalmente, infiltrados inflamatórios intra- e peritumorais na fase de regressão apresentam maiores quantidades de linfócitos B e plasmócitos que tumores em fase progressiva (PEREZ et al., 1998). A presença de maior quantidade de anticorpos ligados à membrana nas fases de estabilização e regressão do tumor e sua menor presença na fase progressiva (FENTON; YANG, 1988) também sugere uma importante participação da resposta imune humoral na progressão do TVTc.

Além da participação do sistema imune através da imunidade celular e humoral na tentativa de inibir o crescimento e eliminar células tumorais, a resposta inflamatória desempenha um papel paradoxal, uma vez que também pode beneficiar o desenvolvimento dos tumores através da liberação de citocinas vasculogênicas, anti-apoptóticas e proliferativas. Dessa forma, estudos com o objetivo de elucidar a participação de citocinas na fisiopatologia dos tumores podem contribuir no desenvolvimento de protocolos terapêuticos mais eficientes (MUKARATIRWA; GRUYS, 2004).

Desta forma, a resposta imune e anti-inflamatória pode ter papel chave na modulação do TVT, pois a resposta a neoplasia está diretamente relacionada a um evento imune com componentes da imunidade inata e adquirida. Por essa razão este trabalho objetivou a busca de uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do TVTc, através da mensuração dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e PCR ao longo do tratamento de caninos naturalmente infectados pelo TVTc e atendidos na rotina do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal de Santa Maria (HVU-UFSM).

2 CAPÍTULO I

MANUSCRITO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo científico, com sua formatação de acordo com as orientações da revista a que será submetido:

Pro- and anti-inflammatory cytokines and C-reactive protein profiles during the treatment of canine transmissible venereal tumor

Autores: Ana Rita Lancini Stumpf, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Heloisa Einloft Palma, Cristiano Nunes Nesi, Cinthia Melazzo Andrade Mazzanti, Anne Santos do Amaral, Alexandre Krause

De acordo com normas para publicação em: *Veterinary Immunology and Immunophatology*.

1 **Pro- and anti-inflammatory cytokines and C-reactive protein profiles during the**
2 **treatment of canine transmissible venereal tumor**

3
4
5 Ana Rita Lancini Stumpf^{a*}, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^b, Heloisa Einloft
6 Palma^a, Cristiano Nunes Nesi^c, Cinthia Melazzo Andrade Mazzanti^a, Anne Santos do Amaral^a,
7 Alexandre Krause^{a*}

8
9
10
11 ^a Department of Small Animals Clinics, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.
12 Address: Avenida Roraima nº 1000, Campus Universitário, Hospital Veterinário, Sala 103,
13 97105-900, Santa Maria – RS, Brasil. Fax: +55 55 3220 8958.

14 ^bUniversidade Luterana do Brasil, Brazil. Address: BR 287, Km 252, Trevo Maneco
15 Pedroso, Boca do Monte, Cx. Postal 21834, 97020-001 Santa Maria - RS, Brasil. Fax: +55 55
16 32142333.

17 ^cUniversidade do Oeste de Santa Catarina, Brazil. Address: Avenida Nereu Ramos, 3777-
18 D, Seminário, 89813-000, Chapecó – SC, Brasil. Fax: +55 49 3319-2600.

19
20 * Correspondence and reprints. Address: Departamento de Pequenos Animais da UFSM. Faixa
21 de Camobi - Km 9, Campus Universitário, 97105-900, Hospital Veterinário, Sala 103, Santa
22 Maria – RS, Brasil. Fax: +55 55 3220 8958.

23 E-mail address: alexandrekrause@ufsm.br; analancini@yahoo.com.br.

24
25
26
27
28
29
30
31

1 **Abstract**

2 The canine transmissible venereal tumor (CTVT) is unique in various aspects, and the
3 principal is that the tumoral cells are not originated from the host. Recent findings showed that
4 the CTVT is a transplantable tumor that first appeared in a dog ancestor approximately 10000
5 years ago. The tumoral cells propagate mainly through coitus, develop as a graft, and have the
6 capability of installing themselves by mechanisms of escape from the host's immunologic
7 response. This specific response involves cellular and humoral immunity and varies according to
8 some factors not yet very elucidated. Beyond the well-known role of fighting the tumor cells, the
9 inflammatory response also plays an involuntary and paradoxical role, which results in the
10 promotion of tumor growth by releasing vasculogenic, antiapoptotic, and cellular growth-
11 promoting substances. The fact that tumors can benefit from the inflammatory response makes
12 the investigation of the mechanisms involved important for the development of new therapies
13 focused on the modulation of the inflammatory response to control the tumor development. The
14 aim of this work was to better understand the mechanisms behind tumoral growth by the
15 measurement of the levels of pro-inflammatory (IL-1, IL-6, TNF- α and INF- γ) and anti-
16 inflammatory (IL-10) cytokines and the C-reactive protein (CRP) over the treatment of dogs
17 naturally infected with CTVT. The quantification of the cytokines and CRP was performed in the
18 animals' serum from samples obtained at the moments of the diagnosis and pre-therapy,
19 immediately before chemotherapy, and after the confirmation of the cure of each animal.
20 According to therapy response, two groups were identified, R, where the tumor was resistant to
21 therapy and NR, which was susceptible. A cure probability was defined in relation to time of
22 treatment and tumor response to vincristin. In group R all parameters varied significantly: The
23 expression of pro-inflammatory cytokines and CRP were higher, and of IL-10, lower, comparing
24 to group NR. For pro-inflammatory cytokines, this difference was maintained until cure.

1 Statistical analysis was able to detect correlations between all variables, demonstrating the
2 participation of cytokines during tumor evolution. The role of inflammation has been postulated
3 and, although the mechanisms remain unclear, a correlation of chronic inflammation and cancer
4 susceptibility has been demonstrated. Because CTVT is a tumor of foreign cells, it is a useful
5 model to investigate the mechanisms involved in tumor maintenance and developing, as well as
6 the associated immune response.

7

8 **Keywords:** IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ , C-reactive protein, CTVT

9

10 **1. Introduction**

11 The canine transmissible venereal tumor (CTVT) is characterized as a natural occurring
12 neoplasm that affects the external genital organs of males and females, although in some cases it
13 can be found in extra-genital sites as well (Higgins, 1966; Das and Das, 2000). The CTVT is well
14 documented over the five continents, giving to this tumor a status of worldwide occurrence
15 (Cohen, 1985; Murgia et al., 2006).

16 The transmission occurs by the transplantation of viable tumor cells from dog to dog,
17 especially in regions of pronounced abrasion with loss of integrity of the mucosal surface (Cohen,
18 1978). CTVT is considered a tumor which first developed in dogs or wolves around 200 and 2500
19 years ago and since then it has been transmitted as an allograft. The cells behave as infectious
20 cancer cells, capable of growing autonomously from the host (Dingli and Nowak, 2006). The
21 easiness by which the CTVT is transplanted between individuals has long intrigued researchers in
22 understanding the tumor's physiopathology.

23 This tumor induces an immune response, which is crucial to define the fate of the tumor
24 in the body: inhibition of the tumor growth or its spread to other organs. Hsiao et al. (2002)

1 defined in experimentally induced tumors different growth stages of the CTVT: Progression (P),
2 Stasis (S) and Regression (R). After the lack of response by the immune system, which coincides
3 with the P stage, antigens are expressed on the CTVT cells surface, and the immune response
4 leads to the complete regression of the tumor (Mukaratirwa and Gruys, 2004). The role of the
5 immune response in the clinical evolution of the CTVT points to important functions of
6 cytokines. These proteins can modulate microenvironmental changes which would lead to tumor
7 growth or regression (Hsiao et al., 2008; Lin et al., 2008; Chou et al., 2009; Pai et al., 2011). The
8 investigation of the role played by cytokines and growth factors produced by the intratumoral
9 lymphocytes (ITLs), tumor cells or other inflammatory cells can contribute to better understand
10 the mechanisms involved in tumorigenesis and also the development of new therapies for cancer
11 (Mukaratirwa and Gruys, 2004).

12 Several types of inflammatory cells, cells from the host stroma, and cancer cells from the
13 tumoral microenvironment release high levels of pro-inflammatory mediators that end up
14 speeding up the tumoral invasion and the occurrence of metastases (Kundu and Surh, 2012). The
15 inflammation caused by the activation of these cells triggers most of (if not all) the cellular
16 processes needed for tumorigenesis (Hanahan and Weinberg, 2011). Among the inflammatory
17 mediators, some cytokines act as stimulus, aggravation, or even in the attenuation of the
18 inflammatory response. Interleukins and TNF- α are examples of cytokines associated with
19 carcinogenesis (Lin and Karin, 2007; Tselepis et al., 2002). In addition to these cytokines, during
20 the inflammatory response, the liver produces a set of proteins in response to the cytokines IL-1,
21 TNF- α and IL-6 released by the inflammatory cells (Paltrinieri, 2007; Tizard, 2009). These
22 proteins whose plasmatic concentration increase over the inflammatory process are denominated
23 Acute-phase Proteins (APP). This group comprises, for instance, the C-reactive Protein (CRP)

1 that, as the other proteins plays an important role in the defense of the organism (Murata et al.,
2 2004).

