

Tumor venéreo transmissível canino. A mais antiga linhagem clonal conhecida na natureza

Marta Zarlenga Regiani^{1*}, Marcel Vasconcellos²

¹Médica Veterinária, Discente do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais. Instituto Brasileiro de Pós-Graduação Qualittas - São Paulo - SP. E-mail: mz.regiani@gmail.com

²Médico Veterinário, Pós-Graduado em Oncologia Veterinária. Prof. MSc. Colaborador do Instituto Brasileiro de Pós-Graduação Qualittas. E-mail: marcelvasconcellos@yahoo.com.br

* Autor para correspondência

RESUMO A técnica de sequenciamento gênico, utilizada no estudo da origem clonal do tumor venéreo transmissível canino (TVTC), abriu novas possibilidades de sondar vulnerabilidades genéticas do câncer, e relações hospedeiro-tumor. De modo análogo, à evolução darwiniana, as células tumorais com maior potencial adaptativo apresentam uma vantagem seletiva em relação às células menos aptas. Desse modo, o câncer transmissível de ocorrência natural, representa um modelo ideal para a investigação evolutiva entre as células cancerosas em seu microambiente tumoral, e o macroambiente circundante. Com objetivo de discutir o impacto das recentes descobertas neste campo, realizou-se uma análise das publicações indexadas na base de dados PubMed[®] (Instituto Nacional de Saúde Americano, *National Institutes of Health*), utilizando os descritores na língua inglesa: *canine transmissible venereal tumor*, *canine transmissible venereal*, *canine transmissible*. Estudos genômicos demonstraram que a linhagem clonal do TVTC é a mais antiga linhagem tumoral conhecida (cerca de 11.000 anos), sendo transmissível por transferência alogênica. Aspectos singulares como evasão ao sistema imune do hospedeiro, também foram revisados.

Palavras chave: cães, câncer, epidemiologia

Canine transmissible venereal tumor. The oldest clonal lineage known in nature

ABSTRACT The gene sequencing technique, used in the study of the clonal origin of canine venereal transmissible tumor (CTVT), opened up new possibilities of probing genetic vulnerabilities of cancer, and host-tumor relations. Analogous to Darwinian evolution, tumor cells with higher adaptive potential present a selective advantage over less apt cells, and thus, naturally occurring transmissible cancer, represents an ideal model for the evolutionary investigation between cancer cells in their Microenvironment, and the surrounding macroenvironment. In order to discuss the impact of the recent findings in this field, an analysis of publications indexed in the PubMed[®] database (National Institutes of Health) using the English descriptors: *venereal canine transmissible Tumor*, *transmissible venereal canine*, *transmissible canine*. Genomic studies have shown that the clonal lineage of the CTVT is the oldest known tumor line (about 11,000 years old), and can be transmitted by allogeneic transfer. Unique aspects such as evasion to the host immune system were also reviewed.

Keywords: cancer, dogs, epidemiology

Tumor venéreo transmissível canino. El más antiguo linaje clonal conocido en la naturaleza

RESUMEN La técnica de secuenciación génica, utilizada en el estudio del origen clonal del tumor venéreo transmissível canino (TVTC), abrió nuevas posibilidades de sondar vulnerabilidades genéticas del cáncer, y relaciones hospedador-tumor. De modo análogo a la evolución darwiniana, las células tumorales con mayor potencial adaptativo presentan una ventaja selectiva en relación a las células menos aptas, y de ese modo el cáncer transmissível de ocurrencia natural representa un modelo ideal para la investigación evolutiva entre las células cancerosas microambiente tumoral, y el macroambiente circundante. Con el objetivo de discutir el impacto de los recientes descubrimientos en este campo, se realizó un análisis de las publicaciones indexadas en la base de datos PubMed (Instituto Nacional de Salud Americano, *National Institutes of Health*), utilizando los descriptores en la lengua inglesa: *canina transmissível venereal tumor, canina transmissível venereal, canina transmissível*. Los estudios genómicos demostraron que el linaje clonal del TVTC es el más antiguo linaje tumoral conocido (alrededor de 11.000 años), siendo transmissível por transferencia alogénica. Los aspectos singulares como evasión al sistema inmune del huésped, también se revisaron.

