



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

Paula de Sanctis

**Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC):
estudo do perfil transcricional**

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

Orientadora: Profa. Assoc. Noeme Sousa Rocha
Coorientador: Prof. Adj. João Pessoa Araújo Junior
Coorientadora: Dra. Joyce Regina Zapaterini

**Botucatu
2020**

Paula de Sanctis

Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC):
estudo do perfil transcricional

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

Orientadora: Profa. Assoc. Noeme Sousa Rocha
Coorientador: Prof. Adj. João Pessoa Araújo Junior
Coorientadora: Dra. Joyce Regina Zapaterini

Botucatu
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE. OBRIGADA.

S212t	Sanctis, Paula de Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC): : estudo do perfil transcricional / Paula de Sanctis. -- Botucatu, 2020 78 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu Orientadora: Noeme Sousa Rocha Coorientador: João Pessoa Araújo Junior; Joyce Regina Zapaterini 1. Cão. 2. Tumor Venéreo Transmissível. 3. Transcriptoma. 4. Genes. 5. Progressão; Resposta imune.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

PAULA DE SANCTIS

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO (TVTC): ESTUDO DO PERFIL TRANSCRICIONAL

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia.

Orientadora: Profa. Assoc. Noeme Sousa Rocha

Coorientador: Prof. Adj. João Pessoa Araújo Junior

Coorientadora: Dra. Joyce Regina Zapaterini

Coautor: Prof. Dr. Luis Mauricio Montoya Flórez

Coautora: Dra. Taís Fukuta da Cruz

Parcerias: Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular (IBTEC–UNESP), Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental (LCQE–IBB–UNESP), Grupo de Simulação e Modelagem Computacional da UNESP, Campus de Itapeva e Universidad Nacional de Colômbia, Bogotá, Colômbia.

Comissão examinadora:

Prof. Adj. Paulo Ricardo de Oliveira Bersano
Departamento de Patologia Veterinária
Faculdade de Veterinária - UECE - São Paulo

Prof. Assoc. José Maurício Sforcin
Departamento de Microbiologia e Imunologia
IB – UNESP – Botucatu

Botucatu, 25 de agosto de 2020

Dedicatória

Em especial, aos meus pais, Vera Lúcia Rossi Lázaro de Sanctis e Paulo Sérgio de Sanctis, à minha irmã e melhor amiga, Fernanda de Sanctis, e ao meu amado namorado Leonardo Matheus Quinzote Augusto por fazerem parte dessa etapa tão importante da minha vida, pelo amor, carinho enorme, dedicação e apoio nos momentos mais difíceis. Vocês sempre acreditaram no meu potencial, me incentivaram a dar sempre o melhor de mim e não desanimar por qualquer dificuldade. Amo muito vocês!

Aos meus amados Simba, Mirtis, Mateo, Brenda e Fumaça (*in memoriam*), dos quais tenho uma saudade infinita e aos animais que participaram involuntariamente deste estudo.

À Profa. Assoc. Noeme Sousa Rocha, minha orientadora, pelo comprometimento, apoio, incentivo, ensinamentos acadêmicos e pessoais, assim como pela incrível profissional e pessoa que é. Devo muito do que sei e aprendi a senhora desde a minha iniciação científica.

A todos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, em especial ao Prof. Dr. Luis Mauricio Montoya Flórez e ao Me. Anderson do Prado Duzanski, que estiveram comigo no Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada, vocês foram parte essencial deste trabalho.

A todos do Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental, em especial a minha coorientadora, Dra. Joyce Regina Zapaterini, por toda ajuda, paciência, ensinamentos, grande dedicação e pela pessoa maravilhosa que é.

A todos que se dedicaram e contribuíram de alguma forma para tornar este trabalho possível.

Agradecimentos

Aos meus pais por todo suporte, paciência e incondicional apoio ao longo desses anos. Sem vocês nada teria sido possível. Ao incentivo da minha irmã e do meu namorado, pois sem vocês teria sido mais difícil.

À minha orientadora Profa. Noeme Sousa Rocha pela oportunidade de realizar este trabalho, dedicação, paciência, incentivo, contribuição científica, pelos ensinamentos que ficarão para vida toda e por ser parte essencial deste trabalho que proporcionará muitos mais estudos sobre este tema.

Ao pessoal do meu Laboratório, em especial ao Me. Anderson do Prado Duzanski e ao Prof. Dr. Luis Mauricio Montoya Flórez pela ajuda, ensinamentos e amizade cultivada.

Aos tutores dos animais que aceitaram que estes pudessem ser a fonte de estudo deste trabalho, bem como aos animais e ao Departamento de Cirurgia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em especial aos residentes e à Profa. Adj. Cláudia Valéria Seullner Brandão por todo apoio e auxílio na coleta de material.

Ao Prof. Adj. João Pessoa Araújo Junior pela disponibilização do Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular, ensinamentos e grande atenção. A Dra. Taís Fukuta da Cruz por todo apoio no desenvolvimento deste trabalho, paciência, ensinamentos e pela amizade cultivada, assim como ao Dr. Bruno César Rossini pela atenção, auxílio técnico e metodológico.

Ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, em especial aos Professores Maeli Dal Pai, Robson Francisco Carvalho e Luís Fernando Barbisan, assim como ao Dr. Tony Fernando Grassi e ao Dr. Bruno Oliveira da Silva Duran pelos ensinamentos e apoio.

A Dra. Joyce Regina Zapaterini pelos ensinamentos, comprometimento, dedicação e grande apoio neste estudo, assim como

ao Prof. Assist. Dr. André Luis Debiaso Rossi do Grupo de Simulação e Modelagem Computacional da UNESP de Itapeva, pela colaboração, paciência em ensinar e pela dedicação neste trabalho.

Ao Prof. Assoc. José Maurício Sforcin e à Dra. Daniela Cristina dos Santos por participarem da banca de exame geral de qualificação e pela grande contribuição na melhoria deste estudo.

À Faculdade de Medicina de Botucatu pela oportunidade e por tudo o que aprendi tanto nas disciplinas quanto nos laboratórios. Sei que cresci muito aqui tanto pessoalmente quanto profissionalmente.

Ao Prof. Adj. Paulo Ricardo de Oliveira Bersano e ao Prof. Assoc. José Maurício Sforcin pela gentileza em participarem da banca e pela grande contribuição na melhoria deste estudo.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial a Vânia do Amaral Soler pela paciência e proatividade.

Aos funcionários da Biblioteca pela atenção, ajuda, dedicação e por todos esses anos que passei estudando e sempre aprendo muito lá, assim como pela confecção da ficha catalográfica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de auxílio financeiro para a realização deste estudo (445250/2014-3) e pela bolsa de estudo (133452/2018-2).

A todos que contribuíram de alguma forma para tornar este trabalho possível e torceram para o sucesso deste.

Muito obrigada!

Epigrafe

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas nunca deixe de seguir em frente”.

(Martin Luther King)

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar nenhum.”

(Frank A. Clark)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do processo de carcinogênese. A ação de agentes iniciadores (iniciação) causa alterações na estrutura do material genético celular e no nível populacional, tornando as células mais propensas a sofrer novas alterações. Segue-se com a mudança na dinâmica de divisão celular, a ação de agentes promotores, acúmulo de novas alterações (promoção), heterogeneidade genética (transformação), instabilidade genética, elevada taxa proliferativa e capacidade de invasão e metástase (progressão) (adaptado de Hlatky; Hahnfeldt, 2014).....27
- Figura 2.** Estimativa de casos de Tumor Venéreo Transmissível Canino em diferentes países. Cada ponto corresponde a uma faixa percentual de ocorrência (retirado de Strakova; Murchison, 2014).....28
- Figura 3.** Tumor Venéreo Transmissível Canino. Histologia (A): Pleomorfismo celular, núcleo e nucleolos proeminentes (seta tracejada), atipias de coilocitose. Coloração HE. Citologia (B): Células redondas, pleomórficas, célula de aspecto plasmocitoide (seta tracejada), célula em divisão (seta preta). Coloração Giemsa, (ZEISS®) (Arquivo FMVZ).....46
- Figura 4.** Interação de CXCL8 com o microambiente tumoral: estímulo da angiogênese, invasão e migração, recrutamento de neutrófilos (retirado de Santoni *et al.*, 2014).....56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. MA-plot da distribuição dos coeficientes estimados da expressão gênica baseada no $\log_2\text{fold change}$ ($FC > 2$) do TVTC em relação ao tecido sadio. O eixo das abcissas mostra a média de contagem normalizada por fator de tamanho e o eixo das ordenadas mostra a comparação por $\log_2\text{fold change}$ ($\log_2 FC$). Cada gene é representado por um ponto. Genes em vermelho com valor de p ajustado (*false discovery rate* – FDR) acima de 0 no eixo das ordenadas são genes *upregulated* e abaixo de 0 são *downregulated*.....50

Gráfico 2. Heat map das amostras de Tumor Venéreo Transmissível Canino pelo método de distância Euclidiana, sendo P10 e P11 amostras de tecido sadio e as demais de tecido tumoral. Há maior semelhança entre os grupos sadio e tumoral com exceção de P23.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos dos cães com TVTC quanto a idade (anos), sexo, raça, localização e tamanho do tumor, classificação citomorfológica e resposta ao tratamento.....	48
Tabela 2. Qualidade do RNA extraído das amostras de Tumor Venéreo Transmissível Canino quanto a integridade do RNA (RIN), absorbância nas relações 260/280 nm e 260/230 nm e concentração (ng/μL).....	49
Tabela 3. Genes <i>upregulated</i> no Tumor Venéreo Transmissível Canino. Identificação do gene (EntrezGene ID), símbolo, descrição (função biológica) e p-valor.....	52
Tabela 4. Genes <i>downregulated</i> no Tumor Venéreo Transmissível Canino. Identificação do gene (EntrezGene ID), símbolo, descrição (função biológica) e p-valor.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Preservou-se a grafia em inglês de algumas siglas, uma vez que seu consagrado uso em comunicações científicas permite que sejam mais prontamente assimiladas. Nos demais casos, é apresentada a grafia em português.

ALC - Antígeno leucocitário canino

ATAD5 - *ATPase Family AAA Domain Containing 5*

BRCA1 - *Breast cancer 1*

°C - Graus Celsius

CBLB - *Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene-b*

CD300LF - *CD300 Molecule Like Family Member F*

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cm - Centímetro

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CORO1A - *Coronin 1A*

CXC - *Cys-X-Cys (family)*

CXCL7 - *Chemokine ligand 7*

CXCL8 - *Chemokine ligand 8*

CXCL13 - *Chemokine ligand 13*

CXCL14 - *Chemokine ligand 14*

DDIAS - *DNA damage induced apoptosis suppressor*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNAc - DNA complementar

DTL - *Denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog*

FABP4 - *Fatty acid binding 4*

FC - *Fold change*

FDR - *False Discovery Rater*

FMB - Faculdade de Medicina de Botucatu

FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GADD45(G) - *Growth arrest and DNA damage inducible gamma*

HE - Hematoxilina-Eosina

HMMR - *Hyaluronan mediated motility receptor*

HPV - Papiloma Vírus Humano

IBTEC - Instituto de Biotecnologia

IL-1 - Interleucina 1

IL18RAP - *Interleukin 18 receptor accessory protein*

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

INF- γ - *Interferon γ*

IKZF1 - *IKAROS family zinc finger 1*

LPIC - Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada

m² - Metro quadrado

mg - Miligrama

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

mL - Mililitro

NCAM1 - *Neural cell adhesion molecule 1*

nm - Nanometro

NFATC2 - *Nuclear factor of activated T cells 2*

NK - *Natural killer*

PAFF - Punção aspirativa por agulha fina

pb - Pares de base

PCA - Análise dos componentes principais

p53 - *Tumor protein p53*

R - Resistente

RAD51AP1 - *RAD51 associated protein 1*

RASSF2 - *Ras association domain family member 2*

RBL1 - *RB transcriptional corepressor like 1*

RC - Resposta completa

RIN - *RNA Integrity Number*

RNA - Ácido ribonucleico

RNA_m - RNA mensageiro

RNASEL - *Ribonuclease L*

RNA-seq - Sequenciamento do RNA

RP - Resposta parcial

RPKM - *Reads or fragments per kilobase exon per million reads*

rpm - Rotações por minuto

RRM2 - *Ribonucleotide reductase regulatory subunit M2*

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

SEMA4D - *Semaphorin 4D*

SKAP2 - *Src kinase associated phosphoprotein 2*

SLBP - *Stem-loop binding protein*

SRD - Sem raça definida

TA - Temperatura ambiente

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TNFRSF8 - *TNF receptor superfamily member 8*

TNFRSF19 - *TNF receptor superfamily member 19*

TPX2 - *TPX2, microtubule nucleation factor*

TRPM1 - *Transient receptor potential cation channel subfamily M member 1*

TVTC - Tumor Venéreo Transmissível Canino

UHRF1 - *Ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1*

μ L - Microlitro

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

VTCN1 - *V-set domain containing T cell activation inhibitor 1*

RESUMO

SANCTIS, P. **Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC): estudo do perfil transcricional**. 2020. 78 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, Botucatu, 2020.

O Tumor Venéreo Transmissível Canino é uma neoplasia que tornou-se ponto de partida para o estudo da oncologia a partir do século XIX pelo sucesso no transplante experimental. No entanto, dados sobre diferenças genéticas são escassos, sendo importante o estudo do perfil genômico para identificar alterações no genoma, marcadores prognósticos e, consequentemente, melhorar o diagnóstico e a resposta terapêutica. Diante do exposto, realizou-se o sequenciamento deste tumor e avaliou-se o envolvimento dos genes na progressão e evasão da resposta imune, principalmente, sendo eventos pouco explorados neste tumor. Para tal, foram utilizadas doze amostras de cães com diagnóstico de Tumor Venéreo Transmissível Canino, sem predileção por raça e sexo, com idade a partir de dois anos e sem nenhum tratamento prévio. Por meio da biópsia da lesão, realizou-se a extração do RNA total, sequenciamento e posterior análise do transcriptoma por técnicas de bioinformática por meio dos softwares R, STAR e Bioconductor, sendo a análise da expressão diferencial realizada pelo pacote DEseq2 com $p < 0,05$, $\log_2 \text{fold change} > 2$. Ao final, foram identificados os genes diferencialmente expressos e na análise do perfil global, observou-se que tais genes estão relacionados com progressão, evasão da resposta imune, supressão da apoptose e falta de reparo do DNA, sendo a maioria marcadores prognósticos de outros tipos tumorais, como BRCA1, ATAD5, CXCL8, GADD45G, RASSF2 e TPX2, o que demonstra a necessidade de estudos acerca de marcadores para este tumor.

Palavras-chave: Cão; Tumor Venéreo Transmissível; Transcriptoma; Genes; Perfil transcricional; Progressão; Resposta imune; BRCA; ATAD5; CXCL8; GADD45G; RASSF2; TPX2.

ABSTRACT

SANCTIS, P. **Canine Transmissible Venereal Tumor (CTVT): study of the transcriptional profile.** 2020. 78 f. Masters Dissertation – Medicine School Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, Botucatu, 2020.

Canine Transmissible Venereal Tumor is a neoplasm that became a starting point for the study of oncology since the 19th century due to its success in experimental transplantation. However, data on genetic differences are scarce, and it is important to study the genomic profile to identify changes in the genome, prognostic markers and, consequently, improve diagnosis and therapeutic response. In view of this, this tumor was sequenced and the involvement of genes in the progression and evasion of immune response was evaluated, mainly, with little explored events in this tumor. For this purpose, twelve samples of dogs with a diagnosis of Canine Transmissible Venereal Tumor were used, without predilection for race and sex, aged from two years and any previous treatment. Through the biopsy of the lesion, the total RNA was extracted, sequenced and subsequent analysis of the transcriptome by bioinformatics techniques using software R, STAR and Bioconductor, with the analysis of the differential expression performed by DESeq2 package with $p < 0.05$, $\log_2$ fold change > 2 . At the end, differentially expressed genes were identified and in the analysis of the global profile, it was observed that such genes are related to progression, evasion of the immune response, suppression of apoptosis and lack of DNA repair, the majority being prognostic markers of other tumor types, such as BRCA1, ATAD5, CXCL8, GADD45G, RASSF2 and TPX2, which demonstrates the need for studies on markers for this tumor.

