

## IMUNO-EXPRESSÃO DE COX-2, CASPASE3, KI67E SURVIVIN EM TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO

Sandra Bassani Silva<sup>1</sup>  
Haline Feo Ballesteros<sup>2</sup>  
Luis Mauricio Montoya Flórez<sup>1</sup>  
Noeme Sousa Rocha<sup>3</sup>

### RESUMO

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma neoplasia de células redondas de aspecto plasmocitóide ou linfocitóide. O tumor apresenta várias particularidades. Nos últimos anos, tem-se evidenciado aumento progressivo de tumores com elevados percentuais de agressividade e variável resposta à quimioterapia, inclusive resistência; desta forma, tentar prever este comportamento torna-se importante para auxiliar decisões quanto ao prognóstico e manejo do tumor antes e durante a terapia. Sabendo-se que a utilização da survivina, bem como da caspase-3, do Ki-67 e da COX-2 são importantes para auxiliar no prognóstico, no manejo do paciente e na monitoração da doença durante e após a terapia, este trabalho visou observar em TVTs diferenças na expressão dos imunomarcadores acima citados. Para tal, foi utilizada a técnica de imunocitoquímica em preparações citológicas de 30 tumores de cães atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, Campus de Botucatu e os dados analisados pelo teste de spearman ( $p < 0,05$ ). A positividade da survivina variou de 96,15 a 100% em 200 células contadas por amostra, sendo sua principal localização citoplasmática. A marcação pelo anticorpo anti-caspase-3 nos 30 casos de TVT foi baixa, variando de 0 a 6,5% de positividade em 200 células contadas. Em 21 casos, foi possível observar marcação pelo Ki-67, e houve uma média de positividade de 15,57%. Finalmente, em todos os casos houve expressão de COX-2 com valores que variaram de 90,66 a 100% de positividade em 200 células contadas, exceto por um caso que apresentou 24,5% de positividade. Em conclusão, é possível que o emprego destes marcadores no TVT possa auxiliar no estabelecimento de um tratamento diferenciado, pelo que recomendamos, avaliar sua expressão comparando com o tipo de resposta à terapia.

**Palavras-chave:** imunocitoquímica, quimioterapia, tumor.

## COX-2, CASPASE 3, KI67 AND SURVIVIN IMMUNOEXPRESSION IN CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR

### ABSTRACT

Transmissible venereal tumor is a neoplasm of round cell plasmocitoid and lymphocytoid aspect. The tumor present several particularities, for example, in the recent years has been evidenced a progressive increase of tumor with high percentages of aggressiveness and different response to chemotherapy, including resistance. Research this compartment to predict this behavior becomes important to aid decision as to the prognosis and management of the tumor before and during therapy. It is know that the use of the survivin, caspase-3,

<sup>1</sup> Laboratório de Patologia Veterinária Comparada, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP-Botucatu

<sup>2</sup> Laboratório de Patologia Veterinária Comparada, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP-Botucatu. Contato principal para correspondência.

<sup>3</sup> Professora do Departamento de Clínica Veterinária, Laboratório de Patologia Veterinária Comparada, FMVZ, UNESP-Botucatu.

Ki67 and COX-2 are important to aid prognosis, the patient management and monitoring the tumor during and after therapy. This study aimed to identify differences in the expression of the above mentioned immunomarkers in TVT. For this purpose, the technique of immunocytochemistry on cytological preparations of 30 tumors of dogs examined at the Veterinary Hospital FMVZ-UNESP, Botucatu was used and the data analyzed by the spearman test ( $p < 0,05$ ). The survivin positivity ranged from 96.15 to 100% in 200 cells counted per sample, and its main cytoplasmic localization. The labeling by the anti-caspase-3 in 30 cases of TVT was low, ranging from 0 to 6.5% positivity in 200 cells counted. In 21 cases, it was observed by Ki-67 labeling, and there was an average of 15.57% positivity. Finally, in all cases there was expression of COX-2 with values ranging from 90.66 to 100% positivity in 200 cells counted, except for one case which showed 24.5% positivity. In conclusion, it is possible that the use of these markers in the TVT may assist in establishing a differential treatment, and we recommend, evaluate its expression compared with the type of response to therapy.