Palabras clave: epidemiología, cáncer, perros

Introdução

Considerada a mais antiga linhagem tumoral conhecida na natureza, o tumor venéreo transmissível canino (TVTC), originou-se das células cancerosas de um único cão que viveu há aproximadamente 11.000 anos atrás. Após a morte desse animal, essa linhagem tumoral propagou-se entre os cães, por transferência alogênica de células tumorais, principalmente, durante o coito. Ao longo dos últimos 500 anos, por meio das rotas marítimas, a doença se difundiu rapidamente por vários continentes ([Murchison et al., 2014](#)).

A extrema longevidade desta linhagem clonal propicia o estudo das dispersões históricas globais dos cães e dos homens, assim como proporciona a pesquisa de vulnerabilidades genéticas do câncer e o estudo das relações hospedeiro-tumor ([Strakova et al., 2016](#)).

De modo análogo à evolução darwiniana, as células tumorais com maior potencial adaptativo apresentam uma vantagem seletiva em relação às células menos aptas ([Hanahan & Weinberg, 2000](#)). Nesse sentido, o câncer transmissível de ocorrência natural, pode representar um modelo ideal para a investigação evolutiva entre as células cancerosas em seu microambiente tumoral, e o macroambiente externo ([Ujvari et al., 2016](#)).

Até o momento, foram descobertos e identificados três tipos de cânceres naturalmente transmissíveis em animais, incluindo o tumor venéreo transmissível canino (TVTC), o tumor facial do diabo da tasmânia (*Sarcophilus harrisi*),

e um câncer fatal em moluscos (*Mya arenaria*) ([Tingting et al., 2015](#)).

Com objetivo de discutir o impacto das recentes descobertas neste campo, realizou-se uma análise das publicações indexadas na base de dados PubMed® (Instituto Nacional de Saúde Americano, *National Institutes of Health*), utilizando os descriptores na língua inglesa: *canine transmissível venereal tumor; canine transmissível venereal; canine transmissível*.

Características singulares do tumor venéreo transmissível canino (TVTC)

O tumor venéreo transmissível canino (TVTC) apresenta características singulares, uma vez que não possui origem na transformação neoplásica de células normais, resultantes de mutações cumulativas em células somáticas. Seu crescimento e evolução, advém da transferência alogênica de células tumorais entre cães afetados e saudáveis, teoria corroborada pelo genótipo tumoral não se correlacionar com o genótipo de seus hospedeiros.

Outra característica marcante é sua habilidade em se evadir da rejeição imunológica, hipótese sustentada pelo fato das células do TVTC não expressarem as proteínas codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade da Classe II (MHC-II), como um mecanismo de escape à detecção imune ([Murgia et al., 2006](#)).

[Frank \(1996\)](#) aduziu que estabilidade genômica das células do TVTC, retratam a Teoria

da Seleção de Parentesco, que se baseia na premissa de que quanto maior for o grau de parentesco entre dois indivíduos, maior será o compartilhamento de material genético. Ademais, a virulência reduzida desta linhagem clonal, propiciou a sobrevivência do hospedeiro e sua transmissibilidade.

Para que se torne transmissível, as células tumorais necessitam adquirir competência tumorigênica para a transferência física das células neoplásicas, e como visto evadir-se da contínua vigilância imunológica do hospedeiro. Uma vez transmissível, o câncer deve adquirir a característica de longevidade, sem que isso cause a morte do hospedeiro ([Strakova & Murchison, 2015](#)). A longevidade de uma linhagem clonal, se associa a sua capacidade de se multiplicar indefinidamente, sendo evidente em cerca de 90%-90% dos tumores malignos, por meio da sobreexpressão da enzima telomerase ([Bryan & Cech, 1999](#)), a qual acrescenta unidades teloméricas ao cromossomo, resultando em potencial replicativo ilimitado ([Hanahan & Weinberg, 2000](#)).