Keywords: Dog; Transmissible Venereal Tumor; Transcriptome; Genes; Progression; Immune response; BRCA; ATAD5; CXCL8; GADD45G; RASSF2; TPX2.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xv
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1. O processo de carcinogênese.....	25
2.2. Tumor Venéreo Transmissível Canino.....	27
2.3. Transcriptoma e sequenciamento de RNA (RNA-seq).....	32
2.4. Alvos moleculares diagnósticos e terapêuticos.....	35
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
4. JUSTIFICATIVA E PERSPECTIVAS.....	37
5. MATERIAL E MÉTODOS	
5.1. Origem do material de estudo e aspectos éticos.....	39
5.2. Avaliação clínica dos pacientes com TVTC.....	39
5.3. Análise do comportamento biológico do TVTC.....	39
5.4. Extração de RNA total e obtenção de RNAm.....	40
5.5. Obtenção do DNAc e técnica de RNA-seq.....	43
5.6. Análises de Bioinformática e Estatística.....	44
5.7. Análise dos genes diferencialmente expressos.....	45
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
6.1. Controle de qualidade diagnóstico e dados clínicos.....	46
6.2. Expressão diferencial de genes no TVTC.....	48

6.3. Perfil transcricional do TVTC.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
CAPÍTULO 2	
8. ARTIGO CIENTÍFICO.....	63
9. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURA.....	68
ANEXOS	
ANEXO A – Atestado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	70
ANEXO B – Atestado da Comissão de Ética no Uso de Animais (alteração de título).....	71

Apresentação

A presente dissertação foi subdividida em dois capítulos. O primeiro traz a introdução, revisão bibliográfica, objetivos, metodologia empregada, resultados obtidos e a discussão destes. O segundo capítulo consiste no manuscrito redigido para submissão em periódico científico e ao final traz as interpretações gerais do estudo no item *Conclusão*.

Capítulo 1

1. Introdução

O Tumor Venéreo Transmissível Canino trata-se de uma neoplasia de células redondas de origem mesenquimatosa, a qual, diferentemente de outras neoplasias, parece não expressar a fase de iniciação, uma vez que se trata de uma lesão já neoplásica que se instala em mucosas que perderam a integridade.

Acredita-se que transmissão do tumor ocorra por meio da implantação de células tumorais de um animal para outro principalmente de forma venérea como também pode ocorrer via arranhadura, lambedura ou contato direto entre a pele e mucosa lesionada seja de um animal para outro ou do animal para ele próprio, de modo a causar mais lesões.

O estudo desta neoplasia se faz importante agregado à existência de marcadores moleculares de alta especificidade que podem esclarecer o seu comportamento biológico *in vivo* e, desta forma, auxiliar na compreensão de sua forma de transmissão, a qual ainda não está totalmente esclarecida, assim como incentivar a busca de novos enfoques terapêuticos para os casos resistentes à quimioterapia com sulfato de vincristina.

Nesse sentido, o sequenciamento em larga escala do Tumor Venéreo Transmissível Canino pode trazer informações adicionais relacionadas ao transcriptoma, o que inclui e expressão de genes específicos, bem como a identificação de novos genes e a relação destes com a progressão tumoral, a evasão da resposta imune do hospedeiro e implantação das células tumorais, por exemplo.

Por fim, a partir dessas abordagens, espera-se contribuir na pesquisa em oncologia comparada e acredita-se que este estudo poderá servir para compreender a gênese e possível evolução biológica de outros tipos de tumores tanto nos animais quanto nos seres humanos.

2. Revisão de literatura

2.1. O processo de carcinogênese

O câncer compreende mais 200 tipos de doenças e trata-se do produto final de um processo dinâmico e complexo desenvolvido em múltiplas etapas (Figura 1). Sua etiologia é complexa e depende de interações do indivíduo com o ambiente e de fenômenos genéticos ou epigenéticos responsáveis pelas mutações que conferem vantagem proliferativa às células e levam à sua expansão clonal (XIAOMEI; HERBERT, 2006; BODE; DONG, 2009; HLATKY; HAHNFELDT, 2014; VINEIS; WILD, 2014; CHAFFER; WEINBERG, 2015; HYNDMAN, 2016; TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2017).

Na primeira etapa, a iniciação, tem-se a presença de agentes mutagênicos, também chamados de iniciadores, que causam alteração na estrutura do material genético celular, de modo que a célula iniciada passa a apresentar uma taxa de proliferação alterada e se torna propensa a sofrer mais mudanças genéticas, sejam estas espontâneas ou induzidas (INCA, 2011; HLATKY; HAHNFELDT, 2014; HYNDMAN, 2016).

Os agentes mutagênicos possuem diferentes naturezas e podem agir de forma isolada ou combinada, sendo divididos em químicos, físicos e biológicos. Dentre eles, os biológicos tratam-se de agentes infecciosos tal como os vírus, a exemplo do papiloma vírus humano (HPV), responsável pelo desenvolvimento do carcinoma de colo uterino e sua transmissão ocorre principalmente de forma venérea (INCA, 2011; FRAGOSO, 2013; VINEIS; WILD, 2014; WU *et al.*, 2015).

Após a iniciação tem-se a promoção, que compreende alterações na dinâmica da divisão celular ou do meio intracelular provocadas por agentes indutores, expansão e acúmulo de novas alterações. A partir deste ponto pode haver progressão ou regressão do tumor já instalado, pois para a fase seguinte é necessário um microambiente favorável ao

desenvolvimento tumoral, o que inclui a evasão da resposta imune do hospedeiro (INCA, 2011; FRAGOSO, 2013; LOPES *et al.*, 2013; HLATKY; HAHNFELDT, 2014; HYNDMAN, 2016).

Antes de se chegar à progressão, tem-se alterações consequentes do processo de transformação, as quais postula-se que estejam relacionadas à heterogeneidade genética da massa tumoral. Entretanto, da mesma forma que não é válido afirmar que todas as células tumorais têm o mesmo genótipo, também não é válido afirmar que tenham o mesmo conjunto de transcritos e, conseqüentemente, o mesmo fenótipo (COTRAN; ROBBINS, 2010; LOPES *et al.*, 2013).

Tal característica é importante para o delineamento de estratégias terapêuticas à medida que alvos moleculares são definidos e explorados, de modo que o tumor pode ser representado como compartimentos de células com assinaturas transcricionais diferentes e, portanto, sujeitos a diferentes abordagens terapêuticas (LOPES *et al.*, 2013).

Na progressão, caracterizada pela instabilidade do genoma em uma lesão já formada, certas características são adquiridas ou aprimoradas, o que inclui alterações estruturais relacionadas ao metabolismo celular, elevada taxa de proliferação (insensibilidade à sinalização inibitória do crescimento), ativação de oncogenes, perda de função dos genes supressores tumorais, invasão e capacidade metastática (BODE; DONG, 2009; CONTI, 2010; INCA, 2011; FRAGOSO, 2013; LOPES *et al.*, 2013; HLATKY; HAHNFELDT, 2014; KORKAYA *et al.*, 2015).

Durante esta fase, muitos tumores se tornam mais agressivos e as células tumorais recrutam uma coleção diversa de células que compõem o microambiente e estão sujeitas a um processo de mutação e seleção, isto é, novos subclones surgem dos descendentes da célula originalmente transformada por múltiplas mutações. Logo, tem-se uma evolução até o surgimento das primeiras manifestações clínicas (BODE; DONG, 2009; AKTIPIS; NESSE, 2013; HLATKY; HAHNFELDT, 2014; KORKAYA *et al.*, 2015).



Figura 1 - Representação esquemática do processo de carcinogênese. A ação de agentes iniciadores (iniciação) causa alterações na estrutura do material genético celular e no nível populacional, tornando as células mais propensas a sofrer novas alterações. Segue-se com a mudança na dinâmica de divisão celular, a ação de agentes promotores, acúmulo de novas alterações (promoção), heterogeneidade genética (transformação), instabilidade genética, elevada taxa proliferativa e capacidade de invasão e metástase (progressão) (adaptado de Hlatky; Hahnfeldt, 2014).

Outro ponto importante no processo de carcinogênese, embora não se tenha um consenso quanto ao termo a ser empregado, são as células iniciadoras de tumor ou *stem cells*, que compreendem um subconjunto celular especializado capaz de se autorrenovar e originar outros tipos de células neoplásicas, de modo a criar um tumor hierarquicamente organizado (CHAFFER; WEINBERG, 2015; WEI; LEWIS, 2015; SOUZA; SCHENKA, 2015; GRANDI *et al.*, 2016).

Estas células apresentam baixo ritmo proliferativo, uma das razões pelas quais as terapias convencionais, isto é, quimioterapia e radioterapia, não são eficientes para eliminá-las mesmo quando combinadas, apesar da redução do tamanho do tumor. Há ainda a hipótese de que essas células sejam responsáveis pela recorrência tumoral e metástase (CHAFFER; WEINBERG, 2015; WEI; LEWIS, 2015; SOUZA; SCHENKA, 2015).

2.2. Tumor Venéreo Transmissível Canino

O Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC) inicialmente chamado de sarcoma ou tumor de Sticker, que foi o pioneiro no transplante experimental do tumor no século XIX, é um tumor que acomete animais errantes em diferentes continentes (Figura 2), principalmente aqueles

entre dois e cinco anos de idade, período de maior atividade reprodutiva e que habitam regiões subtropicais e tropicais, como é o caso do Brasil, sendo a última estimativa da prevalência de casos realizada em 2014 (SILVA *et al.*, 2007; PUROHIT, 2008; LIMA, 2013; STRAKOVA; MURCHISON, 2014; FONSECA *et al.*, 2017).

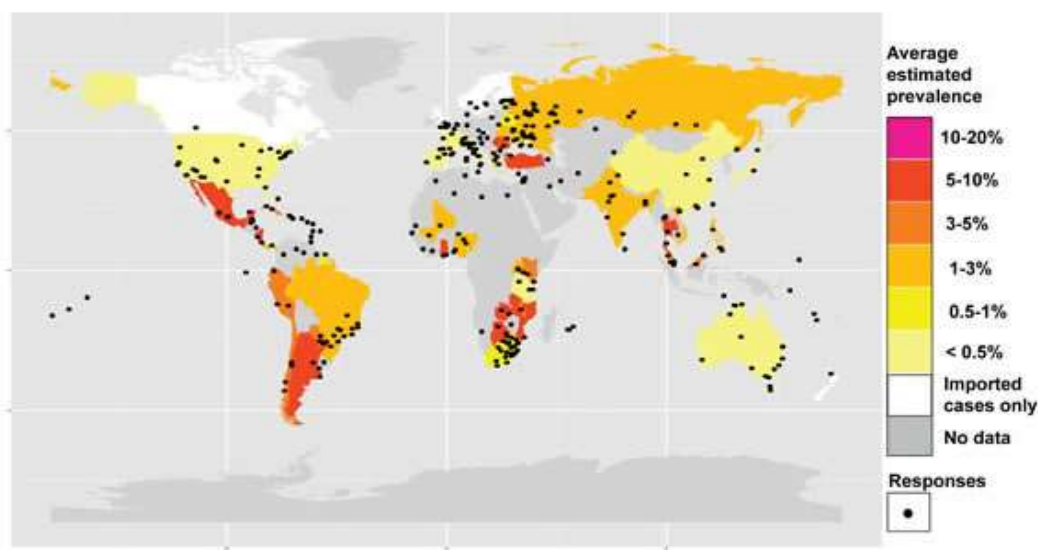


Figura 2 - Estimativa de casos de Tumor Venéreo Transmissível Canino em diferentes países. Cada ponto corresponde a uma faixa percentual de ocorrência (retirado de Strakova; Murchison, 2014).

A forma de transmissão do TVTC ainda não foi totalmente esclarecida, mas acredita-se que alterações na defesa imunológica possa contribuir neste processo, uma vez que a transplantação do tumor ocorre quando células tumorais intactas perdem a capacidade de expressar moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classes I e II, o que permite a implantação do tumor em cães saudáveis (SILVA *et al.*, 2007; FLÓREZ, 2014).

Desta forma, as células tumorais viáveis se implantam em mucosas que perderam a integridade com localização predominantemente venérea, afetando a genitália externa de cães de ambos os sexos. A transmissão venérea é a mais frequente, mas também pode se dar via lambedura ou arranhadura (SOUSA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007;

FLÓREZ., 2014; BIRHAN; CHANIE, 2015; FONSECA *et al.*, 2017).

Dentre os locais acometidos, tem-se a genitália externa (vagina, vulva, prepúcio e pênis), assim como regiões extragenitais como ânus, tecidos subcutâneo e cutâneo, globo ocular e a região das narinas. A superfície pode se apresentar ulcerada ou necrosada, inclusive com infecção bacteriana (SANTOS *et al.*, 2000; BRANDÃO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2007; FLÓREZ, 2014; CAMOLESE *et al.*, 2016).

Não há predominância quanto ao sexo, mas a maior incidência observada nas fêmeas pode se dever ao comportamento típico destas em aceitar grande número de parceiros durante o período fértil, além da ação hormonal durante este período, o que promove intumescimento vulvar e, conseqüentemente, maior suprimento sanguíneo para a genitália, de modo a favorecer a transplantação do tumor (SILVA *et al.*, 2007; CALDAS; SILVA, 2012; BONILLA *et al.*, 2015).

O diagnóstico é feito, a princípio, pela manifestação clínica, posteriormente realiza-se o exame citológico, e raramente se faz uso do exame histopatológico. O exame citopatológico, por ser o mais sensível, seja por punção ou exfoliação, apresenta resultado quase sempre conclusivo, o que permite classificar o tumor em células redondas do tipo linfocitóide, plasmocitóide ou misto (FLÓREZ, 2014).

O tumor geralmente não é agressivo, pois raramente leva o paciente a óbito e apresenta índice metastático inferior a 5% (BRANDÃO *et al.*, 2002; CHIKWETO *et al.*, 2013; LIMA, 2013; FLÓREZ, 2014; STRAKOVA; MURCHISON, 2014), acometendo pacientes nos quais o tumor persiste por período superior a dois meses (SOUSA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2005).

Há casos de metástase no trato urinário, o que causa obliteração do meato urinário externo, retenção urinária e bacteriúria (SOUSA *et al.*, 2000). Também são encontradas metástases, com menor frequência, nos pulmões, rins, pele, olhos, cérebro, hipófise, tecido subcutâneo, linfonodos mesentéricos e peritônio e, mais raramente, no fígado e no baço (SOUSA

et al., 2000; SANTOS *et al.*, 2005).

No estadiamento, observa-se que o tamanho do tumor varia geralmente de 5 mm a 10 cm e que a superfície pode estar ulcerada ou necrosada, inclusive com infecção bacteriana (SANTOS *et al.*, 2005; FLÓREZ, 2014). Os tumores extragenitais cutâneos, por sua vez, são bem circunscritos e medem de 2 a 5 cm de diâmetro (FLÓREZ, 2014; SILVA *et al.*, 2007; BRANDÃO *et al.*, 2002).

Outro ponto importante é a apoptose, que pode ocorrer à medida que as células lábeis são eliminadas continuamente para manter o equilíbrio devido a proliferação celular. O processo pode estar aumentado no TVTC devido à isquemia e ação de citocinas de células mononucleares e embora possa ocorrer em seis meses, deve-se realizar algum tratamento, seja por meio da excisão do tumor, radioterapia ou quimioterapia, sendo esta a mais utilizada (ROCHA *et al.*, 2008; FALCÃO *et al.*, 2013; PINCZOWSKI *et al.*, 2015).