3 The mechanisms involved in CTVT are very relevant to investigate the role of
4 inflammation in tumor growth and allograft implantation, since the implanted cells are already
5 transformed and its development in the host depends on the immune response as well as the cross-
6 talk between tumoral cells and the host microenvironment. The levels of inflammatory cytokines
7 during the tumor stages could be related to properties of the tumor in inducing the response and
8 to the host ability in fighting the cellular infection. Since some dogs are not able to spontaneously
9 heal, we pursued to investigate whether this inability could be related to different cytokine
10 response patterns, making these dogs behave as “bad therapy responders”.

11 The aim of this study was to investigate the mechanisms involved in the development of
12 the CTVT by the measurement of pro- and anti-inflammatory cytokines and the CRP levels
13 during the clinical evolution of dogs naturally infected with CTVT and treated with conventional
14 chemotherapy.

15

16 **2. Material and Methods**

17 2.1 Animals

18 Thirty three dogs, of which eighteen were diagnosed for CTVT and fifteen were used as
19 the control group were selected, with no restriction of breed, age or sex, which got admitted at the
20 Veterinary Teaching Hospital of the Universidade Federal de Santa Maria. Before the dogs were
21 enrolled in the study, the owners were asked to participate and signed an Informed Consent for
22 Participation in Health Research.

1 This study protocol was approved by the Animal Welfare Committee of the Federal
2 University of Santa Maria, number 044/2013, in accordance to Brazilian laws and ethical
3 principles published by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA).

4

5 2.2 Experimental design

6 The exclusion criteria were previous treatment with any drugs or other concurrent illness.
7 In order to assess the overall health status of the dogs, clinical examination, complete blood
8 count, and biochemical profile were performed.

9 The CTVT diagnoses were made based on cytological examination of samples obtained
10 by fine-needle aspiration, brushing or imprinting. Smears were air-dried and stained with Diff-
11 Quick stain, and the tumor cells were identified by optical microscopy visualization.

12 Chemotherapy protocols were performed to the animals infected with CTVT initially
13 using vincristine 0.65 mg/m² i.v. every seven days up to a total of three to eight applications,
14 depending on the animals' clinical evolution. After four vincristine applications, in those cases
15 where the tumors did not show volume change, volume increase or volume reduction superior
16 than 50%, or when new neoplastic sites were developed, the chemotherapeutic was replaced by
17 doxorubicin 30 mg/m² i.v. every 21 days until the cure or when the drug's toxic dosage was
18 reached.

19 It was essential for the chemotherapeutic treatment that the animals were subjected to a
20 complete blood count and biochemical profile on a weekly basis. For that purpose, blood samples
21 were collected always at the beginning of the treatment as well as immediately before each
22 chemotherapeutic application.

23 The animals in the control group were not subjected to any treatment.

24

1 2.3 Hematological evaluation

2 Complete blood counts were performed using an automated cell counter (Vet Auto
3 Hematology Analyzer®, model BC 2800). The packed cell volume was obtained by
4 centrifugation using a microcentrifuge (Sigma) at 14,000 rpm for 6 minutes. For morphological
5 evaluation of the blood and differential count of white blood cell, the blood smears were first
6 stained using a Diff-Quick commercial kit and subsequently visualized under the microscope.

7

8 2.4 Biochemical Assay

9 The activities of the serum enzymes alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase,
10 blood urea nitrogen, creatinine and the levels of albumina were determined using standard
11 commercial kits (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brazil) in a semi-automated
12 spectrophotometer BioPlus (Bio-2000).

13

14 2.5 Blood sampling

15 For each animal, except for the control group (which had their blood tested only once),
16 blood samples were collected prior to their treatment as well as immediately before each
17 chemotherapeutic application. Each sample consisted in 6 ml of blood collected from the jugular
18 vein, of which 1 ml was stored in tubes containing EDTA 10% and the remaining 5 ml were
19 stored in tubes without anticoagulant, and centrifuged at 2000 x g for 8 minutes in order to get the
20 serum used in the biochemical analysis, and in the determination of the pro- and anti-
21 inflammatory cytokines as well as of the CRP

22

23 2.6 Cytokines

24 The quantification of the cytokines IL-1 (pg/ml), IL-6 (pg/ml), TNF- α (pg/ml), IFN- γ

1 (µg/ml), and IL-10 (pg/ml) were assessed by ELISA using commercial kits for humans
2 (eBIOSCIENCE®, San Diego, USA), according to manufacturer's instructions. The presence and
3 concentration of the cytokines were determined by the intensity of color measured by
4 spectrometry by a micro ELISA reader. The cross-reactivity between the antibodies for canine
5 cytokines was assured by epitope amino acid homology and previously confirmed in our lab
6 (Paim et al., 2013).

7

8 2.7 C-reactive protein

9 The determination of the CRP (mg/dl) in the serum was performed by nephelometric
10 method using a commercial kit (Dade Behring Diagnostic, Marburg, Germany) according to the
11 manufacturer's instructions.

12

13 2.8 Statistical analysis

14 The groups were evaluated using a Survival Analysis according to Kaplan-Meier method
15 (Kaplan and Meier, 1958), and the Chi-square test with 1% level of significance was used to
16 verify the association between the time length of the treatments and the probability of non-cure of
17 the animals.

18 With exception of the concentration of IL-10, the collected data was adjusted to the non-
19 linear statistical model proposed by Michaelis-Menten and parameterized by Zeviani (2013). IL-
20 10 data were adjusted to the simple linear model. For the comparison means analysis, the
21 Student's t test for paired data was used. Differences were considered statistically significant
22 when $p < 0.05$. All of the analyses above were performed using the R statistical system R
23 Development Core Team, 2011 and the add-on package 'survival'.

1 In order to verify the existence of a correlation between the variables and the overall time
2 length of the treatments, a correlation analysis was performed making use of the Pearson's
3 correlation coefficient (r) together with a Principal Factors Analysis. The Pearson's coefficient
4 was considered low when $|r| < 0.3$ and high when $|r| > 0.7$. This last analysis was made using the
5 SAS v.9.2 statistical software.

6

7 **3. Results**

8 3.1 Clinical Evolution

9 Among 18 animals treated, 15 were infected with tumors classified as "non-resistant"
10 (83.3%) and the remaining three (16,7%) were diagnosed with "resistant" tumors. The distinction
11 between these two groups was made based on the clinical response of the animals as well as on
12 the development of the tumors over the treatment. In the case of the resistant tumors, a total of six
13 to ten chemotherapeutic applications were needed to achieve complete cure. In these cases, the
14 chemotherapy was started with vincristine with no or minor tumor regression after four
15 applications. Based on this observation, the antineoplastic drug was changed to doxorubicin as
16 described in method section until the complete eradication of the tumors. One of the animals
17 infected with a resistant tumor presented a metastasis in inguinal lymph node during the
18 treatment with vincristine. Resistant tumors were treated with additional two to seven
19 applications of doxorubicin and were completed cured with one exception. In this case, a tumor
20 located at the vulvar vestibulus could be reduced with chemotherapy, but a small remaining mass
21 of cells needed to be surgically removed. The fifteen non-resistant animals were treated solely
22 with vincristine, and at least three applications were needed up to a maximum of eight to reach
23 complete cure.

24

1 3.2 Association between resistance and probability of non-cure

2 In order to obtain prognostic information a non-cure probability analysis was performed.
3 A statistically significant difference ($p=0,01$) between the response to the chemotherapy could be
4 observed, were animals which could be cured with chemotherapy based only in vincristine
5 applications were classified as non-resistant CTVT hosts (Fig. 1).

6

7 3.3 Serum cytokines and CRP levels

8 As expected, in all cases, a progressive decrease of all pro-inflammatory cytokines and
9 the CRP was observed (Fig. 2a to 2e), while the levels of IL-10 showed an increasing behavior
10 throughout the treatments. All of the animals belonging to the resistant group had initial higher
11 cytokine expression patterns than those of the non-resistant group. Additionally, in the case of IL-
12 10, there was no apparent distinction of initial levels between animals of the resistant or the non-
13 resistant group (Fig. 3).

14 It can be noticed that the levels of the pro-inflammatory cytokines as well as the CRP
15 converge, at the end of the treatment, to the level of each variable observed in the healthy
16 animals. On the other hand, the anti-inflammatory cytokine IL-10 presents the same
17 concentration among healthy and ill animals before the beginning of their treatment. With the
18 evolution of chemotherapy, the levels of IL-10 increase linearly with time and diverge from the
19 levels of the control group.