**Keywords:** immunochemistry, chemotherapy, tumor.

## IMUNOEXPRESIÓN DE COX-2, CASPASE 3, KI67 Y SURVIVIN EN TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO

### RESUMEN

El tumor venéreo transmisible (TVT) es una neoplasia de células redondas de aspecto plasmocitóide o linfocitoide. El tumor presenta varias particularidades, por ejemplo, en los últimos años se ha evidenciado aumento progresivo de tumores con elevados porcentajes de agresividad y variable respuesta a la quimioterapia, inclusive resistencia; desta forma, intentar predecir este comportamiento se torna importante para auxiliar decisiones relacionadas con el pronóstico y manejo del tumor antes y durante de la terapia. Se sabe que la utilización de la survivina, así como la caspasa-3, del Ki-67 y de la COX-2, son importantes para auxiliar el pronóstico, manejo del paciente y el monitoramiento de un tumor durante la terapia, así, este trabajo busco identificaren TVTs la diferencia en la expresión de los inmunomarcadores citados. Para ello, fue utilizada la técnica de inmunocitoquímica en preparaciones citológicas de 30 tumores de caninos atendidos en el Hospital Veterinario de la FMVZ-UNESP, Campus Botucatu y los datos analizados a través del test de spearman ( $p < 0,05$ ). La positividad de la survivina vario de 96,15 % a 100% en 200 células contadas. La marcación anti-caspasa -3 en los 30 casos de TVT fue baja variando de 0% a 6,5%. En 21 casos fue posible observar marcación por el Ki67, y hubo una media de positividad de 15,57%. Finalmente, en todos los casos hubo expresión de COX-2 con valores que variaron de 99,66 % a 100% de positividad en 200 células contadas, excepto por un caso que presento 24,5 % de positividad. En conclusión, es posible que el empleo de estos marcadores en TVT puedan auxiliar el establecimiento de un tratamiento diferenciado, por lo que recomendamos, evaluar su expresión comparada con el tipo de respuesta a la terapia.

**Palabras clave:** inmunocitoquímica, quimioterapia, tumor.

### INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível (TVT) desperta nos pesquisadores em oncologia grande interesse por diversas características, entre elas sua origem controversa (1,2), resistência a

quimioterapia (3) e um comportamento agressivo de alguns subtipos celulares (4), além de se prestar como um excelente modelo de investigação para neoplasia comparada (5,6).

Os processos de proliferação, diferenciação e morte-celular que ocorrem nas neoplasias são fundamentais para o entendimento do comportamento biológico do tumor (7,8). Portanto, estudos do índice de proliferação celular e da taxa de apoptose das células neoplásicas são de extrema importância para a determinação da agressividade tumoral e do monitoramento da neoplasia (9-11).

O crescimento tumoral é determinado por três fatores principais, dentre eles o tempo do ciclo celular, a porcentagem das células em proliferação e o número de células perdidas. Nas últimas duas décadas, numerosos estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos tem correlacionado o desenvolvimento e a progressão do tumor com a presença da ciclooxigenase-2 (COX-2) nas células neoplásicas do homem e dos animais (12-15).

Atualmente, sabe-se que a COX-2 está intimamente relacionada com o desenvolvimento de tumores, afetando sua progressão pela inibição da apoptose, além de promover angiogênese, invasão, e proliferação de células tumorais (15). Ela é considerada o “primeiro gene imediato”, formada quando a célula é estimulada e participa de processos como inflamação e carcinogênese (13).

A sua superexpressão tem sido demonstrada em uma variedade de doenças malignas, tais como, cânceres de pulmão, ovário e colo do útero, sendo geralmente associada a resultados de sobrevivência desfavoráveis (14,16,17). O Ki-67, um antígeno de proliferação celular expresso durante todas as fases do ciclo celular, exceto G0, também é um parâmetro confiável de que a célula mantém a capacidade de se proliferar, possuindo alta viabilidade (18).

Estudos da morfologia e da imunocitoquímica de tumores no homem e em modelos animais evidenciam que a progressiva resistência à apoptose é uma das características marcantes da grande maioria dos cânceres (10,19,20), sendo importante inclusive na determinação de sua agressividade (21,22). A apoptose envolve proteases, dentre elas a caspase-3, responsáveis por regular ativadores que clivam proteínas nucleares e do citoesqueleto, induzindo apoptose e morte celular irreversível (18).

Knauer et al. (10), observaram que uma redução da apoptose tumoral tem sido correlacionada com a expressão da survivina, o que leva ao aumento da resistência do câncer a terapia e a redução do tempo de sobrevivência do paciente. Sendo a survivina uma potente inibidora da caspase, sua superexpressão nas células neoplásicas implica na resistência a diferentes estímulos apoptóticos, incluindo a quimioterapia (23,24).

Estudos imunocitoquímicos têm ajudado a auxiliar no prognóstico, no manejo do paciente e na monitoração da doença durante e após a terapia. Sabendo-se que a utilização da survivina, bem como da caspase-3, Ki-67 e da COX-2 são importantes para tal, este estudo visou, identificar as taxas de expressão do Ki-67, da caspase-3, da survivina e da COX-2, em TVTs.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Dados clínicos dos animais

O estudo foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu, São Paulo, Brazil. Amostras foram retiradas a partir de 30 cães com diagnóstico citológico de tumor venéreo transmissível (TVT) (25). Os animais foram selecionados no Hospital Veterinário, UNESP-Botucatu, sem restrição de sexo, raça ou idade.

### Coleta do material tumoral

Para coleta do material foi realizada a punção ou esfoliação da massa e o conteúdo foi colocado sobre lâminas histológicas, procedendo-se imediatamente a extensão do material (26). As lâminas foram secas, fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa para a avaliação citomorfológica.

Um segundo aspirado foi realizado, suspendendo-se as células em 1,5mL de PBS livre de Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup> gelado. Esta suspensão foi centrifugada com velocidade entre 550 e 600 rpm, durante três minutos e o conteúdo colocado em lâminas que foram posteriormente utilizadas para realização das técnicas de imunocitoquímica (27).