A progressão do TVTC é influenciada pelo sistema imune, de modo que o tumor transplantado experimentalmente apresenta uma fase de crescimento rápida, seguida por latência e regressão, que pode ser completa em pacientes clinicamente saudáveis, sendo associada a uma intensa infiltração linfocitária local (CASTRO, 2015).

As células tumorais se comportam como parasitas infecciosos, esquivando-se das proteínas do MHC, também conhecido como antígeno leucocitário canino (ALC), um grande complexo gênico com múltiplos locos encontrados na maioria dos vertebrados, cujas moléculas apresentam antígenos às células do sistema imune (CASTRO, 2015).

As proteínas codificadas pelo MHC são expressas na superfície celular e mediam o reconhecimento imune pela interação com os linfócitos T. Essas proteínas, altamente polimórficas, são consideradas a maior e a principal barreira ao transplante hlogênico (CASTRO, 2015).

Em relação ao perfil genômico do tumor, apesar de apresentar uma fonte monofilética, uma ampla diversidade genética foi encontrada em

regiões do seu genoma (MURGIA *et al.*, 2006; REBBECK *et al.*, 2009; SÁNCHEZ-SERVÍN *et al.*, 2009; MURCHISON *et al.*, 2008; DECKER *et al.*, 2015; STRAKOVA; MURCHISON 2015). Dessa forma, as condições do meio ambiente, com ênfase aos hábitos de vida, convivência em aglomerações, ausência de controle reprodutivo e a higidez comprometida interferem na ocorrência desta enfermidade (LIMA, 2013).

Decker *et al.* (2015) descreveram 247 potenciais genes de fusão que podem contribuir na perda da função e expressão aberrante de genes neste tumor, enquanto Murchison *et al.* (2008) identificaram 1.7 milhões de variantes somáticas, compartilhadas entre tumores da Austrália e do Brasil, quantidade maior do que qualquer outra já descrita nas neoplasias.

Os mecanismos utilizados pelo tumor para evasão da resposta imune representam o êxito desta neoplasia em evadir o sistema imune do hospedeiro, pois durante a implantação e o crescimento tumoral, menos de 5% das células expressam moléculas do MHC de classes I e II (MURGIA *et al.*, 2006; SIDDLE; KAUFMAN, 2015), o que permite ao tumor se instalar no tecido clinicamente saudável (LIU *et al.*, 2008; STOCKMANN *et al.*, 2011).

Embora esses mecanismos não estejam bem elucidados, acredita-se que a perda da expressão de MHC seja regulada por mecanismos epigenéticos ou por mutações estruturais no DNA (SIDDLE; KAUFMAN, 2015). Deste modo, uma abordagem científica mais aprofundada poderá fornecer informações importantes para a compreensão destes fenômenos e das possíveis mutações presentes em genes das vias imunológicas.

Portanto, como há um indicativo de que neste tumor existem modificações progressivas no perfil biológico e uma contínua adaptação ao seu entorno, o estudo de seu comportamento poderá servir de ponto de partida para investigações de vias relacionadas à evolução biológica dos tumores e modulação imunológica.

2.3. Transcriptoma e sequenciamento de RNA (RNA-seq)

O projeto genoma revolucionou a maneira como a biologia e a medicina são exploradas (COLLINS *et al.*, 1998; SIMÃO *et al.*, 2015; RAU *et al.*, 2015). Enquanto o genoma trata-se do conjunto de genes de um organismo, o transcriptoma representa os transcritos, isto é, ácidos ribonucleicos (RNAs), específicos em condições fisiológicas e patológicas, de modo que expressão de um gene supõe que este tenha sido transcrito a um RNA mensageiro (RNAm) (ROCHA *et al.*, 2008; BARRET *et al.*, 2015).

Em organismos pluricelulares o genoma codifica toda a informação necessária para produzir os diferentes tipos celulares que compõem o organismo adulto e cada tipo celular tem seu transcriptoma característico. Células de um mesmo organismo com um mesmo genoma podem chegar a ser tipos celulares muito distintos de acordo com a combinação de genes expressos. (FIBAO, 2009; YOUSSEF *et al.*, 2019).

De acordo com o tipo celular e o estado fisiológico em que a célula se encontra, tem-se determinado padrão de genes ativos que diferem segundo esses dois aspectos e geram um conjunto particular de RNA mensageiros (FIBAO, 2009), de modo que compreender o transcriptoma é essencial para a interpretação dos elementos funcionais do genoma e do desenvolvimento das doenças (WANG *et al.*, 2009).

Por meio do transcriptoma é possível catalogar todos os transcritos, o que inclui RNAm, pequenos RNAs e RNAs não codificantes, de modo a determinar a estrutura da transcrição dos genes, padrões de ligação e modificações pós-transcricionais (WANG *et al.*, 2009). Também é possível comparar transcriptomas e identificar genes expressos diferencialmente em populações celulares diferentes ou em resposta a diferentes tratamentos (FIBAO, 2009).

Nesse sentido, tecnologias têm sido desenvolvidas a fim de mapear e quantificar determinado transcriptoma, bem como abordagens baseadas

em hibridização como os *microarrays*, metodologia que embora considerada de alto rendimento apresenta limitações como conhecimento prévio da sequência do DNA (ácido desoxirribonucléico) referente aos genes de interesse para o desenho das sondas (ALLISON *et al.*, 2006).

Os *microarrays*, devido a hibridização cruzada podem introduzir interferências nas avaliações e não permitir a quantificação de transcritos de genes muito ou pouco expressos e a detecção de variantes e novas classes de RNAs regulatórios não codificantes também é limitada (ALLISON *et al.*, 2006).

Como forma de superar tais limitações, tem-se desenvolvido métodos de alto rendimento que permitem avaliar a expressão gênica baseada no sequenciamento de RNA, como o transcriptoma *shotgun sequencing* ou RNA-seq (WANG *et al.*, 2009; OZSOLAK; MILOS, 2011; ROY *et al.*, 2011; WOLF, 2013; BARRETT *et al.*, 2015; RAU *et al.*, 2015; UHLEN *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2017; STARK *et al.*, 2019).

Essa técnica permite sequenciar o RNA total, bem como realizar uma contagem sistemática de todos os transcritos e identificar isoformas de RNAm expressas pelos tumores (WANG *et al.*, 2009; OZSOLAK; MILOS, 2011; ROY *et al.*, 2011; WOLF, 2013; BARRETT *et al.*, 2015). O método também inclui o sequenciamento de moléculas do DNA complementar (DNAC) obtidas por transcrição reversa a partir do RNA (NATURE; STARK *et al.*, 2019).

Como vantagem, o RNA-seq não requer informação prévia da sequência de DNA e tem alta sensibilidade comparado ao *microarray*, pois a quantificação do transcrito de cada gene é baseada diretamente no número de leituras, os chamados *reads*, que mapeiam um gene em particular (WANG *et al.*, 2009; OZSOLAK; MILOS, 2011; ROY *et al.*, 2011; WOLF, 2013; RAU *et al.*, 2015; KRETZLER; JU, 2015; CHEN *et al.*, 2017).

O RNA-seq também pode fornecer informações relativas à complexidade do transcriptoma, como expressão de genes específicos (RNAm), identificação de novos genes e de eventos de união, assim como

um grande espectro de RNAs não codificadores. Outra vantagem está na natureza digital dos dados adquiridos por essa metodologia, a qual proporciona análise mais sensível e precisa em comparação ao *microarray* (WANG *et al.*, 2009; OZSOLAK; MILOS, 2011; ROY *et al.*, 2011; STRICKLER *et al.*, 2012; WOLF, 2013; BATTLE *et al.*, 2014; RAU *et al.*, 2015; BARRET *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2017; UHLEN *et al.*, 2017; STARK *et al.*, 2019).

Dentre suas aplicações, o RNA-seq já foi utilizado em estudo com células humanas infectadas pelo vírus da dengue, o qual mostrou que a resposta transcricional das células variou de acordo com a cepa (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4). Tais diferenças podem ser consequentes dos mecanismos de escape da resposta imune do hospedeiro (SESSIONS *et al.*, 2013). Essa metodologia também foi utilizada para identificar diferenças na expressão de genes em macrófagos de animais suscetíveis ou resistentes à infecção pela *Mycobacterium avium* (MARFELL *et al.*, 2013).

O RNA-seq também foi utilizado na análise transcricional de diversos tipos de cânceres, dentre eles leucemia (PANAGOPOULOS *et al.*, 2013; MACRAE *et al.*, 2013), câncer pancreático (JIA *et al.*, 2013), de bexiga (SHARRON *et al.*, 2014), de próstata (RAJAN *et al.*, 2013, ZHANG *et al.*, 2013; REN *et al.*, 2017), de mama (ESWARAN *et al.*, 2013) e de ovário (BARRET *et al.*, 2015), assim como no estudo da relação entre a metástase de células tumorais no cérebro em indivíduos com o câncer de mama ou melanoma (SATO *et al.*, 2017).

Tais estudos destacam a importância e qualidade desta técnica capaz de fornecer informações que permitem a detecção de genes alterados e auxiliar na compreensão da classificação e progressão tumoral pela identificação de variantes espessas, visto que distinguir a dinâmica transcriptômica de doenças como o câncer continua sendo um grande desafio científico (GARBER *et al.*, 2011; ILLUMINAA; ILLUMINAB; PANAGOPOULOS *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2013; REN *et al.*, 2017).

Apesar das vantagens, o RNA-seq necessita de ferramentas

computacionais avançadas e de profissionais capacitados nesta área para que os dados gerados possam ser estudados e explorados ao máximo. Outro fator importante é a fragilidade do RNA, que pode ser degradado, logo as condições de coleta e armazenamento das amostras biológicas deve ser cuidadosa, a fim de evitar a degradação.

Outro obstáculo é o material utilizado, o qual precisa apresentar um RIN (*RNA integrity number*) de alta qualidade, sendo obtido com maior facilidade e qualidade em culturas celulares, sejam essas de células aderidas ou em suspensão, do que em tecidos provenientes de biópsia, por exemplo.

Apesar disso e agregado ao fato de que esta técnica já foi utilizada no estudo de várias doenças (SESSIONS *et al.*, 2013; MARFEEL *et al.*, 2013) e neoplasias de diferentes órgãos (PANAGOPOULOS *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2013; ESWARAN *et al.*, 2013; MACRAE *et al.*, 2013; JIA *et al.*, 2013; RAJAN *et al.*, 2013; SHARRON *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014), seu emprego no TVTC poderá trazer informações adicionais para se compreender a evolução e o comportamento biológico dos cânceres.

2.4. Alvos moleculares diagnósticos e terapêuticos

Devido ao fato de o TVTC poder ser facilmente transplantado, investigações sobre a biologia deste tumor têm sido feitas na tentativa de fornecer pistas acerca deste fenômeno (PUROHIT, 2008). A capacidade de resposta imunológica do hospedeiro tem papel importante na expansão tumoral, assim como no aumento da severidade observada em animais imunocomprometidos (SANTOS, *et al.*, 2005; PUROHIT, 2008).

O crescimento tumoral *in vivo* depende da evasão dos mecanismos homeostáticos relacionados com a via de indução da apoptose (SANTOS *et al.*, 2005; PUROHIT, 2008) e o desenvolvimento do tumor é ameaçado pelo sistema imune, de modo que conhecer as características dos antígenos tumorais é fundamental para a compreensão da imunidade

tumoral e desenvolvimento ou aprimoramento de terapias (LIMA, 2013).

Nesse sentido, o estudo de alvos moleculares vem agregar informações quanto a estes aspectos. Dentre os relacionados com a progressão tumoral, tem-se alguns exemplos, como CXCL7 (*chemokine ligand 7*), um fator de crescimento derivado de plaquetas da família das quimiocinas CXC (Cys-X-Cys), sendo as quimiocinas capazes de controlar a migração e a residência de todas as células imunes (GUO *et al.*, 2017; PALOMINO; MARTI, 2015; THE HUMAN PROTEIN ATLAS²).

As quimiocinas da família CXC estimulam principalmente a quimiotaxia de neutrófilos e CXCL7 se liga ao receptor CXCR2 e sua função imune está relacionada ao tráfego de neutrófilos (GUERREIRO *et al.*, 2011; PALOMINO; MARTI, 2015). Segundo Guo *et al.* (2017), CXCL7 promoveu proliferação de células de colangiocarcinoma e de carcinoma renal, assim como metástases hepáticas com o cólon como sítio primário.

Ademais, a superexpressão foi associada a fraca diferenciação celular e invasão vascular, sendo descrita também como potencial biomarcador sérico para diagnóstico de câncer colorretal (LI *et al.*, 2019) e diagnóstico precoce de câncer de pulmão (DU *et al.*, 2018).

No TVTC a superexpressão de CXCL7 foi associada à progressão, como demonstrado por Chiang *et al.* (2012) e assim como apresentado por Kinouchi *et al.* (2017) em relação ao câncer renal, esta quimiocina pode ser encontrada no sangue periférico como um potencial marcador diagnóstico. Logo, este é um ponto a ser mais explorado no TVTC, que assim como o câncer renal, não possui um biomarcador sanguíneo.

Ainda sobre a progressão, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) também tem relação com esta, uma vez que seus ligantes, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), aumentam a proliferação celular e angiogênese. A ativação do EGFR também desestabiliza os complexos das junções celulares, como E-caderina, o que favorece a invasão tecidual (FARIA *et al.*, 2016; SOHAL *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2018).

Outro potencial alvo, neste caso terapêutico, é o FABP4 (*fatty acid binding protein 4*). Zhong *et al.* (2018) observaram redução significativa da expressão de FABP4 no carcinoma hepatocelular em 60% dos casos, supressão tumoral *in vivo* e que, quando superexpresso em linhagens celulares, tal gene regula negativamente o crescimento, formação de colônias e a migração.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar no Tumor Venéreo Transmissível Canino genes relacionados ao processo de progressão tumoral e evasão da resposta imune do hospedeiro.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar o perfil de expressão gênica do Tumor Venéreo Transmissível Canino para identificar os transcritos diferencialmente expressos;
- Analisar a expressão gênica do tumor e suas respectivas relações com a progressão tumoral e evasão da resposta imune do hospedeiro;
- Contribuir para entender melhor o comportamento biológico do tumor e, desta forma, identificar possíveis alvos terapêuticos ou diagnósticos a fim de proporcionar um protocolo terapêutico personalizado e contribuir com o prognóstico dos pacientes.

4. JUSTIFICATIVA E PERSPECTIVAS

O TVTC trata-se de uma neoplasia que acomete a espécie canina e tornou-se ponto de partida para o estudo da oncologia a partir do século XIX quando foi transplantado experimentalmente com sucesso. Apesar das neoplasias seguirem as fases do processo de carcinogênese, o TVTC parece não expressar a fase de iniciação por se tratar de uma lesão já

neoplásica.

A forma de transmissão também é alvo de estudo, pois não foi totalmente esclarecida e acredita-se que a redução da defesa imunológica do indivíduo possa contribuir nesse processo. Neste tumor também foi constatada a presença de rearranjos genômicos decorrentes, ou não, de rearranjos cromossômicos e do aumento de produtos decorrentes de atividades desreguladas de genes, isto é, de seus transcritos, as proteínas.

Desta forma, o sequenciamento de RNA pode trazer informações adicionais relacionadas ao transcriptoma, de forma a identificar os genes diferencialmente expressos e aqueles que possam estar relacionados a progressão tumoral e evasão da resposta imune do hospedeiro, bem como identificar alvos moleculares que permitam um melhor tratamento e prognóstico aos animais.

A vantagem de se utilizar esta técnica é que não são necessárias informações iniciais do sequenciamento deste tumor, pois tem-se uma ampla classe de análise da quantificação dos transcritos baseada diretamente no número de leituras (*reads*) que mapeiam um gene particular.

No Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada (LPIC) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, tem-se desenvolvido várias pesquisas a respeito do TVTC, no entanto, alguns pontos não estão completamente esclarecidos, como os citados acima, assim como subtipos citomorfológicos, resistência à ação da propolis e da quimioterapia convencional, por exemplo.

Portanto, como há indicativos de que este tumor apresenta modificações progressivas no perfil biológico e uma contínua adaptação ao seu entorno, este estudo poderá servir de ponto de partida para investigações de vias relacionadas à evolução biológica dos tumores, assim como incentivar a busca de novos enfoques tanto diagnósticos quanto terapêuticos.

5. Material e Métodos

5.1. Origem do material de estudo e aspectos éticos

Este estudo, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), obtiveram parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (FMVZ–UNESP). Protocolo nº 126/2015 (Anexos A e B).

5.2. Modelo experimental

Doze cães (*Canis lupus familiaris*) diagnosticados com TVTC sem nenhum tratamento prévio, sem predileção por raça e sexo com idade igual ou superior a dois anos provenientes do Hospital Veterinário da FMVZ–UNESP foram utilizados neste estudo com o consentimento de seus tutores por meio do TCLE.

Após confirmado o diagnóstico pela citopatologia por meio de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), os animais foram submetidos à antissepsia e anestesia no Hospital Veterinário (FMVZ–UNESP) para a realização da biópsia. Parte da amostra coletada foi conservada em microtubo de polipropileno contendo 1 mL da solução RNAlater® (Ambion® Life Technologies, AM7024), enquanto outra foi conservada em frasco contendo formalina tamponada a 7.4% em temperatura ambiente (TA).

No LPIC (FMVZ–UNESP), as amostras conservadas em formalina foram processadas de forma a contemplar o método convencional de Hematoxilina-Eosina (HE) para controle de qualidade do diagnóstico citológico. Para tal, as lâminas foram analisadas por microscopia de luz (Carl ZEISS®). O fragmento contido na solução de RNAlater® foi armazenado a -80°C até o seu processamento, isto é, a extração de RNA total.

5.3. Análise do comportamento biológico do TVTC

Para o estudo do comportamento biológico do tumor, foram avaliados os subtipos citomorfológicos do TVTC por meio da PAAF e dos

critérios estabelecidos por Flórez *et al.* (2012), que classifica os tumores em linfocitóide, plasmocitóide ou misto de acordo com a porcentagem de células observadas em 10 campos distintos em microscópio de luz (ZEISS®), aumento 60x.

Outras informações como sítio primário do tumor, tamanho e resposta a quimioterapia com infusão de 0,75 mg/m² de superfície corporal de sulfato de vincristina após quatro semanas também foram analisadas. Quanto a resposta terapêutica, esta foi classificada como completa (RC) quando se obteve regressão total do tumor em até quatro semanas, resposta parcial (RP) com 50% ou menos de regressão e resistente (R) quando houve necessidade de se alterar o protocolo terapêutico.

5.4. Extração de RNA total e obtenção de RNAm

Em todas as etapas de coleta e processamento do material higienizou-se as bancadas, pipetas e equipamentos com álcool 70%, água sanitária e solução RNase AWAY® (Ambion® Life Technologies, 10328-011), a fim de fazer a assepsia e eliminar qualquer RNA ou DNA presente. Ademais, todas as ponteiras, pistilos e microtubos foram autoclavados.

Para a extração de RNA total utilizou-se a solução TRIzol® reagente (Invitrogen™, 15596026). Para tal, as amostras foram mantidas no gelo e pesou-se 20 mg de cada amostra, que foi colocada em microtubo de polipropileno, macerada com o auxílio de um pistilo e centrifugou-se rapidamente por 1 minuto (centrifugação rápida).

Feito isso, adicionou-se 1 mL de TRIzol® reagente, macerou-se novamente a amostra e o material foi mantido a TA por 5 minutos para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio e agitou-se o tubo vigorosamente por 15 segundos, sendo mantido a TA por mais 3 minutos.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm e 4°C por 15 minutos, sendo transferida a parte aquosa para outro microtubo com 500 µL de álcool isopropílico gelado, que foi posteriormente agitado

vigorosamente por 30 segundos e mantido a TA por 10 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 15000 rpm e 4°C por 10 min, observando-se a formação de um *pellet*.

Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de álcool etílico 75%, seguido de uma agitação rápida em um vórtex a fim de desfazer o *pellet* e homogeneizar o material. Feito isso, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm e 4°C por 5 minutos, removeu-se o sobrenadante e o microtubo foi mantido aberto e voltado para baixo em papel filtro autoclavado por 10 minutos a TA na capela de fluxo laminar, a fim de que o álcool evaporasse completamente e as amostras ficassem secas.

As amostras foram eluidas em 60 µL de água ultrapura livre de endonucleases (*nuclease-free water*, água tratada com Dietil Pirocarbonato – DEPC, Promega, P1193) e ressuspensas, sendo posteriormente incubadas em banho-maria a 60° C por 10 minutos. Em seguida, foram feitas três alíquotas de 5 µL, que foram armazenadas a -80°C.

Após a extração do RNA total, o material foi transferido para o Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular do Instituto de Biotecnologia (IBTEC–UNESP), no qual a concentração do RNA extraído foi avaliada por meio do espectrofotômetro (NanoDrop™, ND-8000, Thermo Scientific, MA, USA). Para tal, 2 µL de cada amostra e o software ND-1000, versão v.3.31 foram utilizados. Nesta etapa também se analisou as razões de absorbância 260/230 nm e 260/280 nm, a fim de se verificar a pureza do material extraído e os resultados foram expressos em ng/µL.

Também se avaliou a integridade física do material por meio do Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) e, para tal, utilizou-se o Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, CA, USA). Nesta avaliação foram obtidos os valores do RIN (*RNA Integrity Number*). Para tal, os reagentes foram mantidos por 30 minutos a T.A. antes do uso, com exceção do marcador RNA 6000 Nano (verde), descongelado e mantido

no gelo.

Em cada tubo de microcentrífuga (inclusos no kit), colocou-se uma alíquota de 550 μL da matriz de gel Agilent RNA 6000 Nano (vermelho) no filtro de rotação (*spin filter*), colocou-se o filtro na microcentrífuga por 10 minutos a 3660 rpm a T.A. e adicionou-se 65 μL de gel filtrado nos tubos. Realizou-se uma agitação rápida em um vórtex de 10 segundos do corante azul RNA 6000 Nano, adicionou-se 1 μL desse corante e 65 μL do gel filtrado no tubo, que foi agitado e posteriormente centrifugado por 10 minutos a T.A. e 10774 rpm na microcentrífuga.

Retirou-se um novo chip RNA Nano da embalagem selada e colocou-se o chip na estação de injeção. Para tal, 9 μL do gel-dye foram colocados no fundo do poço marcado com (G) e distribui-se a mistura de corante gelatinoso por meio de uma pressão constante do êmbolo da seringa, posicionado em 1 mL.

Nesta etapa, verificou-se se a trava da estação estava fechada corretamente. Aguardou-se 30 segundos e soltou-se o êmbolo, inspecionando-se a volta deste para a marca de 0,3 mL. Após 5 segundos puxou-se lentamente o êmbolo para a posição de 1 mL e abriu-se a estação de preparo do chip.

Feito isso, 9 μL da mistura de corante gel foram pipetados em cada um dos poços marcados [G]. Colocou-se 5 μL do marcador RNA 6000 Nano (verde) nos poços de amostra e para minimizar a estrutura secundária (desnaturação), aqueceu-se as amostras a 70°C por 2 minutos antes de colocá-las no chip.

Em seguida, adicionou-se 1 μL do preparado *ladder* em cada poço marcado com o símbolo de uma escada, sendo pipetado 1 μL de cada amostra em seguida em cada um dos poços de amostra. Colocou-se o chip horizontalmente no adaptador do misturador de vórtice e realizou-se uma agitação rápida de 60 segundos em um vórtex.

Logo após, o chip foi colocado no bioanalisador Agilent 2100, sendo necessário verificar se o cartucho do eletrodo estava inserido corretamente

e se o seletor de chip estava na posição (1). Por meio do software 2100 expert, verificou-se que o chip foi inserido e realizou-se a leitura do RIN de cada amostra.

O material também foi analisado pelo fluorômetro (Qubit® 2.0 Fluorometer, Invitrogen™) e, para tal, utilizou-se o kit Qubit® RNA BR Assay (Invitrogen™) ou o kit Qubit® RNA HIGH Assay (Invitrogen™), de acordo com a concentração obtida pelo espectrofotômetro.

Por fim, separou-se o RNAm (purificado) por meio do kit NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (Illumina®) e o material foi armazenado a -80°C para posterior obtenção do DNA complementar (DNAc), sequenciamento e construção da biblioteca de transcriptoma.

5.5. Obtenção do DNAc e técnica de RNA-seq

Para obter o DNAc, realizou-se a transcrição por meio do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Illumina®) conforme as recomendações do fabricante. Feito isso, o DNAc de dupla fita obtido, foi novamente analisado pelo Bioanalyzer 2100 e, para tal, utilizou-se o Agilent DNA 1000 kit, seguindo-se a metodologia anteriormente citada.

Em seguida, as amostras foram submetidas ao protocolo de preparo das bibliotecas, e para tal, utilizou-se o SureSelect Strand-Specific RNA Library Preparation kit (Illumina® - Multiplex Sequencing) de acordo com as instruções do fabricante. Feito isso, as bibliotecas de DNAc foram purificadas por meio do kit AMPure XP beads (beckmann Coulter, Fullerton, EUA), adicionados os *primers* indexadores e a quantificação foi realizada por meio do KAPA Library Quantification kit (Illumina®), de acordo com as instruções do fabricante.

Nessa etapa, o RT-qPCR foi realizado por meio do 7500 Fast Real-Time PCR System e as curvas obtidas pelo software 7500 Software, versão 2.06 (Life Technologies™). Posteriormente, o *pool* das amostras foi submetido ao sequenciador NextSeq® 500 System (Illumina®) e, para tal,

utilizou-se o kit NextSeq 500/550 High Output Kit V2 (Illumina®) e a *flow cell* de 150 ciclos.

5.6. Análises de Bioinformática e Estatística

Após a obtenção dos dados, as sequências (*reads*) geradas no formato fastq foram alinhadas, sendo que o sequenciamento foi do tipo *single-read*, ou seja, cada amostra foi identificada por um *index* composto por oito pares de bases nitrogenadas conhecidas e localizadas em apenas uma das extremidades do DNAC. Para o alinhamento, se utilizou a ferramenta computacional STAR.

Desta forma, as sequências de cada um dos transcritos de interesse foi montada por meio do software Bioconductor com base no genoma do cão (*Canis lupus familiaris*) disponível no banco de dados Ensembl (Dog CanFam3.1). O número de *reads* foi normalizado pelo número total de *reads* de cada amostra e pelo tamanho dos transcritos. Esse valor, denominado de RPKM (*reads or fragments per kilobase exon per million reads*), foi utilizado para comparar a expressão entre as amostras estudadas.

Feito isso, analisou-se a similaridade entre as amostras por meio das distâncias euclidiana e de Poisson, verificando-se diferenças entre as amostras saudáveis e tumorais. Essa análise também foi realizada por meio da análise dos componentes principais (PCA).

As expressões diferenciais dos genes foram analisadas por meio do software R com o pacote Deseq2 e os genes foram considerados diferencialmente expressos para $p < 0.05$ e $\log_2 FC$ (*fold change*) > 2 . Além disso, genes com *false discovery rate* (FDR) $< 0,01$ foram considerados diferencialmente expressos e divididos em sub e sobreexpressos com base no $\log_2 FC$.

Os genes diferencialmente expressos entre os grupos, representado pelo MA-plot (Gráfico 1), foi montado a partir do número de

contagens, sendo que os genes que foram muito pouco expressos em ambos os grupos não foram considerados.

Em seguida foi realizada análise da expressão gênica diferencial com $\log_2 FC = 2$ e p-ajustado (BH - Benjamim-Hochberg) = 0,01, de modo a restringir o número de genes diferencialmente expressos, o que aumenta a reprodutibilidade dos dados obtidos. Desta forma, os genes sobreexpressos ou *upregulated* têm uma expressão significativamente maior nas amostras tumorais do que nas saudáveis e o mesmo é válido para os subexpressos ou *downregulated*.

Estas análises foram realizadas em parceria com o Grupo de Simulação e Modelagem Computacional da UNESP, Campus de Itapeva.

5.7. Análise dos genes diferencialmente expressos

Após a obtenção dos genes diferencialmente expressos no TVTC, estes foram analisados quando a sua função biológica e envolvimento na progressão tumoral ou na evasão da resposta imune do hospedeiro, principalmente. Para tal, os genes foram analisados na base de dados Human Protein Atlas, My Cancer Genome® - Genetically Informed Cancer Medicine e Gene Ontology Consortium.

Feito isso, da expressão global de 892 genes diferencialmente expressos, sendo 293 sobreexpressos ou *upregulated* e 599 subexpressos ou *downregulated*. Tais genes foram avaliados separadamente quanto a sua possível relação com a progressão tumoral e evasão da resposta imune do hospedeiro, principalmente, sendo também avaliados quanto a outros eventos celulares importantes como o reparo de DNA, apoptose e adesão celular por exemplo.

6. Resultados e Discussão

6.1. Controle de qualidade diagnóstico e dados clínicos

O controle de qualidade diagnóstico do TVTC pela histopatologia confirmou o diagnóstico citopatológico, isto é, a presença da lesão neoplásica (Figura 3), sendo a citologia, diferentemente da histologia, um método rápido, de baixo custo e minimamente invasivo, embora não traga informações a respeito da invasão tecidual (BRANDÃO *et al.*, 2002; AMARAL *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2014).

Com o objetivo de realizar um pronto diagnóstico do TVTC na clínica, o exame citopatológico mostra-se altamente sensível e também fornece informações a respeito dos subtipos citomorfológicos do tumor como constatado por Flórez *et al.* (2012). Neste estudo, observou-se que 41,66% dos casos eram de aspecto linfocitoide, 25% plasmocitoide e 33,34% misto (Tabela 1).

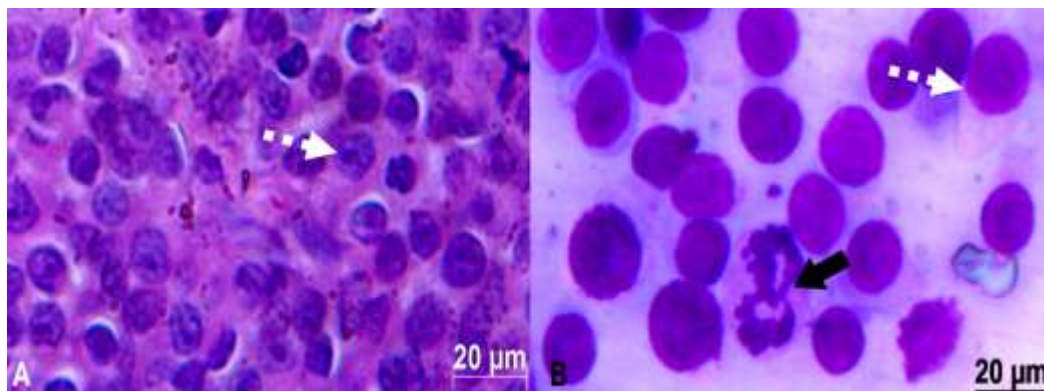


Figura 3 - Tumor Venéreo Transmissível Canino. Histologia (A): Pleomorfismo celular, núcleo e nucleolos proeminentes (seta tracejada), atipias de coilocitose. Coloração HE. Citologia (B): Células redondas, pleomórficas, com núcleos centrais ou excêntricos, célula de aspecto plasmocitoide (seta tracejada), célula em divisão (seta preta). Coloração Giemsa, (ZEISS®) (Arquivo FMVZ).

