



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

Carlos Mario González-Zambrano

Análises da expressão de *P53*, *CXCL8* e das mutações de *TP53* no tumor venéreo transmissível canino, relacionado ao comportamento biológico.

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

Botucatu

2024

Carlos Mario Gonzalez-Zambrano

Análises da expressão de *P53*, *CXCL8* e das mutações
de *TP53* no tumor venéreo transmissível canino
relacionado ao comportamento biológico.

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
Câmpus de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre em Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

Botucatu

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

González-Zambrano, Carlos Mario.

Análises da expressão de P53, CXCL8 e das mutações de TP53 no tumor venéreo transmissível canino, relacionado ao comportamento biológico / Carlos Mario González-Zambrano.
- Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Capes: 50503006

1. Tumores Venéreos Veterinários. 2. Mutação. 3. Genes p53. 4. Genes p53. 5. Interleucina-8.

Palavras-chave: CXCL8; Mutações; P53; TP53; TVT.

Impacto científico esperado: Entendimento de como uma célula tumoral milenar conseguiu evitar a extinção, transmitindo-se entre indivíduos da mesma espécie com o comportamento semelhante ao parasitário, inclusive superando os mecanismos de imunovigilância, além da evasão dos mecanismos mediados pelo guardião do genoma, gene *TP53*.

Impacto social: Em 2020, a OMS registrou 10 milhões de mortes global pelo câncer. A compreensão da evolução e dos mecanismos de transmissão do Tumor Venéreo Transmissível Canino contribuirá para o desenvolvimento de terapias direcionadas a evitar o estabelecimento de tumores primários e suas metástases.

Impacto econômico: A revista Forbes estimou globalmente que 25,2 bilhões de dólares são investidos em tratamentos, sem considerar as perdas humanas. Esforços para controlar esse tipo de doença reduzirão essas perdas. Os resultados desta pesquisa sugerem alto potencial, do ponto de vista da bioengenharia, para o desenvolvimento de modelos de estudo e terapias direcionadas a partir de cultivo de TVT.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO:	15
Apresentação	17
CAPÍTULO 1.....	18
1. Introdução	18
2. Revisão de literatura.....	19
3. Objetivo.....	30
4. Material e Métodos	31
5. Resultado	37
6. Discussão.....	43
8. Conclusão	46
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA*	48
7. Artigo científico.....	57
Anexos	61

Análises da expressão de *P53*, *CXCL8* e das de *TP53* no tumor venéreo transmissível canino relacionado ao comportamento biológico.

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

Orientadora: Profa. Assoc. Noeme Sousa Rocha

Coautor: Prof. Dr. Luis Mauricio Montoya Flórez

Parcerias: Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular (IBTEC–UNESP), Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental (LCQE–IBB–UNESP), e Grupo de Pesquisa em Patologia da Universidade de Caldas, Colômbia.

Comissão examinadora: Noeme Sousa Rocha, Luís Fernando Barbisan, Juan Carlos González Corrales, Guilherme Ribeiro Romualdo, Francisco Javier Pedraza Ordoñez

Botucatu, 09 fevereiro de 2024

Dedicatória

Dedico

A Deus; aos meus pais, Mário e Olga, por me ensinarem que só o amor pelo que fazemos transforma a escravidão em liberdade. À minha alma gêmea Juliana, por me apoiar nos bons e maus momentos, por acreditar em mim e me ensinar a sonhar. À minha avó, tios e tias que sempre me apoiaram.

Agradecimentos

Agradeço

A minha orientadora Noeme Sousa Rocha e os professores Francisco Pedraza, Mauricio Montoya. Pela paciência, confiança e aconselhamento nos objetivos traçados.

À Universidade Estadual Paulista UNESP. Principalmente a equipe de Patologia da FMB e FMVZ. Desde os funcionários da limpeza, segurança, administrativos, pós-graduados, estudantes e professores maravilhosos.

Aos professores Luís Fernando Barbisan e Guilherme Ribeiro Romualdo e seus alunos de pós-graduação do Laboratório de Carcinogênese e Química Experimental (LCQE).