### Avaliação citomorfológica

As preparações citológicas coradas pelo Giemsa foram submetidas à avaliação da morfologia celular, de acordo com as características do tipo celular predominante da seguinte forma: mais de 60% das células de TVT com morfologia ovóide, citoplasma abundante e núcleo localizado excentricamente foram classificados como TVTs plasmocitóides; mais de 60% de células de TVT com morfologia arredondada, citoplasma escasso e núcleo redondo e central como TVTs linfocitóides.

Os esfregaços corados pelo Giemsa foram avaliados com diferentes objetivas para detalhamento das características celulares e contagem de células, sendo contados em cada lâmina no mínimo dez campos aleatórios não sobrepostos para a obtenção da classificação do tipo celular predominante, totalizando 100 células de cada amostra.

### Avaliação imunocitoquímica

Na imunocitoquímica, foram utilizados os anticorpos survivina, caspase3, Ki-67 e COX-2, como descrito na tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos utilizados na marcação de amostras citológicas de tumor venéreo transmissível.

Anticorpo	Clone	Marca	Tipo	Concentração
Caspase-3	Asp 175	CellSignaling	policlonal	1:200
Survivin	5E8 - Hu	Labvision	monoclonal	1:100
Ki-67	MIB-1	DakoCytomation	monoclonal	1:50
COX-2	CX-294	DakoCytomation	monoclonal	1:50

Para a análise imuno-citoquímica, as lâminas contendo as células foram permeabilizadas, hidratadas, a seguir feito o bloqueio da peroxidase endógena em uma solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes, durante 20 minutos, posteriormente, seguiu-se com três incubações, a primeira com os anticorpos primários em câmara úmida por 18 horas (“overnight”) a 4°C., a segunda com um anticorpo secundário universal (Universal Biotinilado DAKO K0690® Carpintería EU) e por fim, o complexo streptoavidinaPeroxidase (DAKO K0690® Carpintería EU). A revelação feita com Diaminobenzidina (DAB DAKO K3468® Carpintería EU) e a Contra-coloração: com Hematoxilina de Meyer. Posteriormente a montagem das lâminas, para a análise.

Lâminas de controle negativo foram processadas juntamente com as demais, onde foi suprimido o anticorpo primário na incubação e substituído por imunoglobulinas de camundongo (para os anticorpos monoclonais) e coelho (para os anticorpos policlonais).

As análises imunocitoquímicas foram realizadas com o auxílio do programa de análise de imagens (QWin v3.0 Leica) e uma câmera digital (Leica DFC) acoplada a um microscópio (Leica DMLD). Para avaliação do percentual de positividade foram contadas 200 células de TVT consecutivas no aumento de 400x, completando o campo todo, sendo assinaladas as

células que apresentavam reação positiva e negativa separadamente, bem como anotados os padrões de marcação (nuclear, citoplasmático, nuclear e citoplasmático).

### Análise estatística

Para as análises dos dados, foi empregado o programa Statistica7 (Stat soft). Foram utilizados testes não paramétricos de correlação de Spearman para correlacionar os marcadores imunocitoquímicos, com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

No total, foram coletados 30 TVTs, provenientes de cães de Botucatu e cidades vizinhas, como São Manuel, Laranjal Paulista, Barra Bonita, Bauru entre outras, sendo que 18 eram machos e 12 eram fêmeas, com idades variando entre um e 14 anos, sendo que 70% dos animais estavam concentrados na faixa entre dois e seis anos.

O exame citológico do tumor permitiu diagnosticar e classificá-los, entretanto, a morfologia plasmocitóide foi a que predominou com 93,34% dos casos, seguido pelo linfocitóide (6,66%) (Figura 1).