Em relação aos dados clínicos dos cães (Tabela 1), a idade variou de 4 a 12 anos, sendo entre 2 e 5 anos em 58,33% dos casos, que é o período de maior atividade reprodutiva desses animais, que em sua maioria tinham acesso à rua. Tal resultado está em concordância com os

estudos de SILVA *et al.* (2007), LIMA (2013), STRAKOVA & MURCHISON (2014) e FONSECA *et al.* (2017).

Quanto a raça, 75% era sem raça definida (SRD), um Blue Heller, um Pinscher e um Teckel-Daschound. Não se observou predisposição quanto ao sexo, tendo apenas um macho acometido a mais do que as fêmeas como verificado por Silva *et al.* (2007), Caldas & Silva (2012) e Bonilla *et al.* (2015). Tais resultados indicam que há um baixo controle reprodutivo desses animais, bem como livre acesso à ruas, como constatado por Strakova & Murchison (2015).

Em relação a localização, em 91,67% dos casos o tumor estava na região genital, sendo um caso na região cervical, de modo que os resultados estão em concordância com os estudos de Silva *et al.* (2007), Flórez (2014) e Camolese *et al.* (2016). Observou-se apenas um caso de metástase no baço e essa baixa porcentagem está em concordância com os estudos de Sousa *et al.* (2000) e Santos *et al.* (2005).

O tamanho do tumor variou de 2 a 5 cm de diâmetro em 45,45% dos casos, sendo superior a 5 cm em 18,18% e observou-se invasão local com extensão tumoral em 36,36%, o que está de acordo com os estudos de Santos *et al.* (2005) e Flórez (2014).

A resposta ao tratamento quimioterápico foi completa em 36,36% dos casos, parcial em 45,45% e resistente em 18,18%, sendo que um dos animais não foi tratado por ter falecido antes da primeira sessão de quimioterapia, não sendo observada relação entre o subtipo citomorfológico e a resposta ao tratamento.

Tabela 1 - Dados clínicos dos cães com TVTC quanto a idade (anos), sexo, raça, localização e tamanho do tumor, classificação citomorfológica e resposta ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina (infusão de 0,75 mg/m² de superfície corporal).

Caso	Idade (anos)	Sexo	Raça	Localização do tumor	Tamanho do tumor (cmxcm)	Classificação citomorfológica	Resposta ao tratamento
1	5	M	SRD*	pênis	4 x 3	misto	RP*
2	3	F	SRD	vagina	6 x 4	plasmocitoide	RC*
3	4	M	SRD	pênis	5 x 4	plasmocitoide	RC
4	6	M	SRD	pênis	10 x 5	linfocitoide	RP
5	10	M	SRD	pênis	Invasivo*	misto	RP
6	4	F	SRD	vagina	3 x 2	linfocitoide	RC
7	adulto*	M	SRD	pênis	invasivo	linfocitoide	R*
8	5	F	Blue Heller	vagina	invasivo	misto	R
9	8	M	SRD	pênis	invasivo	plasmocitoide	RP
10	7	F	Pinscher	vagina	1 x 0,5	misto	RC
11	adulto	F	SRD	vagina	4,5 x 3	linfocitoide	RP
12	12	M	Teckel-Daschound	região cervical	SI*	linfocitoide	***

*Adulto - 2 anos ou mais; SRD - sem raça definida; Invasivo - invasão local; SI - sem informação; RP - resposta parcial; RC - resposta completa; R - resistente ao tratamento; ***animal não tratou (óbito antes da primeira sessão de quimioterapia).

Nota-se que os dados apresentados na Tabela 1, em concordância com Duzanski *et al.* (2016), indicam que parece não haver relação entre a idade, raça, tamanho e subtipo citomorfológico do tumor com a resposta ao tratamento quimioterápico, embora os resultados deste estudo apresentem como limitação o número de animais estudados.

Uma possível relação encontrada neste estudo é quanto ao sexo do animal e a resposta ao tratamento. Observou-se que dos quatro casos de resposta completa, três dos animais eram fêmeas, mas este resultado também se limita ao número de animais estudados e não há correlação quanto a este aspecto presente na literatura.

6.2. Expressão diferencial de genes no TVTC

Em relação a qualidade do material extraído (Tabela 2), obteve-se bons resultados em todas as variáveis e casos, isto é, o RNA apresentou-se íntegro, não houve contaminação por fenóis, proteínas ou por outros

contaminantes que absorvem fortemente no comprimento de onda igual ou próximo a 280 nm, de modo que a relação 260/280 foi próxima de 1,8 a 2,0, o que indica que os ácidos nucleicos estavam puros.

A razão 260/230, um indicativo secundário de pureza, foi próxima de 1,8 a 2,2, de modo que não houve contaminação por polissacarídeos ou solvents orgânicos. Os valores obtidos nessas relações estão de acordo com os limítrofes indicadores de pureza e com os estudos de Desjardins & Conklin (2010), Viana *et al.* (2012) e Lopes (2016), assim como as indicações do manual NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8.

Tabela 2 - Qualidade do RNA extraído das amostras de Tumor Venéreo Transmissível Canino quanto a integridade do RNA (RIN), absorbância nas relações 260/280 nm e 260/230 nm e concentração (ng/μL).

Caso	RIN	Absorbância (nm/nm)		Concentração (ng/μL)
		260/280	260/230	
1	7,4	1,98	2,24	1,2*10 ³
2	7,5	1,90	2,23	858
3	7,6	2,00	2,24	> 6 μg/mL**
4	8,6	1,87	2,28	722
5	7,6	1,86	2,33	872
6	6,4*	1,88	2,28	1,02*10 ³
7	7,4	1,86	2,30	974
8	7,6	1,88	2,26	764
9	7,5	1,89	2,26	768
10	7,5	1,97	2,16	1,16*10 ³
11	7,5	1,95	2,18	> 6 μg/mL
12	8,0	1,95	1,99	1,02*10 ³

*Amostra com RIN menor que as demais; **Amostra concentrada até ficar próximo de 1*10³ ng/μL.

A partir do sequenciamento em larga escala do TVTC, verificou-se que 85% dos *reads* alinharam com algum gene do cão, de modo que a biblioteca pode ser considerada de boa qualidade pela alta taxa de mapeamento como verificado por Dobin & Gingeras (2015).

Na expressão global dos transcritos obteve-se 892 genes

diferencialmente expressos, sendo que houve um aumento da expressão em 293 genes e diminuição em 599. Também pode-se referir a estes resultados como diminuição ou aumento da regulação da expressão gênica, de modo que os genes estão *downregulated* ou *upregulated*, respectivamente.

Tal distribuição é apresentada no MA-plot (Gráfico 1), no qual se tem a distribuição dos coeficientes estimados da expressão gênica baseada no $\log_2 \text{fold change}$ em relação ao controle. Observa-se que cada gene corresponde a um ponto, sendo os genes diferencialmente expressos representados em vermelho.

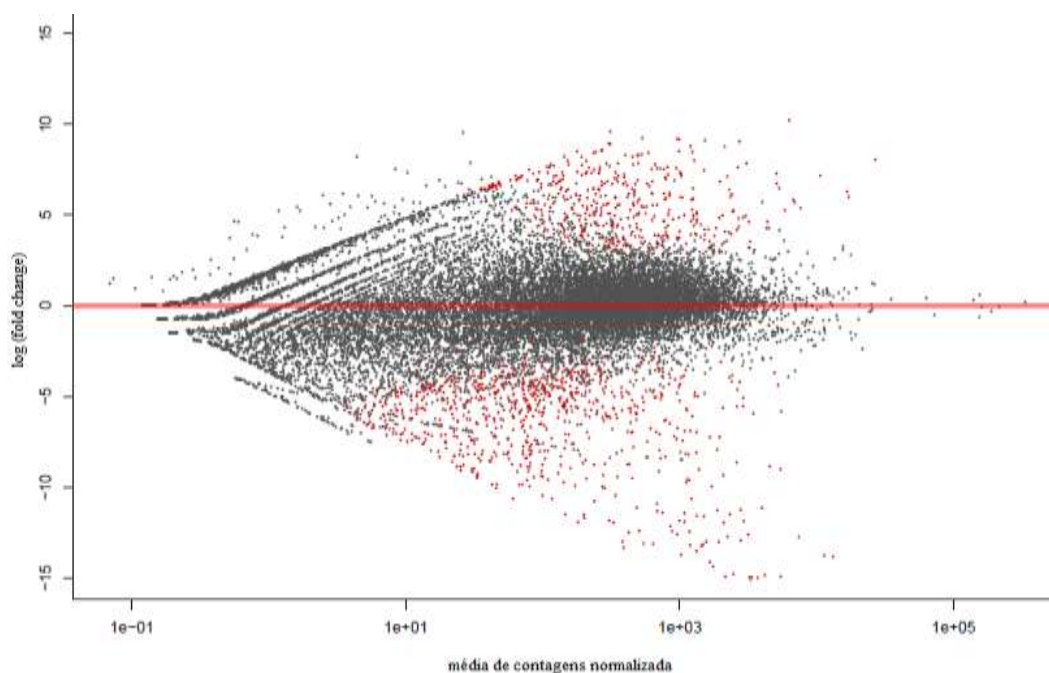


Gráfico 1 - MA-plot da distribuição dos coeficientes estimados da expressão gênica baseada no $\log_2 \text{fold change}$ ($FC > 2$) do TVTC em relação ao tecido sadio. O eixo das abcissas mostra a média de contagem normalizada por fator de tamanho e o eixo das ordenadas mostra a comparação por $\log_2 \text{fold change}$ ($\log_2 FC$). Cada gene é representado por um ponto. Genes em vermelho com valor de p ajustado (*false discovery rate* – FDR) acima de 0 no eixo das ordenadas são genes *upregulated* e abaixo de 0 são *downregulated*.

O heat map (Gráfico 2) mostra a similaridade entre as bibliotecas e observa-se que as amostras foram clusterizadas em dois grupos principais: saudável e tumoral, o que demonstra que as amostras presentes em cada

grupo são similares entre si, sendo que o caso representado como P23 (caso 12) é o mais diferente entre os tumorais, o que pode dever-se a localização do tumor na região cervical, sendo os demais casos localizados na região genital, que é o mais comum.

Além disso, observa-se pelo Heat map (Gráfico 2) uma semelhança entre três dos casos de resposta completa, P21, P17 e P13, o que indica que a expressão tumoral desses animais é muito próxima. Em comparação com os dados clínicos, verificou-se que esses animais eram fêmeas, mas tal relação não é relatada na literatura.

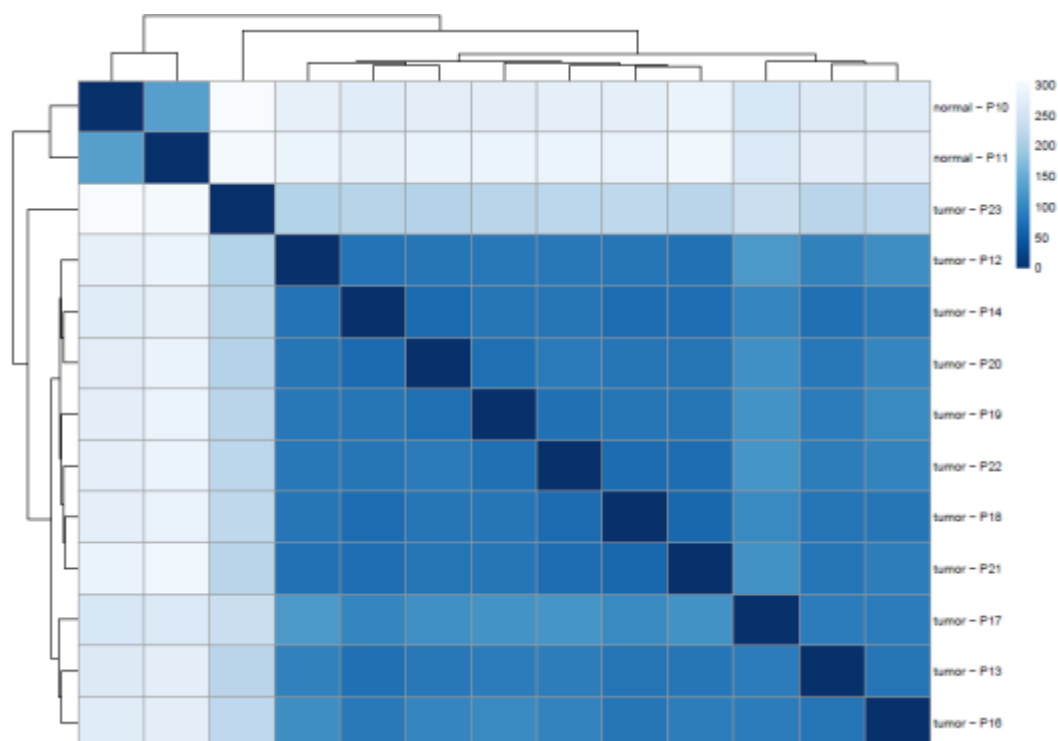


Gráfico 2 - Heat map das amostras de Tumor Venéreo Transmissível Canino pelo método de distância Euclidiana, sendo P10 e P11 amostras de tecido sadio e as demais de tecido tumoral. Há maior semelhança entre os grupos sadio e tumoral com exceção de P23.

6.3. Perfil transcricional do TVTC

A análise global do perfil transcricional do tumor permitiu identificar o envolvimento desses genes em eventos biológicos importantes como, por

exemplo, progressão tumoral, reparo do DNA, regulação da resposta imune, angiogênese, regulação gênica, apoptose, adesão celular e regulação do ciclo celular (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Genes *upregulated* no Tumor Venéreo Transmissível Canino. Identificação do gene (EntrezGene ID), símbolo, descrição (função biológica) e p-valor.