À Professor João Pessoa, Eliana Hurtado e demais servidores do Instituto de Biotecnologia (IBTEC).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Fundos de pesquisa obtidos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: Processo: 303117/2019-2).

Epígrafe

“A medicina cura o homem, a medicina veterinária
cura a humanidade” Pasteur

Dar sagacidade aos simples e aos jovens
inteligência e conselhos. Provérbios 1:4

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do MAT no TVT

Figura 2. Representação das funções do IL8

Figura 3, 4, 5. Especificidade dos Primers utilizados

Figura 6. Exemplar de Sequências Adquiridas. Não há evidência de mutações missense (A). Mutações sinônimas foram detectadas nos códons 2434, 2439 (B) e 2483 (C), durante a análise minuciosa de sequências utilizando o software Geneious Prime.

Figura 7, 8. Imunofenotipagem para *P53*; observa-se a especificidade da marcação imuno-histoquímica no citoplasma. Microscópio Opticam Vision 2023, Software Mosaic 2.4™.

Figura 9, 10. Imunofenotipagem para CXCL8 revela alta expressão com marcação citoplasmática. observa se que células imunes e estromais assim como células tumorais em mitose, não apresentam marcação. Microscópio Opticam Vision 2023, Software Mosaic 2.4™.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos Primários Utilizados na Pesquisa.

Tabela 2. Sequências Utilizadas como Referência.

Tabela 3. Primers Utilizados.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS: Organização Mundial da Saúde

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

TVT: Tumor venéreo transmissível

MHC: Complexo maior de histocompatibilidade

TGFB-1: Fator de crescimento transformador beta-1

TP53: Proteína 53 associada a tumores

BCLX: Gene da família BCL-2

BCL2: O gene BCL2 codifica a proteína Bcl-2

P21: Proteína 21

IL6: Interleucina 6

NK: Células *Natural Killer*

TILs: Linfócitos infiltrantes do tumor

Ig: Imunoglobulinas

ABCC: Proteínas transportadoras de membrana

P63: Proteína 63

MMP2: Metaloproteinase 2

MMP9: Metaloproteinase 9

MDR1: Gene multidroga resistente

BAX: Proteína associada a Bcl-2 X

MHC: Complexo maior de histocompatibilidade

LAK: Células *Natural Killer* ativadas por linfocinas

SI: Sistema imunológico

MEC: Matriz extracelular

MAT: Microambiente tumoral

MATs: Macrófagos associados ao tumor

HHV8: Herpesvírus humano tipo 8

PTLD: Doença linfoproliferativa pós-transplante

TOS: Transplante de órgãos sólidos

SDT: Síndrome de deficiência de testosterona

EBV: Vírus Epstein-Barr

DBD: Domínios de ligação ao DNA

CDNK1A: Proteína inibidora do ciclo celular p21

mRNA: RNA mensageiro

TECs: Células endoteliais tumorais

CAFs: Fibroblastos associados ao câncer

IARC: Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

RTK: Receptor de tirosina quinase

AKT: Proteínas quinases ativadas por fosfatidilinositol

MDM2: Homólogo de Duplo Minuto 2 em Rato

5-FU: 5-fluorouracilo

CXCL8: Quimosina 8

IL8: Interleucina 8

DARC: Receptor de antígeno Duffy para citocinas

GAGs: Glicosaminoglicanos

CRC: Câncer colorretal

PGs: Proteoglicanos

NETs: Armadilhas extracelulares de neutrófilos

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

NLR: Relação Neutrófilo Linfócito

RC: Resposta completa

RP: Resposta Parcial

R: Resistência

NCIB: Centro Nacional de Informações em Biotecnologia

Bp: Pares de bases

LPIC: Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada

FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

FMB: Faculdade de Medicina

IBTEC: Instituto de Biotecnologia

TE: Tris EDTA

SRD: Sem raça definida

Análises da expressão de *P53*, *CXCL8* e das mutações de *TP53* no tumor venéreo transmissível relacionado ao comportamento biológico e microambiente tumoral.