Transmissibilidade do tumor venéreo transmissível canino (TVTC)

Todavia, como surgiu a noção de que o TVTC é naturalmente transmissível? Inicialmente esta hipótese se originou a partir de três linhas de observação. Na primeira linha, [Cohen \(1985\)](#) demonstrou que este tumor só podia ser transmitido por células vivas, principalmente pelo coito e experimentalmente, pela inoculação de células tumorais vivas em cães alogênicos imunocompetentes. O estudo excluiu, portanto, células mortas ou filtradas celulares. Na segunda linha, [Weber et al. \(1965\)](#), no artigo denominado “*Chromosome studies of a transplanted and a primary canine venereal sarcoma*” observaram em amostras tumorais de diversos países, que o cariótipo do TVTC era composto por 57-59 cromossomos, sendo 15-17 cromossomos metacêntricos e 42-44 acrocêntricos, diferindo do número total de cromossomos da espécie canina com 78 cromossomos, sendo 76 cromossomos acrocêntricos e um par sexual metacêntrico. Considerando que os cromossomos não são uniformes ao longo de todo o seu comprimento, uma vez que possuem uma constrição primária o centrômero, que o divide em dois braços, além de constrições secundárias, como as regiões organizadoras do nucléolo. Ao que pese essas diferenças, cada cromossomo apresenta um

padrão característico de bandas proteicas. [Oshimura et al. \(1973\)](#) estudaram as características do bandejamento cromossômicos no TVTC, corroborando com [Weber et al. \(1965\)](#), no que se refere à aneuploidia (alterações cromossômicas numéricas) deste tumor. Na terceira linha de observação, [Katzir et al. \(1985\)](#) utilizando o método de *Southern Blotting* (no qual se verifica se uma determinada sequência de DNA está ou não presente em uma amostra de DNA analisada), examinaram o estado do oncogene *c-myc* em amostras de TVTC, demonstrando uma longa inserção de um elemento nuclear intercalado (*Long interspersed nuclear elements - LINE-1*), próximo ao *c-myc* do tumor. Corroborando com este trabalho, [Liao et al. \(2003\)](#) inocularam experimentalmente em dois animais, células vivas do TVTC, observando posteriormente a inserção *LINE-1/c-myc* nos tumores resultantes, enquanto os tecidos normais não demonstraram tal inserção.

[O'Neill \(2011\)](#) observou a alta sensibilidade por meio da PCR (*Polymerase chain reaction – Reação em cadeia da polimerase*) na detecção do rearranjo do elemento *LINE-1* no gene *c-myc* no TVTC, uma vez que todas as amostras da neoplasia transmissível estudada, amplificaram um fragmento de aproximadamente 340 pb (par de bases), o que caracteriza esse rearranjo.

[Murgia et al. \(2006\)](#) aduziram que na transmissão natural, a herança de uma inserção *LINE-1/c-myc* na linha germinal, pode representar, uma predisposição ao desenvolvimento do TVTC após exposição a um agente oncogênico.

Origem clonal do tumor venéreo transmissível canino (TVTC)

[Murgia et al. \(2006\)](#), com base em vários marcadores genéticos independentes, tais como genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), microsátélites e DNA mitocondrial (mtDNA). Os pesquisadores demonstraram em cães de cinco continentes com TVTC, que este tumor surgiu de uma célula neoplásica ancestral comum.

No início de sua evolução, o clone original divergiu em dois subclados, os quais adquiriram ampla distribuição geográfica. Análises filogenéticas sugeriram que o TVTC provavelmente se originou de um lobo (*Canis lupus*) ou de uma raça de cães da Ásia Oriental, entre 200 e 2.500 anos atrás. Embora esta data seja relativamente recente, o TVTC representa a

linhagem celular somática de propagação contínua mais antiga na natureza, tendo sofrido inúmeras mitoses e transferências de hospedeiro para hospedeiro. Na visão dos pesquisadores, o TVTC não representa apenas um surto local e temporário dentro de um grupo de animais de alto parentesco, mas uma relação tumor-hospedeiro bem-sucedida de distribuição mundial. Contrapondo aos estudos de [Murgia et al. \(2006\)](#), os quais estimaram a idade do TVTC, entre 200 a 2.500 anos atrás, assim como os de [Rebbeck et al. \(2009\)](#), em 6.000 anos de idade, [Murchison et al. \(2014\)](#) sequenciaram o genoma de dois tumores do TVTC, descobrindo que esta neoplasia surgiu há aproximadamente 11.000 anos, a partir de um único cão de baixa heteroziguidade.