EntrezGene ID	Símbolo	Descrição*	p-valor
491156	ATAD5	Marcador prognóstico favorável para câncer colorretal e não favorável para câncer renal; participa do ciclo celular; pode estar envolvido na progressão tumoral	$1,2 \times 10^{-7}$
403437	BRCA1	Supressor tumoral; envolvido no ciclo celular (necessário para a progressão do ciclo celular normal de G2 para mitose); reparo do DNA; regulação da transcrição para manter a estabilidade genômica; mutações neste gene são responsáveis pelos cânceres de mama hereditários e de mama e ovário herdados	$1,76 \times 10^{-8}$
487965	CBLB	Proto-oncogene que regula negativamente a proliferação celular; limita a ativação de linfócitos T	$1,07 \times 10^{-6}$
483297	CD300LF	Envolvido na regulação da resposta imune; manutenção da homeostase imunológica	$9,68 \times 10^{-6}$
489949	CORO1A	Marcador prognóstico não favorável para câncer renal e favorável para câncer endometrial e de cabeça e pescoço; pode ser um componente crucial do citoesqueleto de células altamente móveis, atuando na invaginação da membrana plasmática e na formação de protrusões desta, com envolvimento na locomoção celular; membros desta família estão envolvidos na regulação gênica e apoptose	$1,98 \times 10^{-7}$
403850	CXCL8	Marcador prognóstico não favorável para câncer renal, cervical e hepático; envolvido na ativação de neutrófilos; quimiotaxia de neutrófilos; um dos principais mediadores da resposta inflamatória; angiogênese	$2,80 \times 10^{-4}$
608156	CXCL13	Marcador prognóstico não favorável para câncer renal e favorável para câncer endometrial, de ovário e colorretal; quimiotaxia de neutrófilos; promove preferencialmente a migração de linfócitos B (em comparação com células T e macrófagos), aparentemente por estimular o influxo de cálcio	$4,66 \times 10^{-8}$
485160	DDIAS	Supressor de apoptose induzido por dano ao DNA	$6,07 \times 10^{-4}$
490279	DTL	Marcador prognóstico não favorável para câncer renal e hepático; replicação do DNA; a degradação de CDT1 em resposta a danos no DNA é necessária para garantir a regulação adequada do ciclo celular da replicação do DNA	$4,87 \times 10^{-5}$
611838	HMMR	Marcador prognóstico não favorável para câncer hepático, pancreático, de pulmão e de cabeça e pescoço; envolvido na transformação	$7,14 \times 10^{-9}$

		celular e metástases	
483231	IKZF1	Marcador prognóstico favorável para câncer de mama, cervical e de cabeça e pescoço; regulador do desenvolvimento de células imunes, principalmente células B iniciais e T CD4+; regulador da transcrição	$1,13 \cdot 10^{-13}$
481327	IL18RAP	Resposta inflamatória; a proteína codificada por esse gene é uma subunidade acessória do receptor heterodimérico da interleucina 18 (IL18), uma citocina pró-inflamatória envolvida na indução da imunidade mediada por células	$3,11 \cdot 10^{-12}$
485930	NFATC2	Marcador prognóstico não favorável para câncer renal; promove a migração celular; participa da indução da transcrição gênica durante a resposta imune	$2,72 \cdot 10^{-5}$
611768	RAD51AP1	Marcador prognóstico não favorável para câncer renal, pancreático, hepático e endometrial; pode participar de uma via comum de resposta ao dano ao DNA associada à ativação da recombinação homóloga e ao reparo da quebra da dupla fita	$2,29 \cdot 10^{-5}$
485781	RASSF2	Marcador prognóstico não favorável para câncer renal; potencial supressor de tumor; atua como uma proteína efetora específica do KRAS; pode promover apoptose e parada do ciclo celular	$1,84 \cdot 10^{-6}$
477221	RBL1	Marcador prognóstico não favorável para câncer renal; regula transcrição; supressor tumoral que parece estar envolvido na regulação do ciclo celular	$3,60 \cdot 10^{-5}$
490310	RNASEL	Mutações neste gene foram associadas à predisposição ao câncer de próstata	$4,04 \cdot 10^{-4}$
482963	RRM2	Marcador prognóstico não favorável para câncer renal, hepático e pancreático; replicação do DNA (fornece precursores necessários)	$3,73 \cdot 10^{-5}$
476350	SEMA4D	Marcador prognóstico favorável para câncer cervical e urotelial; desempenha um papel no sistema imunológico; induz as células B a se agregar e melhora sua viabilidade (<i>in vitro</i>).	$2,46 \cdot 10^{-8}$
482366	SKAP2	Possível envolvimento na regulação da ativação adequada do sistema imunológico e na regulação negativa da invasão tumoral	$5,11 \cdot 10^{-5}$
488810	SLBP	Marcador não favorável para câncer hepático; envolvido no direcionamento do RNAm de histonas maduras do núcleo para o citoplasma	$1,32 \cdot 10^{-5}$
487438	TNFRSF8	Receptor expresso por células T e B ativadas; regulador celular da apoptose	$3,46 \cdot 10^{-17}$
477186	TPX2	Marcador prognóstico não favorável para câncer renal, hepático, endometrial, pancreático e de pulmão; necessário para a montagem normal dos microtúbulos durante a apoptose	$6,27 \cdot 10^{-6}$
611463	UHRF1	Marcador prognóstico não favorável para câncer pancreático, hepático e melanoma; desempenha papel importante na transição G1/S e funciona no ponto de verificação de danos ao DNA dependente de p53	$2,41 \cdot 10^{-12}$

*Informações retiradas da base de dados The Human Protein Atlas¹.

Tabela 4 - Genes *downregulated* no Tumor Venéreo Transmissível Canino. Identificação do gene (EntrezGene ID), símbolo, descrição (função biológica) e p-valor.

EntrezGene ID	Símbolo	Descrição*	p-valor
610078	CXCL14	Marcador prognóstico favorável para câncer cervical e colorretal; quimiotaxia de monócitos; envolvido na homeostase de macrófagos derivados de monócitos	$8,81 \cdot 10^{-6}$
608476	FABP4	Proteína transportadora de ácidos graxos expressa principalmente em adipócitos e macrófagos; regulação positiva de vias associadas à metastase	$2,80 \cdot 10^{-42}$
484198	GADD45G	Marcador prognóstico favorável para câncer pancreático e endometrial; envolvido na regulação do crescimento e apoptose	$1,17 \cdot 10^{-5}$
479435	NCAM1	Marcador prognóstico não favorável para câncer renal e favorável para câncer pancreático; codifica uma proteína de adesão celular que é membro da superfamília das imunoglobulinas. A proteína codificada está envolvida nas interações célula a célula, bem como nas interações célula-matriz durante desenvolvimento e diferenciação	$3,89 \cdot 10^{-8}$
486042	TNFRSF19	Marcador prognóstico favorável para câncer renal e de pulmão; induz apoptose por mecanismo independente de caspase	$3,00 \cdot 10^{-9}$
488699	TRPM1	Supressão metastática; expressão inversamente correlacionada com agressividade do melanoma, sendo utilizada como marcador prognóstico para metastases de melanoma	$5,72 \cdot 10^{-17}$
483140	VTCN1	Regula negativamente a resposta imune mediada por células T de modo a inibir a ativação, proliferação, produção de citocinas e desenvolvimento de citotoxicidade das células T. Quando expresso na superfície celular de macrófagos tumorais, desempenha papel importante, juntamente com as células T reguladoras (Treg), na supressão da imunidade das células T antígeno-específicas associadas ao tumor	$8,52 \cdot 10^{-7}$

*Informações retiradas da base de dados The Human Protein Atlas¹.

Alguns genes são apontados como marcadores prognósticos tumorais, como é o caso de RNASEL (*ribonuclease L*), *upregulated* no TVTC. Tal gene é associado à predisposição do câncer de próstata e a progressão do tumor, como relatado por Meyer *et al.* (2010), que utilizaram o produto deste gene como marcador sanguíneo, sendo esta uma abordagem pouco explorada no TVTC.

Também observou-se a presença de supressores tumorais, como BRCA1 (*breast cancer 1*), RASSF2 (*Ras association domain family*

member 2) e RBL1 (*RB transcriptional corepressor like 1*), por exemplo, mas que ao sofrerem mutações perdem tal função. BRCA1, por exemplo, associado ao câncer de mama, tem relação com a regulação da expressão gênica e reparo do DNA, além de regular negativamente a proliferação celular (AMENDOLA; VIEIRA, 2005; GREGORIS, 2012).

Neste estudo, BRCA1 está *upregulated*, de modo que está sendo expresso acima do normal e, portanto, perdeu sua capacidade protetora, o que contribui para o desenvolvimento tumoral pela inativação e desregulação transcricional, falta de reparo aos danos no DNA, falta de controle do ciclo celular e, conseqüentemente, contribui na proliferação celular.

Quanto a resposta imune, observa-se o envolvimento de CD300LF (*CD300 Molecule Like Family Member F*), NFATC2 (*nuclear factor of activated T cells 2*), SEMA4D (*Semaphorin 4D*), SKAP2 (*Src kinase associated phosphoprotein 2*), VTCN1 (*V-set domain containing T cell activation inhibitor 1*) e CBLB (*Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene-b*).

Dentre tais genes, CBLB trata-se de um proto-oncogene que limita a ativação de linfócitos T (regulação negativa), responsáveis pela defesa do organismo contra agentes desconhecidos (antígenos), de modo a induzir a apoptose de células danificadas ou cancerígenas e se diferenciar de acordo com a sua função em citotóxicos (CD8), auxiliares (CD4), *natural killer* (NK) e de memória (CD45). (LIU *et al.*, 2014; CHE *et al.*; 2017).

No TVTC, tal gene está *upregulated*, de modo que se o sistema imunológico dos cães estivesse deficiente em CBLB, como no estudo de Salzberg *et al.* (2014) com camundongos, no qual os autores descreveram CBLB como um promissor alvo terapêutico para melhorar a atividade imune antitumoral, possivelmente o organismo dos cães seria capaz de combater o tumor como ocorreu com os camundongos.

Em relação a progressão tumoral, CXCL7 foi descrito por Guo *et al.* (2017) na proliferação celular em colangiocarcinomas e por Chiang *et al.*

(2012) na progressão do TVTC. Neste estudo, a expressão de CXCL8 e CXCL13 foi observada como *upregulated* e de CXCL14 como *downregulated*, os quais fazem parte da família CXC assim como CXCL7.

A síntese autócrina de CXCL8 pelas células cancerígenas traz implicações quanto ao desenvolvimento e progressão tumoral (Figura 4), uma vez que induz a secreção de fatores de crescimento adicionais por macrófagos associados ao tumor e infiltração quimiotática de neutrófilos, assim como promove angiogênese, invasão de tecidos adjacentes e, conseqüentemente, migração das células tumorais (SANTONI *et al.*, 2014).

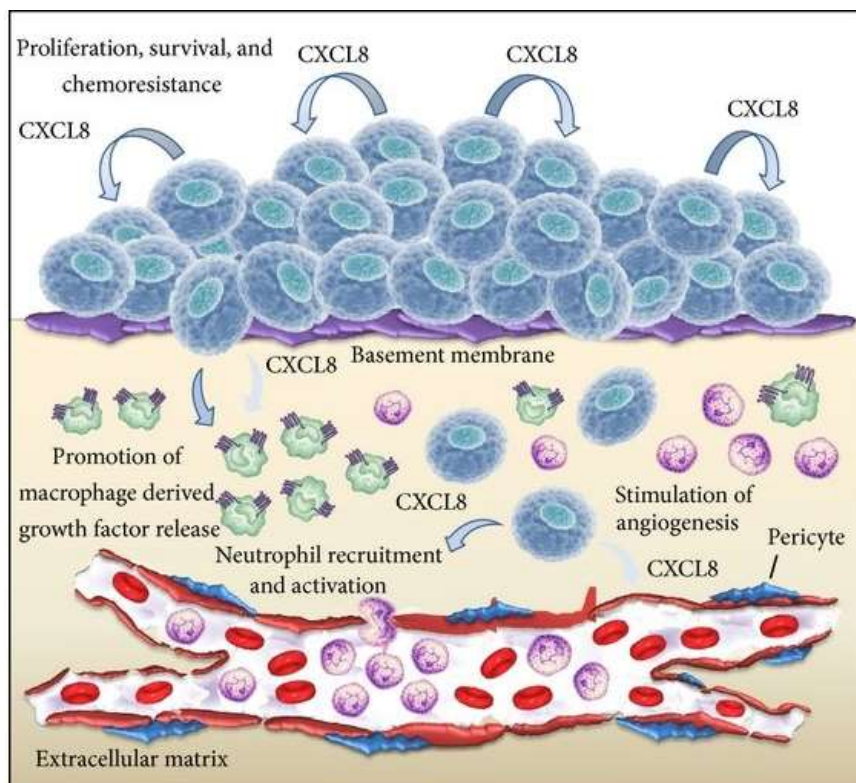


Figura 4 - Interação de CXCL8 com o microambiente tumoral: estímulo da angiogênese, invasão e migração, recrutamento de neutrófilos (retirado de Santoni *et al.*, 2014).

Além disso, observou-se alteração na expressão de NCAM1 (*neural cell adhesion molecule 1*), que codifica uma proteína de adesão celular (CORADAZZI *et al.*, 2003). Tal gene está *downregulated* no TVTC e pode estar relacionado com a transmissão do tumor, pois as células precisam

se desprender para serem implantadas e, neste caso, haveria pouca adesão célula-célula.

Por fim, observa-se que os genes diferencialmente expressos no TVTC estão envolvidos, de um modo geral, na progressão tumoral, o que inclui angiogênese e posterior metástase, assim como falta de reparo do DNA e supressão da apoptose.

7. Referências Bibliográficas¹

ALLISON, D. B.; CUI, X. PAGE, G. P.; SABRIPOUR, M. Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat. Ver. Genet.*, 2006; 7:55-65.

AKTIPIIS, A. C.; NESSE, R. M. Evolutionary foundations for cancer biology. *Evol. Appl.*, 2013; 6(1):144-159.

AMARAL, A. S.; BASSANI-SILVA, S.; FERREIRA, I.; FONSECA, L. S.; ANDRADE, F. H. E.; GASPAR, L. F. J.; ROCHA, N. S. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. *Rev. Port. Ciên. Vet.*, 2007; 103:563–564.

AMENDOLA L. C. B.; VIEIRA R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. *Rev. Bras. Cancerologia*, 2005; 51(4): 325-330.

BARRETT, C. L.; DEBOEVER C.; JEPSEN, K.; SAENZ, C.C.; CARSON, D.A.; FRAZER, K.A. Systematic transcriptome analysis reveals tumor-specific isoforms for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015; 112(23): E3050-E3057.

BATTLE, A.; MOSTAFAVI, S.; ZHU, X.; POTASH, J. B.; WEISSMAN, M. M.; MCCORMICK, C.; *et al.* Characterizing the genetic basis of transcriptome diversity through RNA-sequencing of 922 individuals. *Genome Res.*, 2014; 24(1):14-24.

BIRHAN, G.; CHANIE, M. A review on Canine Transmissible Venereal Tumor: from morphologic to biochemical and molecular diagnosis. *Acad. J. Anim. Dis.*, 2015; 4(3):185-195.

BODE; A. M.; DONG, Z. Cancer prevention research – then and now. *Nat. Rev. Cancer*. 2009; 9(7):508-516.

BONILLA, F. T. R.; GASCA, L. G. S.; GOMEZ, N. R. M.; MELLIZO, L. J. A.; TRUJILLO, R. G. Reporte de caso: tumor venereo transmissível em perro mestiço. *Rev. Eletronic. Vet.*, 2015; 16(1):1-11.

BRANDÃO, C. V. S., BORGES, A. G.; RANZANI, J. T.; RAHAL, S. C.; TEIXEIRA, C. R. Tumor Venéreo Transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998 – 2000). *Rev. Educ. Contin. CRMV-SP*, 2002; 5(1):25-31.

¹Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT). NBR 14724: informação e documentação – trabalhos acadêmicos – apresentação. Rio de Janeiro; 2011.

CALDAS, G. F.; SILVA, C. R. N. Tumor Venéreo Transmissível: incidência em cães atendidos no Hospital Veterinário de Itajubá. In: Congresso de Iniciação Científica da FEPI, 2012, Itajubá. Anais do III Congresso de Iniciação Científica da FEPI. Itajubá: Revista Científica Universitas, 2012, 3: 38-40. ISSN: 2175-4020.

CAMOLESE, L. C.; BERGAMO, T. M.; BARROS, V. T. M.; VOORWALD, F. A.; TONIOLO, G. H.; FRIOLANI, M. Tumor Venéreo Transmissível com Metástase Cutânea e Ocular em Cão: Relato de Caso. Unimar Ciênc., 2016; 25:28-31.

CASTRO, K. F. Tumor Venéreo Transmissível Canino - I. Expressão gênica e proteica e caracterização genotípica de DLADQA-1 (MHC-II); II. Estudo imunohistoquímico da resposta imune local. Jaboticabal, 2015. 6-9, 11 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. How does multistep tumorigenesis really proceed? Cancer Discov., 2015; 5(1):22-24.

CHE X.; ZHANG Y.; QU X.; GUO T.; MA Y.; LI C.; *et al.* The E3 ubiquitin ligase Cbl-b inhibits tumor growth in multidrug-resistant gastric and breast cancer cells. Neoplasma, 2017; 64(6):887-892.

CHEN, H.; XIAO, G.; CHAI, X.; LIN, X.; FANG, J.; TENG, S. Transcriptome analysis of sex-related genes in the blood clam. Tegillarca Granosa. Plos One, 2017; 12(9):1-21.