RESUMO:

Introdução: O tumor venéreo transmissível (TVT) é a neoplasia cuja principal característica reside no fato de que a célula neoplásica não é própria do hospedeiro. Baseia-se na transferência interindividual de clones de células neoplásicas originadas há milhares de anos em um indivíduo canino fundador. Utiliza os mesmos mecanismos envolvidos na metástase, para sua transmissão. Seu comportamento, semelhante às neoplasias malignas, e a capacidade de evasão do sistema imunológico são alvos de pesquisas contínuas. Nesta pesquisa, avaliamos as mutações do gene *TP53* relacionadas à expressão de *P53*. A expressão de *CXCL8* é considerada fundamental na capacidade de modulação da imunovigilância, bem como a interação da célula tumoral com células endoteliais na angiogênese. **Método:** Mutações de *TP53* via Sequenciamento Sanger. Imunofenotipagem para *P53* e *CXCL8* pela Imunohistoquímica para 18 casos da região andina da Colômbia e 17 casos do interior de São Paulo, Brasil. **Resultado:** A sequência do *TP53* exclui mutações não sinônimas. Mesmo assim, o TVT apresentou polimorfismo em nucleotídeos que são aceitos como mutações sinônimas que apresentaram códons de posição diferente nas duas regiões geográficas. A Imunofenotipagem para *P53* apresentou baixa expressão nas células tumorais em ambos grupos, sugerindo baixa taxa apoptótica. A pesquisa determinou alta expressão de *CXCL8*, que gera maior entendimento sobre o perfil de citocinas que esse tumor utiliza para modular sua sobrevivência. **Discussão:** A descoberta de mutações sinônimas no gene *TP53* pode estar relacionada à transcrição e subsequente quantificação de *P53*. No entanto, o modelo estatístico desta pesquisa não encontrou evidências que vinculem a baixa expressão de *P53* à presença ou ausência de mutações. Além disso, o códon de localização das três mutações encontradas, foi diferente de acordo com a região geográfica, e os casos que apresentaram mutação tiveram expressão de *P53* no citoplasma. A alta expressão de *CXCL8* e outras citocinas avaliadas em estudos paralelos sugere que essa célula aproveita a capacidade pleiotrópica e antagônica própria dessas moléculas para garantir sua sobrevivência. **Conclusão:** Mutações sinônimas de *TP53* em TVT apresentam diferenças regionais, indicando a existência de fatores epigenéticos e ambientais que geraram seleções de subclones em diferentes ambientes geográficos. A elevada expressão de *CXCL8*, como parte do perfil de citocinas de TVT e sua correlação com o comportamento biológico, suscita interesse especial para a utilização de TVT como modelo de estudo em carcinogênese e desenvolvimento de tratamentos para doenças autoimunes.

Palavras-chave: TVT, Mutações, *TP53*, *P53*, *CXCL8*.

Analysis of P53, CXCL8 Expression, and TP53 Mutations in Transmissible Venereal Tumor in Relation to Biological Behavior and Tumor Microenvironment.

Abstract:

Introduction: Transmissible venereal tumor (TVT) is a neoplasia characterized by the neoplastic cell not being host-specific. It relies on the interindividual transfer of clones of neoplastic cells originating thousands of years ago in a canine founder individual. It utilizes mechanisms involved in metastasis for its transmission. Its behavior, similar to malignant neoplasms, and its ability to evade the immune system are subjects of ongoing research. In this study, we evaluated TP53 gene mutations related to P53 expression. CXCL8 expression is considered crucial for immunovigilance modulation and the interaction of tumor cells with endothelial cells in angiogenesis. **Methods:** TP53 mutation analysis via Sanger Sequencing. P53 and CXCL8 immunophenotyping via Immunohistochemistry for 18 cases from the Andean region of Colombia and 17 cases from São Paulo, Brazil. **Results:** The TP53 sequence excluded nonsynonymous mutations. Nevertheless, TVT exhibited nucleotide polymorphism accepted as synonymous mutations that presented different codons in the two geographic regions. P53 immunophenotyping showed low expression in tumor cells in both groups, suggesting a low apoptotic rate. The study identified high CXCL8 expression, providing a deeper understanding of the cytokine profile that this tumor employs to modulate its survival. **Discussion:** The discovery of synonymous mutations in the TP53 gene may be related to the transcription and subsequent quantification of P53. However, the statistical model in this study found no evidence linking low P53 expression to the presence or absence of mutations. Additionally, the codon location of the three mutations found was different according to the geographic region, and cases with mutations had P53 expression in the cytoplasm. The high expression of CXCL8 and other cytokines evaluated in parallel studies suggests that this cell leverages the pleiotropic and antagonistic capacity of these molecules to ensure its survival. **Conclusions:** Synonymous mutations in TP53 in TVT exhibit regional differences, indicating the existence of epigenetic and environmental factors that have led to the selection of subclones in different geographic environments. Moreover, mutations are associated with P53 expression in the cytoplasm, possibly due to issues in phosphorylation and protein transport. The elevated expression of CXCL8, as part of TVT's cytokine profile and its correlation with biological behavior, sparks special interest in using TVT as a study model in carcinogenesis and the development of treatments for autoimmune diseases.

Keywords: TVT, Mutations, TP53, P53, CXCL8.

Apresentação

A dissertação foi subdividida em dois capítulos: o primeiro traz a introdução, revisão bibliográfica, objetivos, metodologia, resultados e a discussão. O segundo consiste no manuscrito para submissão no periódico científico *Frontiers in Oncology*, ao final traz as interpretações no item *Conclusão*.

CAPÍTULO 1

1. Introdução

Na Medicina Veterinária e Humana, o diagnóstico, tratamento e controle da progressão do câncer representam expresso desafio técnico devido à complexidade dos mecanismos envolvidos. Análises detalhadas do perfil gênico, transcriptômico e molecular permitem maior abrangência das interações entre o tumor, hospedeiro e o microambiente (Chung, et al 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima mais de 20 milhões de novos casos de câncer para 2025, os quais 80% impactarão os países em desenvolvimento. Em 2018, foram diagnosticados 18 milhões de novos casos. Em razão disso, 10 milhões de mortes projetadas (Bray, F. et al 2018).

Em animais, não se tem conhecimento de dados globais. Estima-se um de cada quatro cães que desenvolvem câncer vem a óbito. Assim, é preciso investigações aprofundadas que permitam compressão dos processos de carcinogênese (Adams, et al 2010; Stromberg, 2017).

No câncer as abordagens de diagnóstico e terapêutica estão em constante evolução; é imprescindível aprofundar a compreensão das etapas da carcinogênese e identificar genes com funções condutoras que atuam na progressão, proliferação e metástase (Youn, A.; Simon, R 2011); da mesma forma, novos genes, bem como a função das sequências de DNA/RNA tornam-se necessários (Passos, G. A.; Bertrand, J. C 2010).

Na pesquisa de eventos relacionados à carcinogênese comparada, o cão é fundamental, por exibir similaridades biológicas, epidemiológicas, clínicas e bioquímicas com os humanos e compartilha ambiente e costumes com seus proprietários. Estudos da carcinogênese nesta espécie, sem dúvidas podem trazer valiosas informações para ambas espécies neste mesmo sentido (Kumaraguruparan, 2006; Casteleyn, 2012; Tae-min, Kim, 2020)

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) é considerado um dos mais antigos, representando o sucesso na evolução do câncer, bem como uma transição biológica incomum de um organismo multicelular para uma forma parasitária coespecífica assexuada. Além disso, ele oferece oportunidades para estudos da carcinogênese. (Ujvari, B., et al. 2016; Baez-ortega. et al 2019; Baez-ortega. et al 2019; Ramirez, RR. et al. 2010).

A assinatura biológica desse tumor contém biomarcadores que permitem avaliar susceptibilidade, resistência e possível prognóstico. Em alguns casos estabelecer o perfil de pacientes que podem responder melhor ao tratamento ou mesmo indicar o comportamento biológico do tumor (Sizova, D, 2007; Penet, 2014).