Na edição da *Science*, os pesquisadores descreveram a primeira sequência do genoma completo da TVTC, obtida a partir dos tumores de um cão de campo aborígene australiano de raça aleatória e um cão Cocker Americano de raça pura no Brasil. A análise de sequência genômica revelou aproximadamente 1,7 milhão de variantes somáticas compartilhadas entre os dois tumores, que se supõe ter surgido antes da separação dos tumores por limites geográficos.

O número de mutações somáticas é aproximadamente 100 vezes maior que a carga média de mutação de um tumor humano, indicando o longo período durante o qual as mutações se acumularam nessas células, e o número de alterações necessárias para desenvolver uma colônia estável ([Murchison et al., 2014](#)). Os autores aduziram que embora o genoma de dois tumores de regiões geográficas distintos analisados neste estudo, apresentassem milhares de rearranjos, alterações do número de cópias e inserções, os mesmos demonstraram carecer de heterogeneidade.

Após o sequenciamento genômico, os pesquisadores associaram a taxa de mutação do meduloblastoma humano (um câncer primário que acomete comumente a região do cerebelo em crianças) e que apresenta certa correlação entre número de mutações e a idade do paciente (43,3 mutações/ano), com o TVTC. Para isso utilizaram um “relógio molecular” e estimaram que o primeiro cão a desenvolver esta neoplasia possa ter vivido há cerca de 11.000 anos ([Murchison et al., 2014](#)).

Um fato interessante é notar que ao aplicar este conceito do “relógio molecular” sobre às mutações que ocorreram devido à divergência

clonal entre os dois subtipos encontrados neste tumor. O cronograma indicou que a disseminação global do tumor venéreo transmissível canino, provavelmente ocorreu nos últimos 500 anos, coincidindo com a era da rápida exploração humana global.

Em relação a forte identidade genética entre tumores, observada na semelhança entre os cariótipos das amostras, esta se deve a origem comum dessa neoplasia, assim como sua natureza clonal estável ([Murchison, 2009](#)). [Decker et al. \(2015\)](#) criaram o maior catálogo existente de variação genética canina e compararam este, a amostras tumorais de TVTC, isolando as mudanças somáticas dos tumores da variação genética presente no genoma do câncer fundador, o qual foi previamente reconstituído. O estudo revelou mutações somáticas críticas e precoces que provavelmente contribuíram para o aumento da transmissibilidade clonal. Ademais, estratégias de sobrevivência do TVTC, assim como as mutações sobrepostas em cada etapa da vigilância imune, forneceram os primeiros *insights* sobre as aberrações genômicas específicas subjacentes à perseverança da TVTC em canídeos ao redor do mundo.

[Tan et al. \(2015\)](#) relataram que as células tumorais sem DNA mitocondrial (mtDNA) mostram crescimento tumoral tardio, e que a formação do tumor está associada à aquisição do mtDNA a partir de células hospedeiras. [Strakova et al. \(2016\)](#) analisaram pequenas quantidades de DNA contido nas mitocôndrias (mtDNA), de tumores coletados em mais de 400 cães de 39 países, observando que em pelo menos cinco ocasiões, as células tumorais capturaram mtDNA das células de cães normais, o que sugeriu que o reabastecimento de seu mtDNA pode ajudar a promover o crescimento e deste modo, perpetuação da linhagem clonal do TVTC.

Conclusão

Apesar do indubitável progresso conceitual sobre o câncer obtido nas últimas décadas, aliado ao esforço na elucidação de seus mecanismos etiopatogênicos, estes ainda se mostram incapazes de explicar de modo coerente nossa vulnerabilidade a esta doença. Não obstante, o desenvolvimento da técnica de sequenciamento gênico, possibilitou como demonstrado, investigar a origem clonal desta linhagem celular específica, aprofundando nosso conhecimento sobre as neoplasias transmissíveis. Há que se ressaltar, o otimismo do meio científico, ao considerar a

pesquisa do câncer como uma ciência cada vez mais lógica, a partir da compreensão dos princípios subjacentes que regem a complexa biologia celular e molecular dos tumores.