CHIANG, H. C.; WANG, Y. S.; CHOU, C. H.; LIAO, A. T.; CHU, R. M.; LIN, C. S. Overexpression of chemokine ligand 7 is associated with the progression of canine transmissible venereal tumor. BMC Vet. Res., 2012; 8(216):1-7.

CHIKWETO, A; KUMTHEKAR, S.; LARKIN, H.; DEALLIE, C.; TIWARI, K. P.; SHARMA, R. N.; *et al.* Genital and Entragenital Canine Transmissible Venereal Tumor in Dogs in Grenada, West Indies. Open J. Vet. Med., 2013; 3:111-114.

COLLINS, F. S.; PATRINOS, A.; JORDAN, E.; CHAKRAVARTI, A.; GESTELAND, R.; WALTERS, L. New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. Sci., 1998; 282(5389): 682-689.

CONTI, C. J. Mechanisms of Tumor Progression. Comprehensive Toxicol., 2010; 14(2):335-347.

CORADAZZI A. L.; RESENDE L. S. R.; NETO F. A. M.; LATORRE M. R. D. O.; BACCHI M. M.; NEIREO-MELO L. Determinação da expressão da molécula de adesão CD56 em plasmócitos no mieloma múltiplo através de estudo imunohistoquímico. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., 2003; 25(3):155-160.

COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. Patologia: Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 8ª ed., 2010, 277-279 p.

DECKER, B.; DAVIS, B. W.; RIMBAULT, M.; LONG, A. H.; KARLINS, E.; JAGANNATHAN, V., *et al.* Comparison against 186 canid whole-genome sequences reveals survival strategies of an ancient clonally transmissible canine tumor. *Genome Res.*, 2015; 25(11):1646-1655.

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop Microvolume Quantification of Nucleic Acids. *J. Vis. Exp.*, 2010; 45:1-5.

DOBIN, A.; GINGERAS, T. R. Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Curr. Protoc. Bioinformatics*, 2015; 51:1-23.

DU, Q.; LI, E.; LIU, Y.; XIE, W.; HUANG, C.; SONG, J.; *et al.* CTAPIII/CXCL7: a novel biomarker for early diagnosis of lung cancer. *Cancer Med.*, 2018; 7(2):325-335.

ESWARAN, J.; HORVATH, A.; GODBOLE, S.; REDDY, S. D.; MUDVARI, P.; OHSHIRO, K.; *et al.* RNA sequencing of cancer reveals novel splicing alterations. *Sci. Rep.*, 2013; 3(1689):1-12.

FALCÃO, M. A. P.; ANDRADE, L. S. S.; SOUSA, D. L. S.; SOUZA, A. C.; FRAGOSO, K. B.; CARVALHO, C. C. D.; *et al.* Tumor Venéreo Transmissível interno à mucosa vaginal: aspectos clínicos, diagnósticos e tratamento. In: Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2013, Recife. Anais da XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Recife: JEPEX, 2013.

FARIA, J. A. Q. A.; ANDRADE, C.; GOES, A. M.; RODRIGUES, M. A., GOMES, D. A. Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016; 478(1):39-45.

FIBAO - Medicina Nuclear. Nanotecnologia e câncer. 2009. Disponível em:<<http://medmol.es/revisiones/49/>>. Acesso em: 13 ago. 2018. 2 p.

FLÓREZ, L. M. M. Expressão dos genes MDR-1, TP53, BCL-2 E BAX em tumor venéreo transmissível canino e sua relação com a agressividade e resposta à terapia. Botucatu, 2014. 1-2, 10-11 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista.

FLORÉZ, L. M. M.; FÊO, H. B.; ROCHA, N. S. Tumor venéreo transmissível canino: expressão dos genes MDR-1, TP53 e da família Bcl-2 implicações no comportamento biológico e terapêutico. *CES Med. Vet. Zootec.*, 2014; 9(2):281-294.

FONSECA, F. M. C.; CASTRO, G. N.; RIBEIRO, M. C.; STEFANINE, N. R.;

MOURA, L. T. S.; JAVAÉ, N. R. K. Incidência de Tumor Venéreo Transmissível em Caninos. Ver. Cientific. Med. Vet., 2017; 28:1-9. ISSN: 1679-7353.

FRAGOSO, M. F. Efeito protetor do açaí (*Euterpe oleracea martius*) na promoção da carcinogênese química de cólon em ratos Wistar. Botucatu, 2013. 9 p.

GARBER, M.; GRABHER, M. G.; GUTTMAN, M.; TRAPNELL, C. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. Nat. Theods, 2011: 8(6):469-477.

GREGORIS, G. Avaliação funcional de variantes *Missense* de BRCA1: estudo para o aperfeiçoamento do ensaio de transativação transcricional. Rio de Janeiro, 2012. 19-21 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.

GUERREIRO, R.; SANCTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As Quimiocinas e os seus Receptores - Características e Funções Fisiológicas. Acta Med. Port., 2011; 24: 967-976.

GOMES, R. V.; RODRIGUES, M. A.; RODRIGUES, J. B. S. R.; VIDIGAL, P. T.; DAMASCENO, K. A.; LIMA, H. A.; *et al.* Expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) em colangiocarcinomas: fatores preditivos e sobrevida. Rev. Col. Bras. Cir., 2018; 45(3):1-9.

GRANDI, F.; MIOT, H. A.; COGLIAT, B.; ROCHA, N. S. A Review of tumor initiating cells in veterinary oncology and potencial implications in canine transmissible ve-nereal tumours. Research and Reviews: J. Vet. Sci., 2016; 2(2): 13-23.

GUO, Q.; JIAN, Z.; JIA, B.; CHANG, L. CXCL7 promotes proliferation and invasion of cholangiocarcinoma cells. Oncol. Report., 2017; 37:1114-1122.

HLATKY, L.; HAHNFELDT, P. Beyond the cancer cell: progression-level determinants highlight the multiscale nature of carcinogenesis risk. Cancer Res., 2014; 74(3):659-64.

HUANG, V.; ZHENG, J.; QI, Z.; WANG, J.; PLACE, R. F.; YU, J.; *et al.* Ago1 Interacts with RNA polymerase II and binds to the promoters of actively transcribed genes in human cancer cells. PLoS Genet., 2013; 9(9):1-16.

HYNDMAN, I. J. Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. Cancer Microenviron., 2016; 9(1):63-9.

ILLUMINA (a). Cancer Genomics Research. Detecting changes in the cancer

transcriptome. Disponível em: <<http://www.illumina.com/areas-of-interest/cancer/research/sequencing-methods/cancer-rna-seq.html>>. Acesso em: 04 ago. 2018.

ILLUMINA (b). Study gene expression. Using RNA sequencing – A high-resolution view of coding and noncoding regions of the transcriptome for a deeper understanding of biology. Disponível em: <<http://www.illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing.html>>. Acesso em 07 ago. 2018.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: INCA e Ministério da Saúde, 2011, 22-23 p. ISBN: 978.857.318.188-3.

JIA, J.; PARIKH, H.; XIAO, W.; HOSKINS, J. W.; PFLICKE, H.; LIU, X.; *et al.* An integrated transcriptome and epigenome analysis identifies a novel candidate gene for pancreatic cancer. *BMC Med. Genomics*, 2013; 6(33):1-13.

KINOUCHI, T.; UEMURA, M.; WANG, C.; ISHIZUYA, Y.; YAMAMOTO Y.; HAYASHI T.; *et al.* Expression level of CXCL7 in peripheral blood cells is a potential biomarker for the diagnosis of renal cell carcinoma. *Cancer Sci.*, 2017; 108(12):2495-2502.

KORKAYA, H.; DAVIS, A. WICHA, M. S. Cancer Stem Cells and the Microenvironment. *The Molecular Basis of Cancer*, 2015; 4: 157-164.

KRETZLER, M.; JU, W. A Transcriptional Map of the Renal Tubule: Linking Structure to Function. *J. Am. Soc. Nephrol*, 2015; 26(11):2603-2605.

LI, L.; ZHANG, L.; TIAN, Y.; ZHANG, T.; DUAN, G.; LIU, Y.; *et al.* Serum Chemokine CXCL7 as a Diagnostic Biomarker for Colorectal Cancer. *Frontiers Oncol.*, 2019; 9:1-11.

LIMA, C. R. O. Classificação morfológica, critérios de malignidade, expressão gênica de c-myc e imunoistoquímica de c-myc, p53, p21 e p27 no tumor venéreo transmissível canino. Goiânia, 2013. 5-7, 11-13, 16 e 17 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Goiás.

LIU, C. C.; WANG, Y. S.; LIN, C. Y.; CHUANG, T. F.; LIAO, K. W.; CHI, K. H.; *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 Immunol. Immunother.*, 2008; 57(4):479-491.

LIU Q.; ZHOU H.; LANGDON W. Y.; ZHANG J. E3 ubiquitin ligase Cbl-b in innate

and adaptive immunity. *Cell Cycle*, 2014; 13(12):1875-1884.

LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYEYASU, H. *Oncologia para a Graduação*. São Paulo, 2013. LEMAR, 3 ed. 54, 55, 112, 714 p.

LOPES, R. M. Avaliação de metodologias moleculares e citogenéticas para detectar níveis de deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) MERR.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.). Brasília, 2016. 39-43 p. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília.

MACRAE, T.; SARGEANT, T.; LEMIEUX, S.; HÉBERT, J.; DENEALT, E.; SAUVAGEAU, G. RNA-Seq reveals spliceosome and proteasome genes as most consistent transcripts in human cancer cells. *PLoS One*, 2013; 8(9):1-9.

MARFELL, B. J.; O'BRIEN, R.; GRIFFIN, J. F. Global gene expression profiling of monocyte-derived macrophages from red deer (*Cervus elaphus*) genotypically resistant or susceptible to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Dev. Comp. Immunol.*, 2013; 40(2):210-217.

MEYER M. S.; PENNEY K. L.; STARK J. R.; SCHUMACHER F. R.; SESSO H. D. Genetic variation in *RNASEL* associated with prostate cancer risk and progression. *Carcinogenesis*, 2010; 31(9): 1597-1603.

MURCHISON, E. P.; WEDGE, D. C.; ALEXANDROV, L. B.; BEIYUAN, F.; MARTINCORENA, I.; NING, Z.; *et al.* Transmissible dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. *Sci.*, 2014; 343(6169):437-440.

MURGIA, C.; PRITCHARD, J. K.; KIM, S. Y.; FASSATI, A.; WEISS, R. A. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*, 2006; 126(3):477-487.
NATURE. RNA sequencing. Disponível em: <<http://www.nature.com/subjects/rna-sequencing>>. Acesso em: 30 jul. 2018.

OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Genet.*, 2011; 12(2):87-98.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Quimiocinas e imunidade. *Einstein* (São Paulo), 2015; 13(3):469-473. ISSN: 2317-6385.

PANAGOPOULOS, I.; GORUNOVA, L.; ZELLER, B.; TIERENS, A.; HEIM, S. Cryptic FUS-ERG fusion identified by RNA-sequencing in childhood acute myeloid leukemia. *Oncol. Rep.*, 2013; 30(6):2587-2592.

PINCZOWSKI, P.; GIMENO, M.; ACEÑA, C.; VILLEGAS A.; MARTINO, A.; LUJÁN L. Brain Metastasis in a Case of Canine Transmissible Venereal Tumor

after a Supposed Successful Treatment with Vincristine Sulfate. *Acta Vet. Beograd.*, 2015; 65(1):137-142.

PUROHIT, G. Canine Transmissible Venereal Tumor: A Review. *The Internet J. Vet. Med.*, 2008; 6(1):1-7.

RAJAN, P.; SUDBERY, I. M.; VILLASEVIL, M. E.; MUI, E.; FLEMING, J.; DAVIS, M.; *et al.* Next-generation Sequencing of Advanced Prostate Cancer Treated with Androgen-deprivation Therapy. *Eur. Urol.*, 2013, 66(2014):32-39.

RAU, A.; MAUGIS-RABUSSEAU, C.; MARTIN-MAGNIETTE, M. L.; CELEUX, G. Co-expression analysis of high-throughput transcriptome sequencing data with Poisson mixture models. *Bioinformatics*, 2015; 31(9):1420-1427.

REBBECK, C. A.; THOMAS, R.; BREEN, M.; LEROI, A. M.; BURT, A. Origins and evolution of a transmissible cancer. *Evol.*, 2009; 63(9):2340-2349.

REN, S.; WEI, G. H.; LIU, D.; WANG, L.; HOU, Y.; ZHU, S.; *et al.* Whole-genome and Transcriptome Sequencing of Prostate Cancer Identify New Genetic Alterations Driving Disease Progression. *Eur. Urol.*, 2017; 73(3):322-339.

ROCHA, T. M. M., TERRE, M. F.; SOTELLO, A.; KOZEMJAKIN, D.; MALUCELLI, L.; MAIA, R. Tumor Venéreo Transmissível nasal em um cão. *Ver. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.*, 2008; 6(3):349-353.

ROCHA, N. S.; TREMORI, T. M.; CARNEIRO, J. A. M. Fine Needle Aspiration Cytology in the Diagnosis of Canine Cutaneous Transmissible Venereal Tumor—Case Report. *Open J. Vet. Med.*, 2014; 4:204-209.

ROY, N. C.; ALTERMANN, E.; PARK, Z. A.; MCNABB, W. C. A comparison of analog and Next-Generation transcriptomic tools for mammalian studies. *Brief. Funct. Genomics*, 2011; 10(3):135-150.

SALZBERG, M. O.; LAMETSCHWANDTNER, G.; SHUSTER, M.; LOIBRNER, H.; MONIKA, S.; HAYDEN, H.; *et al.* Development of a personalized cellular *ex vivo* CBL-b silencing cancer immune therapy. *J. Immuno Therapy Cancer*, 2014; 32:223.

SÁNCHEZ-SERVÍN, A.; MARTÍNEZ, S.; CÓRDOVA-ALARCON, E.; FAJARDO, R. TP53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor. *J. Vet. Sci.*, 2009; 10(4): 353-355.

SANTOS, F. G. A., VASCONCELOS, A. C.; NUNES, J. E. S.; CASSALI, G. D.; PAIXAO, T. A.; MORO, L. O Tumor Venéreo Transmissível canino – Aspectos gerais e abordagens moleculares (Revisão de Literatura). *Biosci. J.*, 2005;

21(3):41-53.

SANTONI, M.; BRACARDA, S.; NABISSI, M.; MASSARRI, F.; CONTI, A.; BRIA, E.; *et al.* CXC and CC Chemokines as Angiogenic Modulators in Nonhaematological Tumors. *BioMed Res. Int.*, 2014; 2014:1-12.

SATO, R.; NAKANO, T.; HOSONAGA, M.; SAMPETREAN, O.; HARIGAI, R.; SASAKI, T.; *et al.* RNA Sequencing Analysis Reveals Interactions between Breast Cancer or Melanoma Cells and the Tissue Microenvironment during Brain Metastasis. *BioMed Res. Int.*, 2017; 2017:1-10.

SESSIONS, O. M.; TAN, Y.; GOH, K. C.; LIU, Y.; TAN, P.; ROZEN, S.; OOI, E. E. Host cell transcriptome profile during wild-type and attenuated dengue virus infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2013; 7(3):1-12.

SHARRON, L. X.; HU, L.; SANDY, K.; CORRELL, M.; QUACKENBUSH, J.; WU, C. L.; *et al.* Differentiating progressive from nonprogressive T1 bladder cancer by gene expression profiling: applying RNA-sequencing analysis on archived specimens. *Urol. Oncol.*, 2014; 2(3):327-336.

SIDDLE, H. V.; KAUFMAN, J. Immunology of naturally transmissible tumours. *Immunology*. 144(1):11-20, 2015.

SILVA, M. C. V., BARBOSA, R. R.; SANTOS, R. C.; CHAGAS, R. S. N.; COSTA, W. P. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do Tumor Venéreo Transmissível (TVT) na população canina atendida no Hospital Veterinário da UFERSA, *Acta Vet. Brasília*, 2007; 1(1):28-32.