20 To compare each variable, and both resistant and non-resistant groups, the model
21 parameters b_0 and b_1 , their 95% confidence intervals, and the coefficient of determination R^2
22 were computed (Tab. 1). The most accurate fitting was obtained in the case of the IL-10
23 concentrations of the animals in the non-resistant group ($R^2 = 98.86\%$), while the poorest one was
24 that of the TNF concentration of the resistant animals ($R^2 = 69.22\%$). In all of the cases, the

1 quality of the fittings of the non-resistant animals was superior when compared to the resistant
2 group.

3

4 3.4 Comparison between initial and final concentrations of cytokines and CRP

5 In order to evaluate the degree of influence of treatment and type of tumor (resistant or
6 non-resistant) on the variation of cytokine and CRP concentration, we performed a comparison
7 between initial and final means of these proteins. In this analysis, the Student's t test for paired
8 data was used (Tab.2). With exception of the results for IL-1, IL-6 and CRP in the resistant group
9 ($p = 0.0629$, $p = 0.0553$ e $p = 0.1276$, respectively), the other 9 parameters showed statistically
10 significant differences ($p < 0.05$).

11

12 3.5 Correlation analysis between initial cytokine concentration and time of treatment

13 In order to verify the existence of any correlation between the initial concentrations and
14 the overall time of the treatments, a correlation analysis based on the Pearson's coefficient was
15 performed. In all the cases, the coefficients were considered too low to indicate any correlation
16 between the variables analyzed (Tab. 3, second row). On the other hand, if we take the initial
17 concentrations and divide them by the initial concentration of the anti-inflammatory interleukin
18 IL-10, we can spot an improvement on the correlation coefficients (Tab. 3, third row), with
19 exception of the CRP. The pro-inflammatory cytokine INF- γ , for instance, had an increase of
20 975% of its coefficient.

21 Finally, a third analysis was performed, where instead of dividing the concentrations by
22 the value of IL-10, we use the CRP as denominator (Tab.3, fourth row). The results showed yet
23 another improvement compared to the previous analyses. Cytokines IL-6 and TNF- α , in this case,

1 showed 162% and 112% of increase in their coefficients respectively, when compared with the
2 previous results. The largest coefficient was obtained for IL-6/PCR (0.42).

3 The results of the Pearson's coefficients of correlation can be better visualized after the
4 principal factors analysis (Fig. 4). Three principal factors were identified and the first two
5 explained 66.46% and 15.92%, respectively, of the total variance observed in the experiment.

6

7 **4 Discussion**

8 CTVT is a very suitable model to study the host-tumor interaction (Liao et al., 2003).
9 Vincristine-based chemotherapy is still considered the most effective treatment, but the necessary
10 time until the tumor complete eradication varies (Scarpelli et al., 2010). In this experiment, those
11 tumors that presented resistance to the initial weekly vincristine treatment were submitted to a
12 second, doxorubicine-based treatment. This had a schedule of 21 days interval between each
13 application, and led to a significant increase in the total time until cure. Most of the authors refer
14 single agent therapy with vincristine as sufficient to cure animals with CTVT (Cohen, 1985; Das
15 and Das, 2000), although resistant tumors are described and doxorubicin, have been used to treat
16 as the choice in these cases (Rogers, 1997; Erunal-Maral et al., 2000).

17 In order to assess the relationship between extent of the treatments and the occurrence of
18 the event 'cure', a Survival Analysis was performed. Figure 1 shows these results using Kaplan-
19 Meier analysis. The expectation was that the resistant tumors would take longer periods of time
20 to be eliminated, when compared to the non-resistant ones. This could be detected by the analysis
21 performed. Similarly, it was expected that there should be some kind of influence of the
22 resistance to the chemotherapy on the probability of cure of the animals. Chi-squared test clearly
23 showed an association between the resistance or non-resistance of a tumor and the probability of
24 non-cure after treatment. Scarpelli et al., (2010) presented a set of factors that could influence on

1 the necessary time for cure, such as: the tumor's volume before treatment, where larger tumors
2 would need longer treatments; the animal's age, in the sense that the older the animals, the longer
3 their treatment should take; and the weather, as it was detected that treatments during hot, rainy
4 months would also last longer. In our study the size of the tumors did not varied significantly as
5 well as the other factors. In our experiment, the resistant tumors needed at least 60 days to show a
6 probability of eradication larger than 0%, while during the same time, all of the non-resistant
7 animals have already finished their treatments after cure.

8 CTVT is characterized as a neoplasm that evokes both the humoral and cellular response
9 in immunologically competent hosts (Yang, 1988). These responses in infected dogs vary
10 according to the tumor's development stage (Hsiao et al., 2002), the distribution of T
11 lymphocytes in the blood and tumoral tissue, lymphatic drainage, and intra-tumoral factors
12 (Perez, et al., 1998), as well as to the humoral immunity against CTVT cells (Fenton and Yang,
13 1988). The CTVT's physiopathology remains a subject still not well documented in the literature,
14 and among other factors, is noticed a scarcity of comprehension about the immunologic response
15 of the host against the tumor.

16 After the first application of vincristine, an increase of the intra-tumoral leucocytes
17 infiltrate is noticed, clearly showing that the host's immune system is a very important factor
18 against CTVT, and that the vincristine is linked to the beginning of the tumor regression
19 (Gonzales et al., 2000). That implies that a smaller immunologic reaction of the host should
20 reduce tumor clearance during chemotherapy (Kearns at al., 1999). Another important factor to
21 be considered is the antigen release by the cell lysis induced by the drug.

22 As expected, the reduction of the tumor is followed by a decrease in inflammation and
23 release of pro-inflammatory cytokines. The high initial concentrations of the pro-inflammatory
24 cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α , and INF- γ) noticed in the experiments and their decrease over the

1 treatments are a reflex of the body response to tumoral development. If the levels of cytokines
2 and CRP drive the evolution of the tumor, or if they are driven by it, however, remains an open
3 question.

4 Interestingly, we could observe higher levels of pro-inflammatory cytokines in dogs
5 affected with resistant tumors. The same behavior is observed for the CRP, since this protein
6 increases its concentration more than 25% in serum in response to the stimulus of the pro-
7 inflammatory cytokines (Eckersall and Bell, 2010) (Fig. 2). Inflammation and tumor
8 development are closely related and the same cytokines involved in immunologic response are
9 also related to tumor growth (Lund, 2008; Schiavoni et al., 2013; Roato, 2013). Inflammatory
10 cells, immune cells or cytokines secreted by the tumor might promote its development and
11 survival, but on the other hand might also produce anti-tumoral effects. The chronic inflammation
12 developed by inflammatory mediators, such as the cytokines, leads to the suppression of the anti-
13 tumoral immunity, speeding up the progression of the tumor (Lin and Karin, 2007). The
14 improvement of the host immune response allows the expression of MHC I and II molecules by
15 the tumor cells that so far were reduced, allowing their recognition and destruction (Hsiao et al.,
16 2008). As the treatment continues and the host's immune response improves, the tumor starts its
17 regression phase.

18 Together with the progressive decrease of the pro-inflammatory cytokines, the opposite
19 behavior is noticed for the IL-10, which gradually increased as the tumor reduced its size (Fig. 3).
20 This trend indicates a decisive role of the IL-10 in modulating the response of the organism
21 against CTVT, where the balance between protective pro-inflammatory and unwanted pro-
22 tumoral inflammation reflects the clinical evolution of the disease.

23 The time evolution of the cytokines IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ , and IL-10 as well as the
24 CRP over the treatments, result in the graphs of Figs. 2 and 3 and Tab. 1. Using the equation of

1 the statistical model and the b_0 and b_1 parameters of Tab. 1, it is possible to estimate, for a given
2 moment in time after the beginning of the treatment, the approximate concentration of any
3 cytokine or CRP, considered their 95% confidence interval.

4 Based in these results, we observed that for the animals in the resistant group, both the
5 initial and final concentrations were always higher than those of the non-resistant animals. The
6 only exception was IL-10, which showed a slightly higher initial concentration for the non-
7 resistant animals instead of the resistant ones. The resistant animals are subjected to a bigger
8 decrease (or increase, in the case of IL-10) on their levels of these cytokines and the CRP along
9 the CTVT treatment. Statistically, we could observe an association between the response and
10 consequently extent of treatment (resistance), and the levels of pro- and anti-inflammatory
11 cytokines and the CRP (Tab. 2).

12 In quantitative terms, these associations can be shown as statistical correlation between
13 the variables in their initial moment, and the total time extent of the treatments, and the results are
14 obtained in terms of the Pearson's correlation coefficients of the Tab. 3 (second row). However,
15 as can be seen, despite the existence of correlation, the Pearson's coefficients are low. High
16 coefficients of correlation can be a good way to define predictive techniques for the extent of the
17 treatment of the CTVT based solely on the measure of the initial levels of cytokines or CRP.