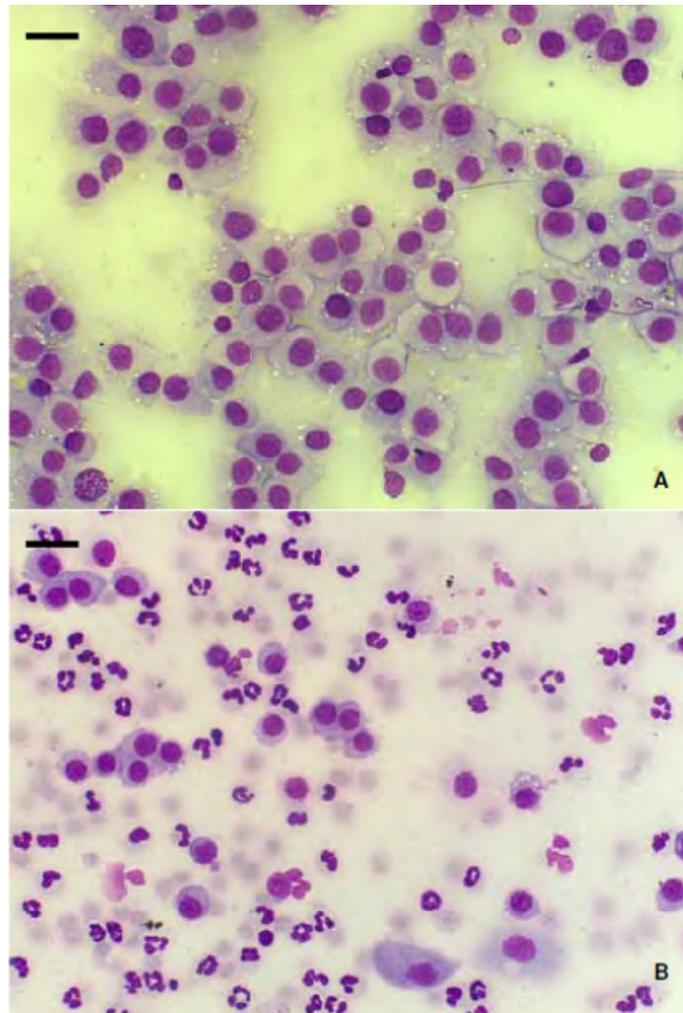


Figura 1. Amostras citológicas de tumor venéreo transmissível dos diferentes tipos citomorfológicos: **A.** padrão plasmocitóide (predomínio de células ovóides, citoplasma amplo e núcleo excêntrico); **B.** padrão linfocitóide (predomínio de células redondas, citoplasma escasso e alta relação núcleo:citoplasma). Giemsa, barra: 20 $\mu$ m.

A expressão da survivina foi observada nos 30 esfregaços de TVT estudados (Figura 2a), sendo que sua positividade variou de 96,15 a 100% em 200 células contadas. A principal localização da marcação foi citoplasmática e em dois casos, foi citoplasmática e nuclear.

A marcação pelo anticorpo anti-caspase-3 foi baixa, variando de 0 a 6,5% de positividade em 200 células contadas (Figura 2b). Uma observação interessante é que em 11 esfregaços houve marcação nuclear, além da citoplasmática.

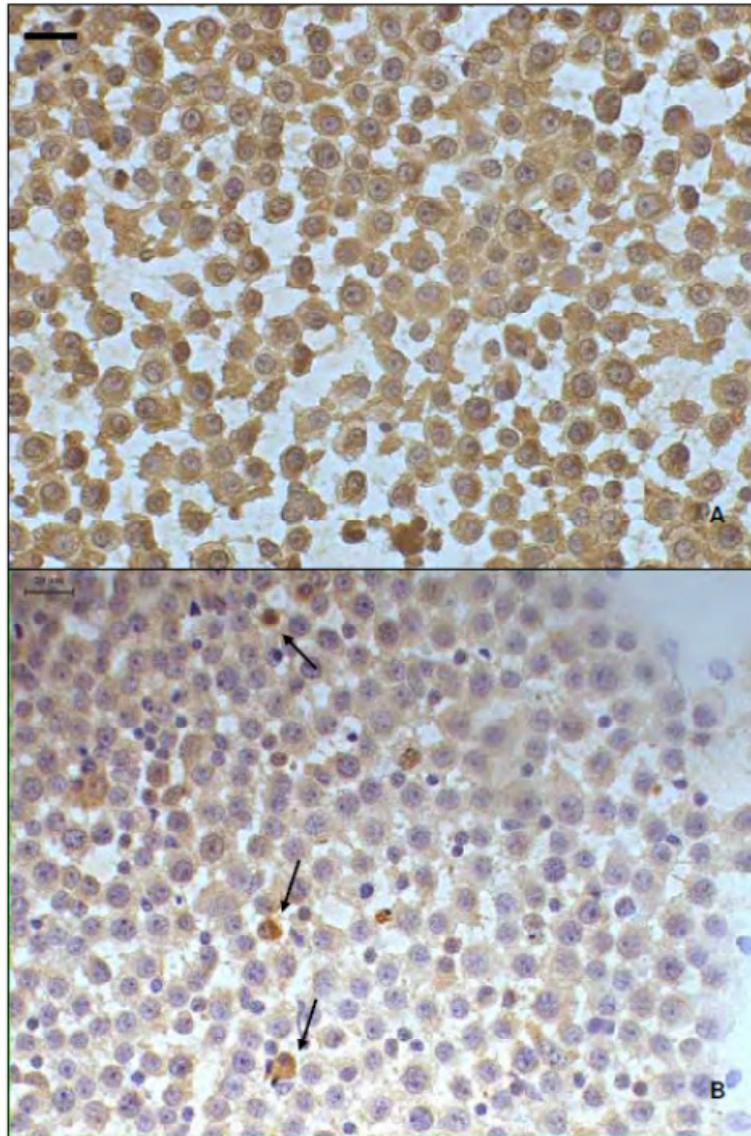


Figura 2. Marcação pelos anticorpos em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível (TVT) canino: **A.** anticorpo monoclonal anti-survivina; **B.** anticorpo policlonal anticaspase-3; células com marcação citoplasmática (setas). Cromógeno DAB, contra coloração hematoxilina de Harris; barra: 20µm.

Em 21 esfregaços, foi possível observar marcação pelo Ki-67, (Figura 3a) e houve uma média de positividade para o Ki-67 de 15,57 %. Finalmente, todos os esfregaços de TVT apresentaram expressão de COX-2 (Figura 3b). Os valores variaram de 90,66 a 100% de positividade em 200 células contadas, exceto por um caso que apresentou 24,50% de positividade.