Referências Bibliográficas

- Bryan, T. M. & Cech, T. R. 1999. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Current Opinion in Cell Biology*, 11, 318-324.
- Cohen, D. 1985. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. *Advances in Cancer Research*, 43, 75-112.
- Decker, B., Davis, B. W., Rimbault, M., Long, A. H., Karlins, E., Jagannathan, V., Reiman, R., Parker, H. G., Drögemüller, C. & Corneveaux, J. J. 2015. Comparison against 186 canid whole-genome sequences reveals survival strategies of an ancient clonally transmissible canine tumor. *Genome Research*, 25, 1646-1655.
- Frank, S. A. 1996. Models of parasite virulence. *The Quarterly Review of Biology*, 71, 37-78.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Katzir, N., Rechavi, G., Cohen, J. B., Unger, T., Simoni, F., Segal, S., Cohen, D. & Givol, D. 1985. "Retroposon" insertion into the cellular oncogene c-myc in canine transmissible venereal tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 1054-1058.
- Liao, K.-W., Lin, Z.-Y., Pao, H.-N., Kam, S.-Y., Wang, F.-I. & Chu, R.-M. 2003. Identification of canine transmissible venereal tumor cells using *in situ* polymerase chain reaction and the stable sequence of the long interspersed nuclear element. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15, 399-406.
- Murchison, E. P. 2009. Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. *Oncogene*, 27, S19.
- Murchison, E. P., Wedge, D. C., Alexandrov, L. B., Fu, B., Martincorena, I., Ning, Z., Tubio, J. M. C., Werner, E. I., Allen, J. & De Nardi, A. B. 2014. Transmissible dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. *Science*, 343, 437-440.
- Murgia, C., Pritchard, J. K., Kim, S. Y., Fassati, A. & Weiss, R. A. 2006. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*, 126, 477-487.
- O'Neill, I. D. 2011. Concise Review: Transmissible Animal Tumors as Models of the Cancer Stem-Cell Process. *Stem Cells*, 29, 1909-1914.
- Oshimura, M., Sasaki, M. & Makino, S. 1973. Chromosomal Banding Patterns in Primary and Transplanted Venereal Tumors of the Dog 2. *Journal of the National Cancer Institute*, 51, 1197-1203.
- Rebbeck, C. A., Thomas, R., Breen, M., Leroi, A. M. & Burt, A. 2009. Origins and evolution of a transmissible cancer. *Evolution*, 63, 2340-2349.
- Strakova, A., Leathlobhair, M. N., Wang, G.-D., Yin, T.-T., Airikkala-Otter, I., Allen, J. L., Allum, K. M., Bansse-Issa, L., Bisson, J. L. & Domracheva, A. C. 2016. Mitochondrial genetic diversity, selection and recombination in a canine transmissible cancer. *Elife*, 5, e14552.
- Strakova, A. & Murchison, E. P. 2015. The cancer which survived: insights from the genome of an 11000 year-old cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 30, 49-55.
- Tan, A. S., Baty, J. W., Dong, L.-F., Bezawork-Geleta, A., Endaya, B., Goodwin, J., Bajzikova, M., Kovarova, J., Peterka, M. & Yan, B. 2015. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metabolism*, 21, 81-94.
- Tingting, Y., Lu, W. & Guodong, W. 2015. Recent advances in transmissible tumors. *Yi Chuan= Hereditas*, 37, 1086-1094.
- Ujvari, B., Papenfuss, A. T. & Belov, K. 2016. Transmissible cancers in an evolutionary context. *BioEssays*, 38, S14-S23.
- Weber, W. T., Nowell, P. C. & Hare, W. C. D. 1965. Chromosome Studies of a Transplanted and a Primary Canine Venereal Sarcoma 2. *Journal of the National Cancer Institute*, 35, 537-547.

Article History:
Received 17 November 2017
Accepted 21 December 2017
Available online 9 January 2018

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.