18 Based on the fact that the cytokines studied here are of opposite nature, either pro- or anti-
19 inflammatory, a second correlation analysis was made, but not based on the initial levels alone,
20 but on their quotient relative to IL-10. The coefficients shown in Tab. 3 (third row) demonstrate
21 that these quotients have indeed a better correlation with the extent of the treatment than the
22 initial concentrations alone. In the third correlation analysis, instead of using the IL-10 as
23 denominator in the quotients, it was used the initial level of the CRP. Again it was noticed an
24 improvement on the Person's coefficients (Tab. 3, fourth row). In terms of predictive potential, it

1 is more reliable to use these initial quotients in order to have a more accurate tool to predict the
2 total necessary time to treat CTVT. Visually these findings can be seen in Fig. 4, in which angles
3 of 0° between vectors indicate perfect positive correlation and 180° angles correspond to perfect
4 negative correlations. Angles of 90° indicate lack of correlation between variables. Angles of
5 about 90° between the vectors `treatment duration` and the vectors of the IL-10 ratios indicate
6 positive, although low correlation between these variables (Tab. 3, third row). Angles of about
7 180° between the vectors `treatment duration` and the vectors of the CRP ratios, however,
8 indicate negative high correlation between the variables (Tab. 3, fourth row).

9 The mechanisms involving inflammation and tumor development are not fully
10 understood, however, chronic inflammation is related to tumorigenesis, tumor growth and
11 invasiveness. A higher incidence of certain types of cancers, (e.g. lung, prostate, intestine and
12 liver) is documented in the presence of chronic inflammation (Lin and Karin, 2007; Terlizzi et
13 al., 2014; Liu et al., 2014). Some pro-inflammatory cytokines, such as TNF- and high IL-1
14 expression are related to bad prognosis in cancer (Terlizzi et al., 2014). The presence of
15 inflammatory status found in dogs hosting resistant CTVT cells might be a consequence of these
16 interactions. The tumor microenvironment (TME) is composed by cellular and soluble factors.
17 These soluble factors, produced by tumor cells and tumor-associated lymphocytes, inflammatory
18 and vascular cells, are components of the extra-cellular compartment of the tumoral
19 microenvironment are the key components that determine tumor development (Salo et al., 2014).
20 Cytokines are part of the TME and improved knowledge about their role in cancer will open new
21 therapeutic horizons in cancer therapy.

22

23 **5 Conclusion**

24 In this study, we could demonstrate the involvement of pro- and anti-inflammatory

1 cytokines and of the CRP in tumor development and response to treatment in dogs naturally
2 affected by the CTVT, and the evolution in time of the concentration of each of these variables
3 could be determine over the chemotherapy treatment.

4 A difference between the resistant and non-resistant tumors could be observed and was
5 determined by the time to obtain cure and the need of a second chemotherapeutic agent.

6 The inflammatory status of the dogs affected the evolution of the tumor and dogs with
7 lower inflammatory status at diagnosis showed better responses to treatment.

8 If the levels of cytokines and CRP drive the evolution of the tumor, or if they are driven
9 by it, however, remains an open question.

10

11 **6 References**

12 Chou, P. C., Chuang, T. F., Jan, T. R., Gion, H. C., Huang, Y. C., Lei, H. J., Chen, W. Y., Chu,
13 R. M., 2009. Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal
14 tumor in beagles. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 130, 25-34.

15 Cohen, D., 1978. The transmissible venereal tumor of the dog – a naturally occurring allograft?
16 *Israel J. Med. Sci.* 14, 14-19.

17 Cohen, D., 1985. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression.
18 *Adv. Cancer Res.* 43, 75-112.

19 Das, U., Das, A., 2000. Review of Canine Transmissible Venereal Sarcoma. *Vet. Res. Commun.*
20 24, 545-556.

21 Dingli, D., Nowak, M. A., 2006. Cancer biology: infectious tumour cells. *Nature* 443, 35-36.

22 Dvorak, H. F., 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma
23 generation and wound healing. *New Engl. J. Med.* 315, 1650-1659.

- 1 Eckersall, P. D., Bell, R., 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation
2 in veterinary medicine. *Vet. J.* 185, 23-27.
- 3 Erunal-maral, N., Findik, M., Aslan, S., 2000. Use of exfoliative cytology for diagnosis of
4 transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. *Deut. Tierarztl.*
5 *Woch.* 107, 175-180.
- 6 Gonzalez, C. M., Griffey, S. M., Naydan, D. K., Flores, E., Cepeda, R., Cattaneo, G., Madewell,
7 B. R., 2000. Canine Transmissible Venereal Tumour: a Morphological and Immunohistochemical
8 Study of 11 Tumours in Growth Phase and during Regression after Chemotherapy. *J. Comp.*
9 *Pathol* 122, 241-248.
- 10 Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-
11 674.
- 12 Fenton, M. A., Yang, T. J., 1988. Role of humoral immunity in progressive and regressive and
13 metastatic growth of the canine transmissible venereal sarcoma. *Oncology* 45, 210-213.
- 14 Higgins, D.A., 1966. Observations on the canine transmissible venereal tumours as seen in the
15 Bahamas. *Vet. Rec.* 79, 67-71.
- 16 Hsiao, Y. W., Liao, K. W., Hung, S. W., Chu, R. M., 2002. Effect of tumor infiltrating
17 lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells.
18 *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 19-27.
- 19 Hsiao, Y. W., Liao, K. W., Chung, T. F., Liu, C. H., Hsu, C. D., Chu, R. M., 2008. Interactions of
20 host IL-6 and IFN-gamma and cancer-derived TGF-beta1 on MHC molecule expression during
21 tumor spontaneous regression. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 1091-1104.
- 22 Kaplan, E. L., Meier, P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am.*
23 *Stat. Assoc.* 53, 457-481.

- 1 Kearns, R. J., Hayek, M. G., Turek, J. J., Meydani, M., Burr, J. R., Greene, R. J., Marshal, C. A.,
2 Adams, S. M., Borgert, R. C., Reinhart, G. A., 1999. Effect of age, breed, and dietary omega-6
3 (n-6): omega-3 (n-3) fatty acid ratio on immune function, eicosanoid production, and lipid
4 peroxidation in young and aged dogs. *Vet. Immunol. Immunophatol.* 69, 165-183.
- 5 Kundu, J. K., Surh, Y. J., 2012. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free.*
6 *Radical. Bio. Med.* 52, 2013-2037.
- 7 Liao, K. W., Hung, S. W, Hsiao, Y. W, Bennett, M., Chu, R. M., 2003. Canine transmissible
8 venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Vet.*
9 *Immunol. Immunophatol.* 92, 149-162.
- 10 Lin, C. Y., Chuang, T. F., Liao, K. W., Huang, Y. J., Pai, C. C., Chu, R. M., 2008. Combined
11 immunogene therapy of IL-6 and IL-15 enhances anti-tumor activity through augmented NK
12 cytotoxicity. *Cancer Lett.* 272, 285-295.
- 13 Lin, W. W., Karin, M. A., 2007. Cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation,
14 and cancer. *J. Clin. Invest.* 117, 1175-1183.
- 15 Liu, X., Qian, L., Nan, H., Cui, M., Hao, X., Du, Y., 2014. Function of the transforming growth
16 factor- β 1/c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in the action of thalidomide on a rat model
17 of pulmonary fibrosis. 7, 669-774.
- 18 Lund, F. E., 2008. Cytokine-producing B lymphocytes – key regulators of immunity. *Curr. Opin.*
19 *Immunol.* 20, 332-338.
- 20 Mukaratirwa, S., Gruys, E., 2004. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin,
21 immunophenotype, and immunobiology. A review. *Vet. Quart.* 25, 101-111.
- 22 Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in
23 veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.* 168, 28-40.

- 1 Murgia, C., Pritchard, J. K., Kim, S. Y., Fassati, A., Weiss, R. A., 2006. Clonal origin and
2 evolution of a transmissible cancer. *Cell*. 126, 477-487.
- 3 Pai, C. C., Kuo, T. F., Mao, S. J. T., Chuang, T. F., Lin, C. S., Chu, R. M., 2011.
4 Immunopathogenic behaviors of canine transmissible venereal tumor in dogs following an
5 immunotherapy using dendritic/tumor cell hybrid. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 139, 187-199.
- 6 Paim, F. C., Da Silva, A. S., Paim, C. B. V., França, R. T., Costa, M. M, Duarte, M. M. M. F.,
7 Sangoi, M. B., Moresco, R. N., Monteiro, S. G., Lopes, S. T. A., 2013, Increased cytokine and
8 nitric oxide levels in serum of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Korean J*
9 *Parasitol*, 51, 133-137.
- 10 Paltrinieri, S., 2007. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: the acute phase proteins.
11 *Vet. Res. Commun.* 31, 125-129.
- 12 Perez, J., Day, M. J., Mozos, E., 1998. Immunohistochemical study of the local inflammatory
13 infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Vet.*
14 *Immunol. Immunopathol.* 64, 133-147.
- 15 Roato, I., 2013. Interaction among cells of bone, immune system, and solid tumors leads to bone
16 metastases. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 1-7.
- 17 Rogers, K. S., 1997. Transmissible venereal tumor. *Comp. Cont. Educ. Pract.* 19, 1036-1042.
- 18 Salo, T., Vered, M., Bello, I. O., Nyberg, P., Bitu, C. C., Zlotogorski Hurvitz, A., Dayan, D.,
19 2014. Insights into the role of components of the tumor microenvironment in oral carcinoma call
20 for new therapeutic approaches. *Exp. Cell. Res.* "in press".
- 21 Scarpelli, K. C., Valladão, M. L., Metze, K., 2010. Predictive factors for the regression of canine
22 transmissible venereal tumor during vincristine therapy. *Vet. J.* 183, 362-363.