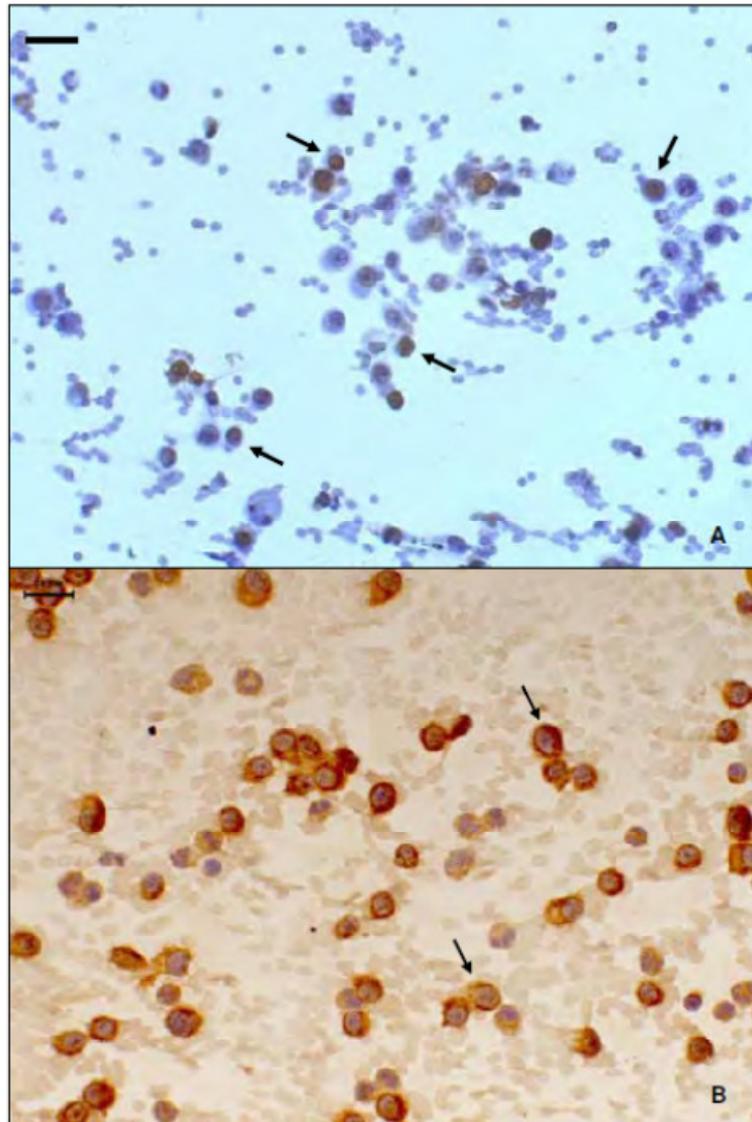


Figura 3. Marcação pelos anticorpos em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível (TVT) canino: **A.** anticorpo monoclonal Ki-67 (clone Mib-1); células com marcação nuclear (setas); **B.** anticorpo monoclonal anti-COX-2; observar marcação ao redor do núcleo (setas). Cromógeno DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris; barra: 20µm.

## DISCUSSÃO

Os dados epidemiológicos obtidos dos animais deste trabalho foram os seguintes: sem predileção por sexo, raça, e acesso constante a rua, de forma semelhante aos descritos na literatura (28,29). Por outro lado, os dados obtidos nesta pesquisa, bem como de outras desenvolvidas pelo nosso grupo não diferem com relação idade e sexo (28-31).

A classificação morfológica do tumor em plasmocitoide, linfocitoide e misto padronizada e já bem estabelecida pelo nosso grupo, também foi aplicada nessa pesquisa. Entretanto, houve predominância de 93,34% para plasmocitoide. Essa morfologia vem se repetindo ao longo dos estudos, principalmente em TVTs com tempo de evolução maior. Em trabalhos realizados dentro do grupo observou-se entre 74% a 95%, nessa morfologia (28-31).

Supomos que os TVTs iniciam-se como linfocitóides, tornam-se mistos e depois se tornam plasmocitóides. Em um trabalho realizado por Amaral (29), os casos de TVT atendidos no HV – UNESP – Botucatu, foram classificados com relação à evolução clínica

em recentes (com até três semanas de evolução), estabelecidos (com três a oito semanas de evolução) ou antigos (com mais de oito semanas) e verificou-se que os tumores antigos eram os predominantes com 52,5% (86 casos), dos 164 casos estudados. Isso reforça o fato dos tumores encontrados no presente estudo terem sido a maioria de padrão plasmocitóide, uma vez que os proprietários demoram em levar o animal ao atendimento clínico.

O resultado da marcação imunocitoquímica permitiu observar a expressão da survivina em 28 amostras de TVT a nível citoplasmático (Figura 2a), e em dois casos, a marcação foi citoplasmática e nuclear. A localização nuclear ou citoplasmática da survivina tem importante influência na progressão tumoral (32). Survivina tem sido encontrada na mitocôndria de células cancerígenas e, diante de estímulos apoptóticos, são rapidamente liberadas no citoplasma onde previnem ativação de caspases e inibem a apoptose (33).