SIMÃO, F. A.; WATERHOUSE, R. M.; IOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E. V.; ZDOBNOV, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 2015; 31(19):3210-3212.

SOHAL, D. P.; SHROTRIYA, S.; ABAZEED, M.; CRUISE, M.; KHORANA, A. Molecular characteristics of biliary tract cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2016; 107:111-118.

SOUSA, J, SAITO, V.; NARDI, A. B.; RODASKI, S.; GUÉRIOS, S. D.; BACILA, M. Características e incidência do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães e eficiência da quimioterapia e outros tratamentos. *Arch. Vet. Sci.*, 2000; 5:41-48.

SOUZA, V. B.; SCHENKA, A. A. Cancer Stem and Progenitor-Like Cells as Pharmacological Targets in Breast Cancer Treatment. *Breast Cancer (Auckl.)*, 2015; 12:45-55.

STARK, R.; GRZELAK M.; HADFIELD, J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat. Rev. Genetic.*, 2019; 20:631-656.

STOCKMANN, D.; FERRARI, H. F.; ANDRADE, A. L.; LOPES, R. A.; CARDOSO, T. C.; LUVIZOTTO, M. C. R. Canine transmissible venereal tumours: aspects related to programmed cell death. *Braz. J. Vet. Pathol.*, 2011; 4(1):67-75.

STRAKOVA, A.; MURCHISON, E. P. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. *BMC Vet. Res.*, 2014; 10(168):1-10.

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

STRICKLER, S. R.; BOMBARELY, A.; MUELLER, L. A. Designing a Transcriptome Next-Generation Sequencing Project for a Nonmodel Plant Species. *Am. J. Bot.*, 2012; 99(2):257-266.

STUMPF, A. R. L. Perfil de Citocinas Pró-E Anti-inflamatória e da proteína C-reativa no tratamento do Tumor Venéreo Transmissível Canino. Santa Maria, 2014. 25 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria.

The Human Protein Atlas (1). Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org>>. Acesso em: 6 jun 2020.

The Human Protein Atlas (2). CXCL7. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000163736-PPBP>>. Acesso em: 8 jun 2020.

Thermo Scientific. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V 3.8 User's Manual. (2010). Disponível em: <<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>>. Acesso em 24 set. 2018.

TOMASETTI, C.; LI, L.; VOGELSTEIN, B. Stem cell divisions, somatic mutations, câncer tiology and câncer prevention. *Sci.*, 2017; 355(6331):1330-1334.

UHLEN, M.; ZHANG, C.; LEE, S.; SJOSTEDT, E.; FAGERBERG, L.; BIDKHORI, G.; *et al.* A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Sci.*, 2017; 357(6352):1-11.

VIANA, J. P. G.; GOMES, S. O.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; LIMA, P. S. C.; VALENTE, S. E. S. Comparação de seis métodos de extração de DNA genômico em babaçu. In: Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012,

Belém do Pará. Anais do II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos. Belém do Pará, 2012. Disponível em:< <http://www.recursosgeneticos.org/publicacao/ii-congresso-brasileiro-de-recursos-geneticos>>. Acesso em: 24 set. 2018.

VINEIS, P.; WILD, C. P. Global cancer patterns: causes and prevention. *Lancet*, 2014; 383(9916):549-557.

XIAOMEI, M. A.; HERBERT, Y. Global Burden of Cancer. *Yale J. Biol. Med.*, 2006; 79(3-4):85-94.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, 2009; 10:57-63.

WEI, W.; LEWIS, M. T. Identifying and targeting tumor-initiating cells in the treatment of breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 2015; 22(3): 135-155.

WOLF, J. B. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Mol. Ecol. Resour.*, 2013; 13(4):559-572.

WU, S.; POWERS, S.; ZHU, W.; HANNUN, Y. A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*, 2015; 529: 43-47.

YOUSSEF, N.; BUDD, A.; BIELAWSKI, J. P. Introduction to Genome Biology and Diversity. *Methods. Mol. Biol.*, 2019; 1910:3-31.

ZHANG, X. M.; MA, Z. W.; WANG, Q.; WANG, J. N.; YANG, J. W.; LI, X. D.; *et al.* A new RNA-seq method to detect the transcription and non-coding RNA in prostate cancer. *Pathol. Oncol. Res.*, 2014; 20(1):43-50.

ZHONG, C. Q.; ZHANG, X. P.; MA, N.; ZHANG, E. B.; LI, J. J.; JIANG, Y. B.; *et al.* FABP4 suppresses proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells and predicts a poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Cancer Med.*, 2018; 7(6):2629-2640.

Capítulo 2

8. Artigo Científico

Artigo científico a ser finalizado e formatado de acordo com as normas da Oncology Reports (fator de impacto: 3.417).

Envolvimento de CXCL8, CXCL13 e CXCL14 na progressão do Tumor Venéreo Transmissível Canino

SANCTIS, P.^{1*}; FLÓREZ, L.M.M.²; CRUZ, T.F.³; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.³; ZAPATERINI, J.R.³; ROSSI, A.L.D.⁴; ROCHA, N.S.⁵.

¹*School of Medicine, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil*

²*School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry-Pathology (Pathology Research Group), National University of Colombia, Bogota, Colombia*

³*Molecular Diagnostic Veterinary Laboratory, Institute of Biotechnology, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil*

⁴*Laboratory of Chemical and Experimental Carcinogenesis, Department of Morphology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu São Paulo, Brazil*

⁵*São Paulo State University (UNESP), Campus of Itapeva, Itapeva, São Paulo, Brazil*

⁶*Investigative and Comparative Pathology Laboratory, School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil*

***Correspondence to:**

Paula de Sanctis

E-mail: paulasantctis@gmail.com

+55 (14) 3880-2076

Address: Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n. Unesp, Botucatu Campus.

Postal Code: 18618-681. Botucatu, São Paulo – SP, Brazil.

Resumo

O Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC) é uma neoplasia maligna de comportamento biológico versátil pouco explorada em relação a diferenças genéticas e marcadores prognósticos. Nesse sentido, analisou-se a relação das quimiocinas CXCL8, CXCL13 e CXCL14 na progressão do TVTC. Para tal, realizou-se o sequenciamento em larga escala (RNAseq) de amostras tumorais de doze cães que não receberam nenhum tratamento prévio antes da biópsia. Com a biblioteca RNA-seq, os dados foram analisados por métodos de bioinformática por meio dos softwares R, STAR e Bioconductor, sendo a análise da expressão diferencial realizada pelo pacote DEseq2, $p < 0.05$ e $\log_2 \text{fold change} > 2$. Acredita-se haver uma possível relação entre as quimiocinas estudadas e a progressão pelo fato de CXCL13 promover invasão, proliferação, assim como CXCL14, além de metástase, funções também exercidas por CXCL8 além da angiogênese.

Palavras-chave: Cão; Tumor Venéreo Transmissível Canino; CXCL8; CXCL13; CXCL14.

Introdução

O Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTC) é uma neoplasia maligna de localização predominantemente venérea, que acomete, principalmente, animais errantes e entre dois a cinco anos de idade. Apresenta comportamento biológico versátil e sua transmissão ocorre de forma venérea ou via arranhadura, contato direto ou lambedura com a implantação de células tumorais em mucosas que perderam a integridade. (Silva 2007, Flórez, 2014; Birhan, 2015; Lima, 2013; Murchison, 2014, Fonseca, 2017)

Apesar de ser alvo de numerosas investigações, dados sobre diferenças genéticas são escassos, sendo que tais estudos permitem identificar alterações no genoma, marcadores prognósticos e, conseqüentemente, melhorar o diagnóstico e a resposta terapêutica.

Nesse sentido, a família de quimiocinas CXC (Cys-X-Cys) vem sendo explorada neste tumor. Chiang *et al.* (2012) verificaram que a superexpressão de CXCL7 (*chemokine ligand 7*) está associada à progressão tumoral no TVTC, logo há possibilidade de que outros membros da família CXC possam desempenhar papel semelhante.

O objetivo deste estudo foi analisar o possível envolvimento de CXCL8, CXCL 13 e CXCL 14 na progressão do TVTC.

Metodologia

Foram incluídos doze cães (*Canis lupus familiaris*) diagnosticados com TVTC pela punção aspirativa por agulha fina, sem nenhum tratamento prévio, predileção por raça ou sexo e com idade igual ou superior a dois anos provenientes do Hospital Veterinário Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ/UNESP), com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da FMVZ.

Confirmado o diagnóstico, realizou-se a biópsia de parte do tumor, a amostra foi conservada em 1 mL da solução RNAlater® (Ambion® Life Technologies, AM7024), com posterior extração de RNA total com solução TRIzol® reagente (Invitrogen™, 15596026) segundo as instruções do fabricante.

Após obtenção do material extraído, avaliou-se a integridade do RNA (RIN - *RNA Integrity Number*) por meio do Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) com o Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, CA, USA), a concentração do RNA por meio do espectrofotômetro (NanoDrop™, ND-8000, Thermo Scientific, MA, USA) e do software ND-1000, versão v.3.31.

Feito isso, obteve-se o DNA complementar (DNAC) por meio do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Illumina®), conforme as recomendações do fabricante, sendo posteriormente analisado pelo Bioanalyzer 2100 com o Agilent DNA 1000 kit. Em seguida, as amostras foram submetidas ao protocolo de preparo das bibliotecas, e para tal, utilizou-se o SureSelect Strand-Specific RNA Library Preparation kit (Illumina® - Multiplex Sequencing) de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, as bibliotecas de DNAC foram purificadas por meio do kit AMPure XP beads (Beckman Coulter, Fullerton, EUA), adicionados os primers indexadores e a quantificação foi realizada por meio do KAPA Library Quantification kit (Illumina®) de acordo com as instruções do fabricante. Nessa etapa, o RT-qPCR foi realizado por meio do 7500 Fast Real-Time PCR System e as curvas obtidas pelo software 7500 Software, versão 2.06 (Life Technologies™).

Posteriormente, o *pool* das amostras foi submetido ao sequenciador NextSeq® 500 System (Illumina®) e, para tal, utilizou-se o kit NextSeq 500/550 High Output Kit V2 (Illumina®) e a flow cell de 150 ciclos.

Após a obtenção dos dados, as sequências (*reads*) geradas no formato *fastq* foram alinhadas, sendo que o sequenciamento foi do tipo

single-read. Para o alinhamento, utilizou-se a ferramenta computacional STAR. Desta forma, as sequências de cada um dos transcritos de interesse foram montadas por meio do software Bioconductor com base no genoma do cão disponível no banco de dados Ensembl (Dog CanFam3.1).

O número de *reads* foi normalizado pelo número total de *reads* de cada amostra e pelo tamanho dos transcritos. Esse valor, denominado de RPKM (*reads or fragments per kilobase exon per million reads*), foi utilizado para comparar a expressão entre as amostras estudadas.

As expressões diferenciais dos genes foram analisadas por meio do software R com o pacote DEseq2 e os genes foram considerados diferencialmente expressos para $p < 0.05$ e $\log_2 FC$ (*fold change*) > 2 . Além disso, genes com *false discovery rate* (FDR) $< 0,01$ foram considerados diferencialmente expressos e divididos em sub e sobreexpressos com base no $\log_2 FC$.

Feito isso, analisou-se a expressão gênica diferencial com $\log_2 FC = 2$ e p -ajustado (BH - Benjamim-Hochberg) $= 0,01$, de modo a restringir o número de genes diferencialmente expressos. Estas análises foram realizadas em parceria com o Grupo de Simulação e Modelagem Computacional da UNESP, Campus de Itapeva.

Após a obtenção dos genes diferencialmente expressos no TVTC, estes foram analisados quando a sua função biológica por meio das bases de dados Human Protein Atlas, My Cancer Genome® - Genetically Informed Cancer Medicine e Gene Ontology Consortium, sendo avaliada a relação de genes pertencentes a família CXC com a progressão do TVTC.

Resultados e discussão

Pela expressão global dos genes, verificou-se alteração de três genes pertencentes a família das quimiocinas CXC: CXCL8 (*chemokine ligand 8*), CXCL13 (*chemokine ligand 13*) e CXCL14 (*chemokine ligand 14*),

estando os dois primeiros *upregulated* e o último *downregulated* no TVTC.

Quanto a relação destas quimiocinas com o TVTC, tem-se que a síntese autócrina de CXCL8 pelas células cancerígenas traz implicações quanto ao desenvolvimento e progressão tumoral por induzir a secreção de fatores de crescimento por macrófagos associados ao tumor e infiltração quimiotática de neutrófilos (SANTONI et al., 2014), de modo que tal quimiocina pode influenciar na progressão do TVTC.

CXCL8, de acordo com Santoni *et al.*, 2014, também promove angiogênese, invasão de tecidos adjacentes e, conseqüentemente, migração das células tumorais, logo também pode contribuir na progressão tumoral.

9. Conclusão e perspectivas futuras

Na análise do transcriptoma do Tumor Venéreo Transmissível Canino foram identificados genes envolvidos na progressão tumoral e regulação da resposta imune e do ciclo celular, sendo a maioria marcadores prognósticos de outros tumores, fato a ser explorado neste tumor, assim como a evasão do sistema imune e a forma de transmissão do tumor, que não foram esclarecidas.

A fim de esclarecer as vias biológicas envolvidas em tais processos, são necessários estudos futuros com a caracterização do enriquecimento das categorias ontológicas. Para tal, pretende-se realizar uma análise do interactoma deste tumor, a fim de esclarecer as questões apontadas acima e incentivar a busca de novos protocolos diagnósticos e terapêuticos, assim como aprimorar os já existentes.

Anexas

ANEXO A – Atestado da Comissão de Ética no Uso de Animais.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"



fmvz - unesp

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

A T E S T A D O

Atesto que o subprojeto intitulado "Tumor venéreo transmissível: alvos moleculares associados à progressão e evasão da resposta imune", faz parte do Projeto de Pesquisa "Interação entre hospedeiro e Tumor Venéreo Transmissível Canino: diversidade de células mononucleares e do complexo principal de histocompatibilidade" **Protocolo CEUA 126/2015**, aprovado em 02/10/2015, a ser conduzido por **Paula de Sanctis**, para fins de pesquisa científica, e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Vigência do projeto	12/10/2015 a 31/08/2016
Finalidade	Pesquisa Científica
Espécie/Linhagem	Canina/ <i>Canis familiaris</i>
Raça	Indefinida
Nº de animais	12
Peso/Idade	02 a 20kg/02 a 12 anos
Sexo	07 Machos e 05 fêmeas
Origem	Proprietários particulares

Botucatu, 06 de julho de 2017

Profª. Ass. Drª. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO B – Atestado da Comissão de Ética no Uso de Animais (alteração de título).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

A T E S T A D O

Atesto que o subprojeto intitulado "Tumor venéreo transmissível: alvos moleculares associados à progressão e evasão da resposta imune" teve seu título alterado para **"TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO (TVTC): ESTUDO DO PERFIL TRANSCRICIONAL"**, o qual faz parte do projeto "Interação entre hospedeiro e tumor venéreo transmissível canino: diversidade de células mononucleares e do complexo principal de histocompatibilidade", Protocolo CEUA 0126/2015, aprovado em 02 de outubro de 2015, a ser conduzido por **Paula de Sanctis**, orientada pela Profa Dra. Noeme Souza Rocha, para fins de pesquisa científica, e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Botucatu, 04 de agosto de 2020.



Prof. Ass. Dr. José Nicolau Próspero Puoli Filho
Presidente da CEUA/FMVZ

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
STA – Seção Técnica Acadêmica
Rua Professor Doutor Walter Mauricio Correa s/n
Bairro: Unesp Campus de Botucatu – 18618-681 – Botucatu/SP
Tel +55 14 3880-2175 sta.fmvz@unesp.br – www.fmvz.unesp.br