- 1 Schiavoni, G., Mattei, F., Gabriele, L., 2013. Type I interferons as stimulators of DC-mediated
- 2 cross-priming: impact on anti-tumor response. *Front. Immunol.* 4, 1-7.
- 3 Terlizzi, M., Casolaro, V., Pinto, A., Sorrentino, R., 2014. Inflammasome: Cancer's friend or foe?
- 4 *Pharmacol. Ther.* “in press”.
- 5 Tselepis, C., Perry, I., Dawson, C., Hardy, R., Darnton, S. J., McConkey, C., Stuart, R. C.,
- 6 Wright, N., Harrison, R., Jankowski, J. A., 2002. Tumour necrosis factor-alpha in Barrett's
- 7 oesophagus: a potential novel mechanism of action. *Oncogene* 21, 6071-6081.
- 8 Tizard, I. R., 2009. *Imunologia Veterinária uma introdução*, Elsevier, 587 pp.
- 9 Yang, T. J., 1988. Immunobiology of a spontaneously regressive tumor, the canine transmissible
- 10 venereal sarcoma (review). *Anticancer Res.* 8, 93-95.
- 11 Zeviani, W. M., *Parametrizações interpretáveis em modelos não lineares*. 2013. 146f. Doctorate
- 12 Thesis. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

1 **Table 1**
2 Statistical model parameters.

Variable	Resistance	b_0	(IC, 95%)	b_1	(IC, 95%)	R^2 (%)
IL-1	Non Resistant	160,31	(119,10; 201,49)	63,11	(35,75; 90,48)	82,21
	Resistant	227,29	(168,27; 286,31)	81,86	(49,88; 113,85)	72,69
IL-6	Non Resistant	182,56	(150,11; 215,01)	62,98	(35,45; 90,51)	79,53
	Resistant	260,78	(189,84; 331,71)	81,83	(51,55; 112,11)	70,81
TNF- α	Non Resistant	218,64	(163,11; 274,17)	82,55	(50,64; 114,45)	91,14
	Resistant	298,45	(214,44; 382,45)	81,25	(51,29; 111,21)	69,22
INF- γ	Non Resistant	262,68	(235,78; 289,57)	56,33	(43,98; 68,68)	88,37
	Resistant	363,66	(280,20; 447,12)	100,59	(63,72; 137,48)	70,93
IL-10	Non Resistant	2,34	(1,34; 3,34)	14,73	(1,41; 28,07)	98,86
	Resistant	4,50	(3,01; 5,99)	41,04	(25,25; 56,83)	79,34
CRP	Non Resistant	53,89	(42,81; 64,96)	0,74	(0,39; 1,10)	72,67
	Resistant	56,23	(30,82; 81,65)	0,93	(0,56; 1,29)	70,63

3 Variable, resistance to the treatment, model parameters, and coefficient of determination R^2 . Physically, b_0 indicates
4 the initial concentration of the variables, and b_1 denotes the necessary time (in days) until each variable reaches half
5 of their initial concentration. When these values are inserted into the model equation, one gets the graphs in Figures 1
6 and 2. IC: Interval of confidence

1 **Table 2**
 2 Means comparison between initial and final concentrations for each variable.

Variable	Resistance	Mean			p-value
		Initial	Final	Difference	
IL-1	Non Resistant	160,7	121,93	47,13	0,0001
	Resistant	223,33	139,67	83,67	0,0629
IL-6	Non Resistant	197,67	149,80	47,87	0,0001
	Resistant	259,33	164,67	94,67	0,0553
TNF- α	Non Resistant	220,20	165,47	54,73	0,0001
	Resistant	296,54	195,00	101,54	0,0235
INF- γ	Non Resistant	290,20	214,00	76,20	0,0014
	Resistant	636,88	251,00	112,88	0,0113
IL-10	Non Resistant	49,87	87,67	37,80	0,0001
	Resistant	44,92	142,67	97,75	0,0270
CRP	Non Resistant	2,01	0,65	1,36	0,0010
	Resistant	4,74	0,65	4,09	0,1276

3 Variable, mean initial, final and difference values, and p-value of the t test. * p < 0.05.

1 **Table 3**

2 Pearson's coefficient of correlation (r)

Variable	Initial concentration [X]	[X] / [IL-10]	[X] / [CRP]
IL-1	0.055	0.208	-0.304
IL-6	-0.026	0.160	-0.420
TNF- α	-0.016	0.187	-0.398
INF- γ	0.016	0.170	-0.238
IL-10	-0.273	-	-0.240
CRP	0.277	0.271	-

3 |r| < 0.3 indicates low degree of correlation, 0.3 < |r| < 0.7 indicates moderate correlation, and |r| > 0.7 suggests a
 4 high level of correlation between the variables.

1 Fig. 1. Kaplan-Meier curves show the probability of non-cure versus time until cure of the
2 resistant and non resistant animals. Chi-square test with 1% level of significance determined that
3 there is association between the time length of the treatments and the probability of non cure of
4 the animals.

5

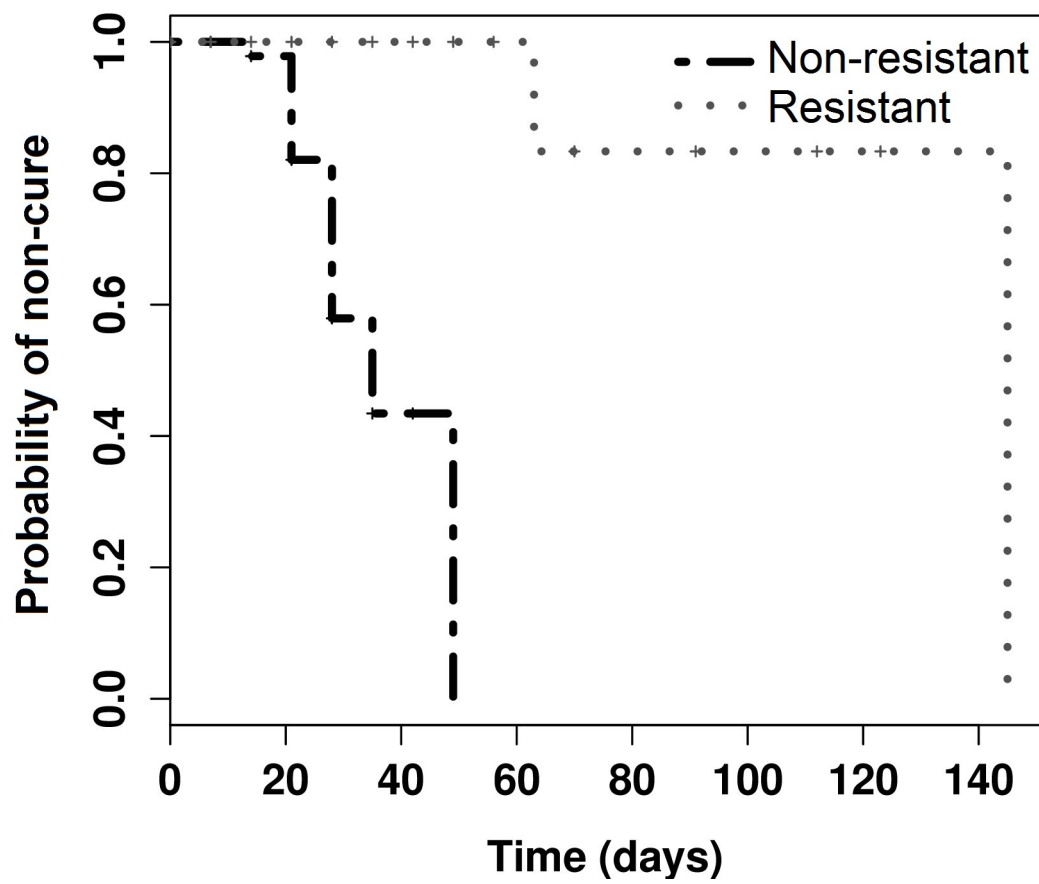
6 Fig. 2. Data fitting to the statistical model. Determination of each concentration profile
7 throughout the CTVT treatment: (a) IL-1, (b) IL-6, (c) TNF- α , (d) INF- γ , and (e) CRP.