Quando localizadas no núcleo, parecem aumentar a capacidade de reparo de rupturas de filamentos de DNA, principalmente em células cancerígenas (24). Ela regula a fase G2/M do ciclo celular por se associar aos fusos dos microtúbulos mitóticos, e inibe diretamente a atividade da caspase-3 e da caspase-7 (34). Em um estudo feito em câncer de mama na mulher, observou-se correlação entre a expressão da survivina e da caspase-3 com o grau histológico do tumor, porém não houve correlação entre a expressão da survivina com a caspase-3 (35). No presente estudo, a expressão da survivina quando comparada com a expressão da caspase-3 pelo método não paramétrico de correlação de Spearman, também não mostrou correlação ( $p=0,06$ ), resultado semelhante a Nassar et al. (35). Porém, foi constatado que o número de células marcadas pela caspase-3 foi pequeno, fato esperado frente a intensa marcação da survivina.

Necochea-Campion et al. (32), afirmam que localização nuclear ou citoplasmática da survivina e sua correlação com prognóstico ainda é controversa. Alguns autores citam que a localização nuclear tem prognóstico pior (36,37), porém outros (38,39) sugerem que esta questão exige uma investigação mais aprofundada. Sua super-expressão está associada ainda com a resistência a radiação e quimioterapia (32,40), dentre eles a vincristina, cisplatina, entre outros (41).

A marcação pelo anticorpo anti-caspase-3 nas 30 amostras de TVT foi baixa. As caspases são proteases dependentes de cisteína e importantes mediadores da apoptose. Estudos tem confirmado a contribuição de vias apoptóticas desreguladas no desenvolvimento e progressão do câncer (42). Em linfomas caninos, o índice apoptótico, avaliado pela caspase-3, não é diferente entre os tumores de alto e baixo grau de malignidade, nem entre os linfomas T e B (43). Já nos tumores de mama em cadelas, DeNardi (44) observou aumento da imunomarcação para caspase 3 nos carcinomas de mama que metastatizaram e nas metástases pulmonares. Nos adenomas, carcinomas não metastáticos e nos carcinomas inflamatórios a taxa de apoptose celular foi baixa e sem diferença entre esses grupos.

Nos homens, neoplasias altamente agressivas possuem uma expressão citoplasmática menor de caspase-3 que as neoplasias de grau baixo (45,46) e as que apresentam marcação difusa tendem a apresentar pior prognóstico (45). Nos casos de TVT não foi observada diferença de marcação da caspase-3 entre os animais que apresentavam metástases e os que possuíam apenas TVT genital, sendo que a marcação foi citoplasmática difusa e com positividade baixa, o que sugere um comportamento agressivo do TVT.

Já para a marcação pelo Ki-67, em 21 amostras foi possível a contagem de células marcadas (Figura 3a) e houve uma média de positividade de 15,57 %, assemelhando-se aos resultados relatados por Greattie et al. (47), que encontraram média de 10,8% nos esfregaços citológicos de TVT.

Segundo Yang et al. (48), os índices do Ki-67 para tumores mamários malignos em mulheres eram significativamente maiores que dos tumores benignos ou das hiperplasias. Estes achados foram consistentes com os resultados de estudos prévios com tumores

mamários caninos (49,50), o que torna a marcação imunoistoquímica para o anticorpo Ki-67 um procedimento confiável na avaliação da malignidade dos tumores mamários. Quando analisada a marcação com Ki-67 para proliferação celular, não se notaram diferenças nos índices de proliferação entre os TVTs plasmocitóides e linfocitóides.

Finalmente, todas as 30 amostras de TVT analisadas neste estudo, apresentaram expressão de COX-2 (Figura 3b) e não houve diferença entre os tumores menos agressivos e mais agressivos.

Em mastocitomas cutâneos caninos, a expressão de COX-2, foi maior nos tumores grau III, seguidos pelo grau II e I, porém em todos os graus de diferenciação histológica, a imunomarcação foi superior a 50% e de intensidade semelhante (51). Já nos tumores mamários de cadelas, a expressão de COX-2 foi diferente entre os tumores metastáticos e não metastáticos, sendo maior neste último grupo, o que confere a esta imunomarcação um potencial preditivo de possibilidade de metástase (52,44).

A super-expressão de COX-2 tem sido demonstrada em uma variedade de neoplasias, dentre elas pulmão, ovário e colo do útero, sendo geralmente associada a resultados de sobrevivência desfavoráveis (15).

Devido à alta expressão de COX-2 nos casos de TVT aqui estudados, sugere-se que nos casos mais resistentes ao tratamento com vincristina, possa se associar inibidores de COX-2 ao tratamento. No teste não paramétrico de correlação de Spearman, com nível de significância ( $p < 0,05$ ), quando comparado a expressão da COX-2 com a caspase-3, houve correlação significativa ( $p = -0,20$ ). Comparando a expressão da COX-2 com o Ki-67, também houve correlação significativa ( $p = -0,01$ ). Isso se deve ao fato de que quando há alta expressão de COX-2, há diminuição da apoptose, e aumento da proliferação celular, o que foi observado pela baixa taxa de positividade para caspase-3 nos TVTs e média positividade para Ki-67. Porém, quando correlacionado COX-2 com survivina, não houve diferença significativa ( $p = 0,16$ ), sugerindo que a alta expressão da COX-2 é devida a sua ação na promoção da angiogênese, uma vez que os TVTs são altamente irrigados e hemorrágicos.

Vale ressaltar que durante as análises das lâminas de TVT, a distribuição da marcação da COX-2 era, na maioria dos casos, como “dots” perinucleares. Não há na literatura consultada nenhuma descrição desse tipo de marcação em outras neoplasias, deste modo seria interessante a investigação se esta marcação relaciona-se com o grau de agressividade tumoral, ou não há nenhuma influência, uma vez que nos casos da caspase-3, o tipo de marcação também se torna útil (Figura 3b).

Em conclusão, a prevalência no Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu do diagnóstico citopatológico de TVT é o de aspecto plasmocitóide. Estes achados indicam diagnóstico tardio, sendo que durante o período de evolução ocorrem alterações na morfologia da célula tumoral, na fase de implantação, linfocitóide e posteriormente plasmocitóide, da mesma forma, diante dos resultados da imunocitoquímica, é possível que o emprego destes marcadores no TVT possa auxiliar o tratamento diferenciado, pelo que recomendamos avaliar sua expressão comparando com o tipo de resposta à terapia.

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

## REFERÊNCIAS

1. Mozos E, Méndez A, Gómez-Villamandos JC, Martín De Las Mulas J, Pérez J. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. *Vet Pathol.* 1996;33(3):257-63.

2. Mukaratirwa S, Gruys E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *Vet Q.* 2003;25(3):101-11.
3. Boscos CM, Tontis DK, Samartzi FC. Cutaneous involvement of TVT in dogs: a report of two cases. *Canine Pract.* 1999;24(4):6-11.
4. Amaral AS, Ferreira I, Colodel MM, Salvadore DMF, Rocha NS. DNA damage in canine transmissible venereal tumor cells. *Rev Lusófona Cienc Med Vet.* 2011;4:1-5.
5. Hsiao YW, Liao KW, Hung SW, Chu RM. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;87(1-2):19-27.
6. Liao KW, Hung SW, Hsiao YW, Bennett M, Chu RM. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;92(3-4):149-62.
7. Thompson HJ, Strange R, Schedin PJ. Apoptosis in the genesis and prevention of cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1992;1(7):597-602.
8. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13(3):239-52.
9. Aoyagi K, Kohfuji K, Yano S, Murakami N, Miyagi M, Takeda J, et al. The expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, p21, and apoptosis in primary gastric lymphoma. *Surgery.* 2002;132(1):20-6.
10. Knauer SK, Krämer OH, Knösel T, Engels K, Rödel F, Kovács AF, et al. Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *FASEB J.* 2007;21(1):207-16.
11. Sofocleous CT, Garg SK, Cohen P, Petre EN, Gonen M, Erinjeri, JP, et al. Ki 67 is an independent predictive biomarker of cancer specific and local recurrence-free survival after lung tumor ablation. *Ann Surg Oncol.* 2013;20 Suppl 3:S676-83.
12. Beam SL, Rassnick KM, Moore AS, McDonough SP. An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in various feline neoplasms. *Vet Pathol.* 2003;40(5):496-500.
13. Mao XY, Wang XG, Lv XJ, Xu L, Han CB. COX-2 expression in gastric cancer and its relationship with angiogenesis using tissue microarray. *World J Gastroenterol.* 2007;13(25):3466-71.
14. Jiang H, Wang J, Zhao W. Cox-2 in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2013;419:26-32.
15. Song J, Su H, Zhou Y, Guo L. Cyclooxygenase-2 expression is associated with poor overall survival of patients with gastric cancer: a meta-analysis. *Dig Dis Sci.* 2014;59(2):436-45.

16. Lee JY, Myung SK, Song YS. Prognostic role of cyclooxygenase-2 in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of observational studies. *Gynecol Oncol.* 2013;129(3):613-19.
17. Huang M, Chen Q, Xiao J, Liu C, Zhao X. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2013;132(2):363-73.
18. Sofocleous CT, Garg S, Petrovic LM, Gonen M, Petre EN, Klimstra DS, et al. Ki-67 is a prognostic biomarker of survival after radiofrequency ablation of liver malignancies. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(13):4262-9.
19. Zornig M, Hueber A, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2001;1551(2):F-1-37.
20. Barcinski MA. Morte celular. In: Ferreira CG; Rocha JC. *Oncologia molecular.* São Paulo: Atheneu; 2004. p.57-63.
21. Ruiz CM, Soto GMT, Zuccari DAPC. Estudo da apoptose e da proliferação celular no tumor venéreo transmissível canino. *ARS Veterinaria.* 2004;20(1):107-14.
22. Hensley P, Mishra M, Kyprianou N. Targeting caspases in cancer therapeutics. *Biol Chem.* 2013;394(7):831-43.
23. Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2003;2:6.
24. Coumar MS, Tsai FY, Kanwar JR, Sarvagalla S, Cheung CH. Treat cancers by targeting survivin: just a dream or future reality? *Cancer Treat Rev.* 2013;39(7):802-11.
25. Rocha NS. Citologia aspirativa por agulha fina em medicina veterinária (I). *Cães e Gatos.* 1998;79(13):14-6.
26. Cowell RL, Tyler RD. Cytology of cutaneous lesions. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1989;19(4):769-94.
27. Caniatti M, Roccabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, Moore PF. Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fineneedle aspiration biopsy. *Vet Pathol.* 1996;33(2):204-12.
28. Amaral AS, Gaspar LF, Bassini-Silva S, Rocha NS. Cytological diagnostic of transmissible venereal tumor in the Botucatu region, Brazil (descriptive study: 1994-2003). *Rev Port Cien Vet.* 2004;99(551):167-71.
29. Amaral AS. Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA [Tese]. Botucatu: Faculdade Medicina Veterinária Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2005.
30. Fonseca LS, Mota LS, Colodel MM, Ferreira I, Rocha NS. Spontaneous Canine Transmissible Venereal Tumor: association between different phenotypes and the insertion LINE-1/c-myc. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2012;25:402-08.