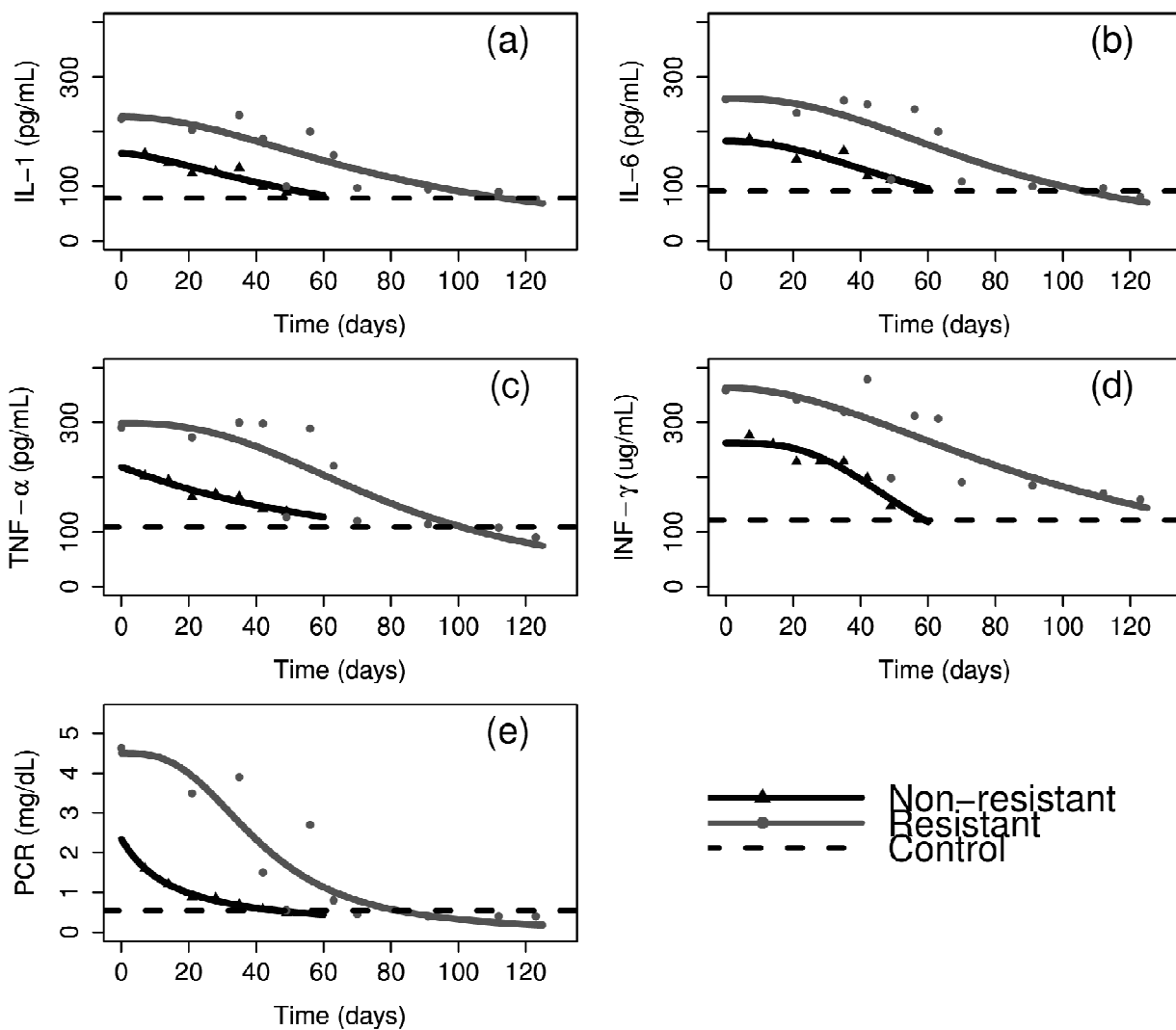
8

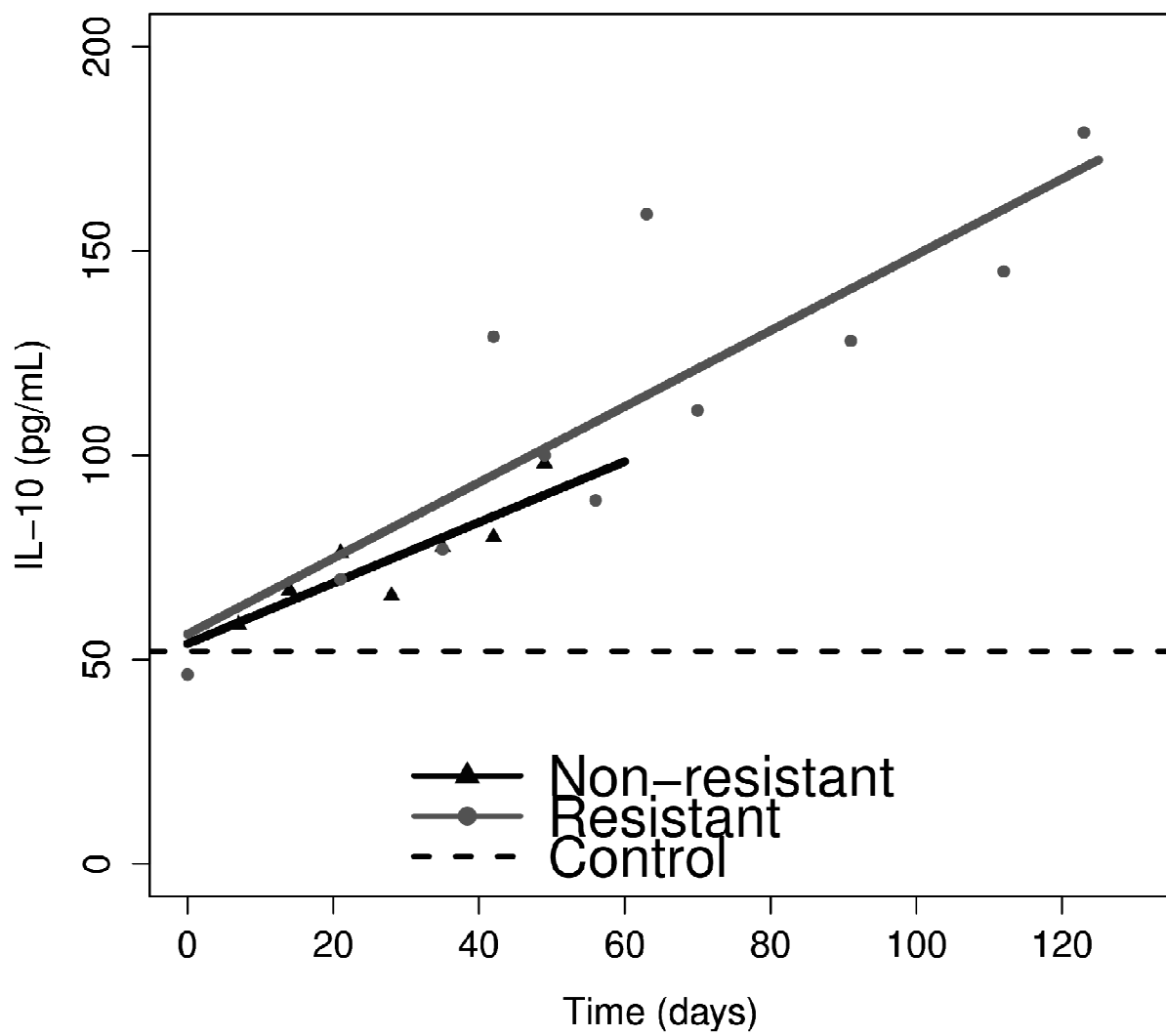
9 Fig. 3. Data fitting to the statistical model. Determination of the IL-10 profile throughout the
10 CTVT treatment.