31. Montoya FL, Pedraza FJ, Monteiro S, Brandão CV, Rocha NS. Cytological and clinical staging of transmissible venereal tumour at the Veterinary Hospital of Botucatu. *Rev Vet Zootec.* 2013;7(2):1-17.
32. Necochea-Campion RD, Chen CS, Mirshahidi S, Howard FD, Wall NR. Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression in cancer. *Cancer Lett.* 2013;339(2):167-74.
33. Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2004;114(8):1117-27.
34. Li YH, Wang C, Meng K, Chen LB, Zhou XJ. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004;10(13):1984-8.
35. Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C. Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2008;16(2):113-20.
36. Shirai K, Suzuki Y, Oka K, Noda SE, Katoh H, Suzuki Y, et al. Nuclear survivin expression predicts poorer prognosis in glioblastoma. *J Neurooncol.* 2009;91(3):353-8.
37. Rexhepaj E, Jirstrom K, O'Connor DP, O'Brien SL, Landberg G, Duffy MJ, et al. Validation of cytoplasmic-to-nuclear ratio of survivin as an indicator of improved prognosis in breast cancer. *BMC Cancer.* 2010;10:639.
38. Vischioni B, van der Valk P, Span SW, Kruyt FA, Rodriguez JA, Giaccone G. Nuclear localization of survivin is a positive prognostic factor for survival in advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2004;15(11):1654-60.
39. Felisiak-Golabek A, Rembiszewska A, Rzepecka IK, Szafron L, Madry R, Murawska M, et al. Nuclear survivin expression is a positive prognostic factor in taxane-platinum-treated ovarian cancer patients. *J Ovarian Res.* 2011;4(1):20.
40. Athanasoula KCh, Gogas H, Polonifi K, Vaiopoulos AG, Polyzos A, Mantzourani M. Survivin beyond physiology: orchestration of multistep carcinogenesis and therapeutic potentials. *Cancer Lett.* 2014;347(2):175-82.
41. Coumar MS, Tsai FY, Kanwar JR, Sarvagalla S, Cheung CH. Treat cancers by targeting survivin: just a dream or future reality? *Cancer Treat Rev.* 2013;39(7):802-11.
42. Sanii S, Saffar H, Tabriz HM, Qorbani M, Haghpanah V, Tavangar SM. Expression of matrix metalloproteinase-2, but not caspase-3, facilitates distinction between benign and malignant thyroid follicular neoplasms. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(5):2175-8.
43. Suzano SMC. Avaliação da proliferação celular, índice apoptótico e da expressão do p53 nos linfomas caninos [Tese]. Botucatu: Faculdade Medicina Veterinária Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2007.

44. DeNardi AB. Correlação da ciclooxigenase-2 com Ki-67, p53 e caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas [Tese]. Botucatu : Faculdade Medicina Veterinária Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2007.
45. Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma. *Cancer Res.* 1999;59(20):5386-91.
46. Dukers DF, Oudejans JJ, Vos W, ten Berge RL, Meijer CJ. Apoptosis in B-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues always involves activation of caspase-3 as determined by a new in situ detection method. *J Pathol.* 2002;196(3):307-15.
47. Greatti WFP, Amaral AS, Silva SB, Gaspar LFJ, Barbisan LF, Rocha NS. Índices proliferativos do tumor venéreo canino transmissível pelas técnicas do CEC e Ki-67 na citologia aspirativa com agulha fina. *Arch Vet Sci.* 2004;9(1):53-9.
48. Yang WY, Liu CH, Chang CJ, Lee CC, Chang KJ, Lin CT. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *J Comp Pathol.* 2006;134:70-79.
49. Löhr CV, Teifke JP, Failing K, Weiss E. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with post fixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Vet Pathol.* 1997;34(3):212-21.
50. Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Castellani G, Marcato PS. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *J Vet Diagn Invest.* 2002;14(1):25-34.
51. Calderon C. Avaliação da expressão da ciclooxigenase2 e do índice de proliferação celular dos matocitomas cutâneos caninos pela histopatologia, histoquímica e imunoistoquímica [Dissertação]. Botucatu: Faculdade Medicina Veterinária Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2005.
52. Doré M, Lanthier I, Sirois J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary Tumors. *Vet Pathol.* 2003;40(2):207-12

**Recebido em: 19/08/2014**

**Aceito em: 22/04/2015**