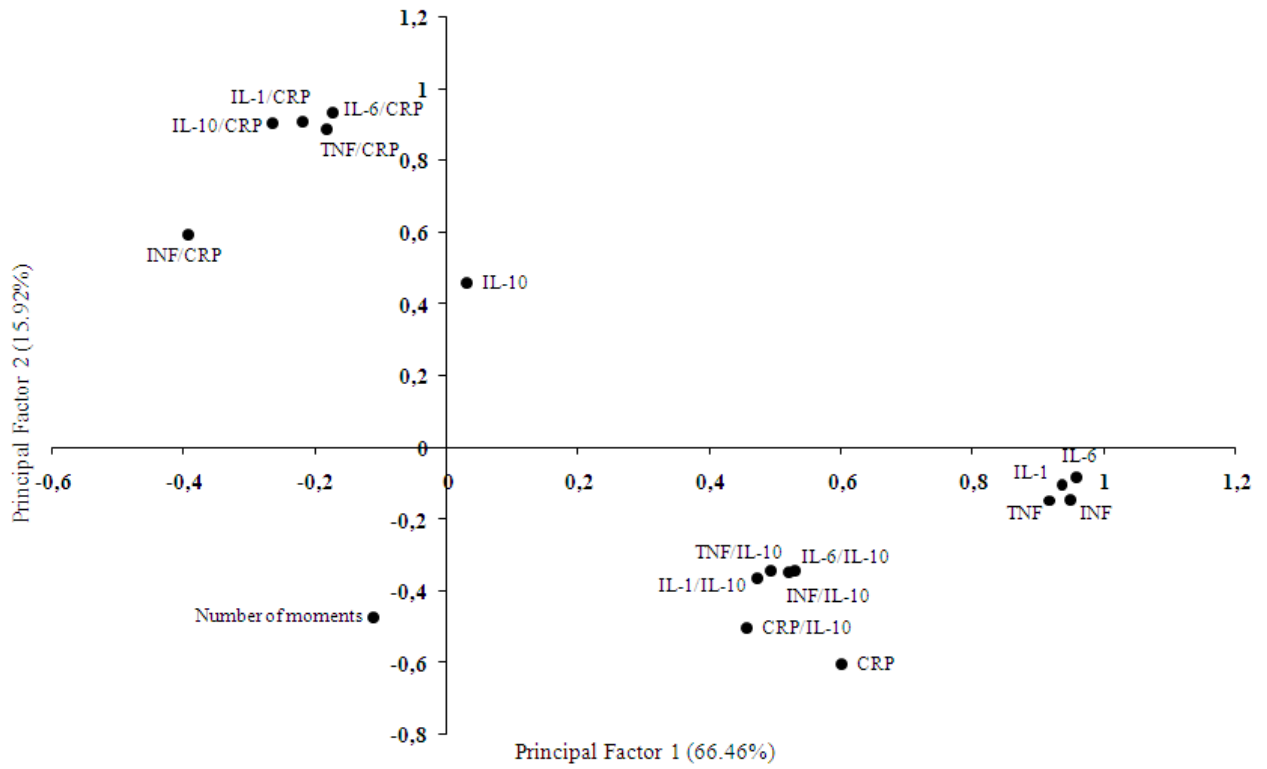
11

12 Fig. 4. Variables projected in Principal Factors 1 and 2.









3 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível demonstrar o envolvimento de citocinas pró- e anti-inflamatória, bem como da PCR no desenvolvimento tumoral e resposta ao tratamento em cães naturalmente infectados pelo TVTc.

Foi observada uma diferença entre tumores resistentes ou não-resistentes à terapia e essa característica é determinada pelo tempo até a cura total o a necessidade de um segundo agente quimioterápico.

O estado inflamatório dos cães influenciou a evolução dos tumores, sendo que os animais com resposta inflamatória menos pronunciada no momento do diagnóstico apresentaram melhor resposta ao tratamento.

Não foi possível observar se os níveis de citocinas e da PCR determinam a evolução tumoral ou se eles apenas acompanham esta evolução.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Basic Immunology: functions and disorders of the immune system**. 2ed. Philadelphia, PA: Saunders: Elsevier, 2004.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5th. Philadelphia, PA Elsevier Saunders, 2005. 564.

ADAMS, E. W.; SLAUGHTER, L. J. A Canine Venereal Tumor with Metastasis to the Brain. **Pathologia Veterinaria Online**, v. 7, n. 6, p. 498-532, 1970.

AJELLO, P. Transmissione del tumore di Sticker con materiale acellulare. **Nuova Veterinária**, v. 36, p. 5, 1960.

ALBANESE, F. et al. Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with Leishmania-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin? **Veterinary Dermatology**, v. 13, n. 5, p. 243-246, 2002.

AMARAL, A. S. D. et al. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. 8, p. 563-564, 2007.

APTE, R. N.; VORONOV, E. Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. **Seminars in cancer biology**, v. 12, n. 4, p. 277-290, 2002.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-545, 2001.

BATAMUZI, E. K.; BITTEGEKO, S. B. Anal and perianal transmissible venereal tumour in a bitch. **The Veterinary Record**, v. 129, n. 25-26, p. 556, 1991.

BERGMAN, P. J. Cancer Immunotherapy. **Top Companion Anim Med**, v. 24, n. 3, p. 130-136, 2009.

BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, v. 112, n. 1, p. 235-243, 1997.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S460-475, 2003.

BOSCOS, C. M. et al. Ocular involvement of transmissible venereal tumor in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 1, n. 2-3, p. 167-170, 1998.

BURKE, F. et al. A cytokine profile of normal and malignant ovary. **Cytokine**, v. 8, n. 7, p. 578-585, 1996.

BURNET, F. M. The concept of immunological surveillance. **Progress in Experimental Tumor Research**, v. 13, p. 1-27, 1970.

CASEY, L. C. Immunologic Response to Infection and its Role in Septic Shock. **Critical Care Clinics**, v. 16, n. 2, p. 193-213, 2000.

CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTYNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

CHOU, P.-C. et al. Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 130, n. 1-2, p. 25-34, 2009.

CHU, R. M. et al. Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. **Anticancer Research**, v. 21, n. 6a, p. 4017-4024, 2001.

CHUANG, T. F. et al. Electroporation-mediated IL-12 gene therapy in a transplantable canine cancer model. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 3, p. 698-707, 2009.

COHEN, D. The biological behaviour of the transmissible venereal tumour in immunosuppressed dogs. **European Journal of Cancer (1965)**, v. 9, n. 4, p. 253-258, 1973.

COHEN, D. The transmissible venereal tumor of the dog - a naturally occurring allograft? **Israel Journal of Medical Sciences**, v. 14, n. 1, 1978.

COHEN, D. The Canine Transmissible Venereal Tumor: a Unique Result of Tumor Progression. **Advances in Cancer Research**, v. 43, p. 75-112, 1985.

CONNOR, M. E.; STERN, P. L. Loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas. **International Journal of Cancer**, v. 46, n. 6, p. 1029-1034, 1990.

CUNNEEN, J.; CARTWRIGHT, M. The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. **AACN Clinical Issues**, v. 15, n. 1, p. 18-44, 2004.

DAS, U.; DAS, A. Review of Canine Transmissible Venereal Sarcoma. **Veterinary Research Communications**, v. 24, n. 8, p. 545-556, 2000.

DEL VECCHIO, A. et al. The role of molecular genetics in the pathogenesis and diagnosis of neonatal sepsis. **Clinics in Perinatology**, v. 31, n. 1, p. 53-67, 2004.

DINGLI, D.; NOWAK, M. A. Cancer biology: Infectious tumour cells. **Nature**, v. 443, n. 7107, p. 35-36, 2006.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 315, n. 26, p. 1650-1659, 1986.

ELINAV, E. et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 11, p. 759-771, 2013.

ERUNAL-MARAL, N.; FINDIK, M.; ASLAN, S. Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 107, n. 5, p. 175-180, 2000.

FENTON, M. A.; YANG, T. J. Role of humoral immunity in progressive and regressive and metastatic growth of the canine transmissible venereal sarcoma. **Oncology**, v. 45, n. 3, p. 210-213, 1988.

FERREIRA, A. J. A. et al. Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, n. 4, p. 165-168, 2000.

GAO, S. P. et al. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 12, p. 3846-3856, 2007.

GOLOUBEFF, B.; OLIVEIRA, H. P. Tratamento criocirúrgico de tumores e de fístulas, em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 463-470, 1999.

GRIVENNIKOV, S. et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. **Cancer Cell**, v. 15, n. 2, p. 103-113, 2009.

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

HARIZI, H. et al. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 5, p. 2255-2263, 2002.

HIGGINS, D. A. Observations on the canine transmissible venereal tumour as seen in the Bahamas. **The Veterinary Record**, v. 79, n. 3, p. 67-71, 1966.

HILL, D. L.; YANG, T. J. Immunoelectron microscopic localization of a tumor-associated antigen (TAA) in the canine transmissible venereal sarcoma by anti-TAA-antiferritin hybrid antibodies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 75, n. 4, p. 725-732, 1985.

HIRANO, A.; BROWN, W. C.; ESTES, D. M. Cloning, expression and biological function of the bovine CD40 homologue: role in B-lymphocyte growth and differentiation in cattle. **Immunology**, v. 90, n. 2, p. 294-300, 1997.

HOLDEN, C. A.; SANDERSON, A. R.; MACDONALD, D. M. Absence of human leukocyte antigen molecules in skin tumors and some cutaneous appendages: evidence using monoclonal antibodies. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 9, n. 6, p. 867-871, 1983.

HOWARD, M.; O'GARRA, A. Biological properties of interleukin 10. **Immunology Today**, v. 13, n. 6, p. 198-200, 1992.

HSIAO, Y.-W. et al. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n. 1-2, p. 19-27, 2002.

HSIAO, Y. W. et al. Interactions of host IL-6 and IFN-gamma and cancer-derived TGF-beta1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 57, n. 7, p. 1091-1104, 2008.

HSIAO, Y. W. et al. Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF-beta 1 and restores the lymphokine-activated killing activity. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 3, p. 1508-1514, 2004.

IDOWU, A. L. A retrospective evaluation of four surgical methods of treating canine transmissible venereal tumour. **Journal of Small Animal Practice**, v. 25, n. 4, p. 193-198, 1984.

IDOWU, L. The chromosomes of the transmissible venereal tumour of dogs in Ibadan, Nigeria. **Research in Veterinary Science**, v. 22, n. 3, p. 271-273, 1977.

JAIN, N. C. Acute phase proteins. In: **Current veterinary therapy X: small animal practice**. Philadelphia Saunders, 1989. p.327.

JAVIER, R. T.; BUTEL, J. S. The history of tumor virology. **Cancer Research**, v. 68, n. 19, p. 7693-7706, 2008.

KROGER, D., GREY, R.M., BOYD, J.W. An unusual presentation of canine transmissible venereal tumor. **Canine Practice**, v. 16, n. 6, p. 5, 1991.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Emerging avenues linking inflammation and cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 2013-2037, 2012.

LESINA, M. et al. Stat3/Socs3 Activation by IL-6 Transsignaling Promotes Progression of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Development of Pancreatic Cancer. **Cancer Cell**, v. 19, n. 4, p. 456-469, 2011.

LIN, C.-Y. et al. Combined immunogene therapy of IL-6 and IL-15 enhances anti-tumor activity through augmented NK cytotoxicity. **Cancer Letters**, v. 272, n. 2, p. 285-295, 2008.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175-1183, 2007.

LIU, C. C. et al. Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an in vivo canine model of transmissible venereal tumor. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 57, n. 4, p. 479-491, 2008.

LOISA, P. et al. Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 47, n. 3, p. 319-325, 2003.

MACEWEN, E. G. Transmissible venereal tumor. In: **Small animal clinical oncology**. Philadelphia Saunders, 2001. cap. 29c, p.547-573.

MACKIN, A. J.; ALLEN, D. G.; JOHNSTON, I. B. Effects of vincristine and prednisone on platelet numbers and function in clinically normal dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 1, p. 100-108, 1995.

MANNING, P. J.; MARTIN, P. D. Metastasis of Canine Transmissible Venereal Tumor to the Adenohypophysis. **Pathologia Veterinaria Online**, v. 7, n. 2, p. 148-152, 1970.

MARCHAL, T. et al. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 57, n. 1-2, p. 1-11, 1997.

MORALES, E., GONZÁLEZ, C. Frecuencia de tumor venéreo transmisible en perros de la ciudad de México entre 1985 y 1993. **Veterinaria México**, v. 26, n. 3, p. 3, 1995.

MOULTON, J. E. **Tumours of domestic animals**. 3rd. Berkeley: University of California Press, 1990. 672.

MOZOS, E. et al. Immunohistochemical Characterization of Canine Transmissible Venereal Tumor. **Veterinary Pathology Online**, v. 33, n. 3, p. 257-263, 1996.

MUKARATIRWA, S. et al. Combination therapy using intratumoral bacillus Calmette-Guerin (BCG) and vincristine in dogs with transmissible venereal tumours: therapeutic efficacy and histological changes. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 80, n. 2, p. 92-96, 2009.

MUKARATIRWA, S.; GRUYS, E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. **The Veterinary Quarterly**, v. 25, n. 3, p. 101-111, 2004.

MURCHISON, E. P. Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. **Oncogene**, v. 27 Suppl 2, p. S19-30, 2009.

MURGIA, C. et al. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. **Cell**, v. 126, n. 3, p. 477-487, 2006.

MURRAY, M.; JAMES, Z. H.; MARTIN, W. B. A study of the cytology and karyotype of the canine transmissible venereal tumour. **Research in Veterinary Science**, v. 10, n. 6, p. 565-568, 1969.

NDIRITU, C. G.; MBOGWA, S. W.; SAYER, P. D. Extragenitally located transmissible venereal tumor in dogs. **Modern Veterinary Practice**, v. 58, n. 11, p. 940-946, 1977.

NETEA, M. G. et al. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? **Trends in Immunology**, v. 24, n. 5, p. 254-258, 2003.

NIMURA, F. et al. Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation, and differentiation of monocytes into potent dendritic cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, n. 4, p. 431-443, 2006.

OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. L. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 1 Suppl, p. S58-63, 2002.

ONISHI, H. et al. Monocyte-derived dendritic cells that capture dead tumor cells secrete IL-12 and TNF-alpha through IL-12/TNF-alpha/NF-kappaB autocrine loop. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 53, n. 12, p. 1093-1100, 2004.

OSHIMURA, M.; SASAKI, M.; MAKINO, S. Chromosomal Banding Patterns in Primary and Transplanted Venereal Tumors of the Dog. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 4, p. 1197-1203, 1973.

OTTER, W. D. et al. Effective cancer therapy with a single injection of interleukin-2 at the site of the tumour. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 48, n. 7, p. 419-420, 1999.

PALKER, T. J.; YANG, T. J. Identification and physicochemical characterization of a tumor-associated antigen from canine transmissible venereal sarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 66, n. 4, p. 779-787, 1981.

PALTRINIERI, S. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: the acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v. 31 Suppl 1, p. 125-129, 2007.

PAPAZOGLU, L. G. et al. Primary Intranasal Transmissible Venereal Tumour in the Dog: A Retrospective Study of Six Spontaneous Cases. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 48, n. 7, p. 391-400, 2001.

PARK, M.-S. et al. Disseminated Transmissible Venereal Tumor in a Dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 1, p. 130-133, 2006.

PEREIRA, J. S. et al. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, n. 1, p. 43-47, 2000.

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. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 2, p. 133-147, 1998.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, n. 2, p. 163-187, 2004.

PORGADOR, A. et al. Natural killer cell lines kill autologous beta2-microglobulin-deficient melanoma cells: implications for cancer immunotherapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 24, p. 13140-13145, 1997.

POWERS, R. D. Immunologic properties of canine transmissible venereal sarcoma. **American Journal of Veterinary Research**, v. 29, n. 8, p. 1637-1645, 1968.

REBBECK, C. A.; LEROI, A. M.; BURT, A. Mitochondrial Capture by a Transmissible Cancer. **Science**, v. 331, n. 6015, p. 303, 2011.

REBBECK, C. A. et al. Origins and evolution of a transmissible cancer. **Evolution**, v. 63, n. 9, p. 2340-2349, 2009.

RICKARDS, D. A. Cryotherapy on a transmissible venereal tumor in a male dog. **Canine Practice**, v. 10, n. 6, p. 3, 1983.

RODRIGUES, G. N.; ALESSI, A. C.; LAUS, J. L. Intraocular Transmissible Venereal Tumor in a Dog. **Ciência Rural**, v. 31, p. 141-143, 2001.

ROGERS, K.; WALKER, M.; DILLON, H. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 34, n. 6, p. 463-470, 1998.

ROGERS, K. S. Transmissible venereal tumor. **Compendium Continuing Education Article**, v. 19, n. 9, p. 1036-1042, 1997.

SCHETTER, A. J.; HEEGAARD, N. H.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 37-49, 2010.

SHVIDEL, L. et al. Vincristine-loaded platelet infusion for treatment of refractory autoimmune hemolytic anemia and chronic immune thrombocytopenia: rethinking old cures. **American Journal of Hematology**, v. 81, n. 6, p. 423-425, 2006.

SOBREIRA, M. F. R. et al. Ação hematológica do sulfato de vincristina sobre a celularidade sanguínea central e periférica em cães. **Ars Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 169-174, 2004.

THRALL, D. E. Orthovoltage Radiotherapy of Canine Transmissible Venereal Tumors. **Veterinary Radiology**, v. 23, n. 5, p. 217-219, 1982.

TINUCCI-COSTA, M. **Utilização do fator de transferência dialisável (TFd) e RNA imune na imunoterapia de cães portadores naturais do tumor venéreo transmissível (TVT)**. 1994. 129 (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária uma introdução**. 8. Rio de Janeiro: Saunders:elsevier, 2009.

TOURKOVA, I. L. et al. Restoration by IL-15 of MHC class I antigen-processing machinery in human dendritic cells inhibited by tumor-derived gangliosides. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 3045-3052, 2005.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-859, 2002.

TSELEPIS, C. et al. Tumour necrosis factor-alpha in Barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. **Oncogene**, v. 21, n. 39, p. 6071-6081, 2002.

ULLOA, L.; TRACEY, K. J. The "cytokine profile": a code for sepsis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 2, p. 56-63, 2005.

VILČEK, J.; FELDMANN, M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 4, p. 201-209, 2004.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J., Eds. **Schalm's Veterinary Hematology**. Ames: Wiley-Blackwell, p.1232, 6 ed. 2010.

YANG, T. J. Metastatic transmissible venereal sarcoma in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 190, n. 5, p. 555-556, 1987.

YANG, T. J.; JONES, J. B. Canine Transmissible Venereal Sarcoma: Transplantation Studies in Neonatal and Adult Dogs. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 6, p. 1915-1918, 1973.

YANG, T. J.; PALKER, T. J.; HARDING, M. W. Tumor size, leukocyte adherence inhibition and serum levels of tumor antigen in dogs with the canine transmissible venereal sarcoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy** v. 33, n. 4, p. 255-262, 1991.

ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P. C. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. **Advances in Immunology**, v. 27, p. 51-177, 1979.