Pesquisas no TVT poderá trazer compreensão da evolução e do comportamento, inclusive dos aspectos relacionados as neoplasias metastáticas que se desenvolvem nos animais e nos humanos (Pearse, 2012, Belov, K. 2012; Hayes, et al 1983, Rechavi, et al. 1991).

2. Revisão de literatura

2.1 Tumor Venéreo Transmissível e comportamento.

Trata-se de lesões que acometem a espécie canina doméstica, predomínio entre dois a cinco anos de idade sexualmente ativos (Flórez, 2014; Brandão, 2002; Lima, 2013; Ganguly B. et al 2016). Apresenta distribuição mundial, comum em países de clima tropical (Floréz, 2016, Ballesteros, et al 2018; Alzate, et al 2019).

Acredita-se que a redução da defesa imunológica desempenha papel fundamental no processo de transmissão, pode levar à instabilidade genética nas células tumorais e permitir reprogramação das células tumorais. (Ke, CH., Tomiyasu, H., Lin, YL. et al 2022; Castro, 2015).

A implantação ocorre por diferentes vias. Entre elas a lambedura e a mais importante por ser hábito que gera contato entre a pele e/ou mucosa lesionadas. Assim, as células tumorais intactas perdem a capacidade de expressar proteínas de superfície do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classes I e II, isso induz por concentrações do fator transformador de crescimento B1 (TGFB-1) (Mascarenhas, M.B.

2014; Manning, et al 2008; Siddle, H.; Kaufman, J.I.M. 2015; Flórez, 2014; Siddle, H, 2015; Castro, 2015).

Embora, os mecanismos não estejam elucidados, acredita-se que a perda da expressão de MHC seja regulada epigeneticamente ou por mutações estruturais no DNA, pois há ampla diversidade genética em regiões do seu genoma (Manning et al., 2008; Siddle, H.; Kaufman, J.I.M. 2015; Murgia, et al. 2006; Rebbeck, et al. 2009; Murchison, E.P, et al 2014, Decker, et al 2015; Strakova, a. et al. 2016).

Aberrações cromossômicas específicas, como a presença da LINE-1 próximo do oncogene *c-myc*, mutações no gene *TP53*, super expressão de diferentes genes: *P53* e *BCL-2*, *BCLX* e *P21* (Katzir, et al 1985; Choi, Y.K.; Kim, C.J. 2002; Liao, et al. 2003; Floréz, et al. 2016; Alzate, et al 2019; Ballesteros, et al 2020; Decker, et al, 2015).

Murchison et al. (2014) identificaram variantes somáticas semelhantes entre tumores da Austrália e Brasil, maior do que qualquer outra já descrita em neoplasias. Acredita-se que as variantes tenham surgido durante a transformação maligna inicial ou a passagem do tumor antes da separação geográfica (Vázquez-mota, et al 2015; Ganguly b. et al 2016).

Acredita-se que durante a progressão há inibição da secreção de IL-6, que impede o reconhecimento, via células *Natural Killer (NK)*. As células do TVT produzem fator de crescimento tumoral $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) a qual inibe a atividade das *NKs* (Stockmann, et al 2013; Hisao, et al 2008).

O TGF $\beta 1$ exibe efeitos regulatórios do sistema imune (SI), inibição da geração de células dendríticas a partir de monócitos, inibição da células *NKs*, inclusive as *Killers* ativadas por linfocinas (LAK), redução, tanto da maturação como da proliferação de tímócitos e células B. Além da diminuição da transcrição de *Bcl-2* (Liao, K. et al 2003).

A característica de produção de TGF- $\beta 1$, pode ser utilizada na destruição específica de células B, tal como no tratamento de doenças autoimunes e determinadas neoplasias, tornando o TVT um possível produtor de citocinas para estas doenças. (Liao, K.W, et al 2003).

Do ponto de vista experimental, quando os mecanismos de progressão são reconhecidos, inicia-se a fase de regressão tumoral, na qual há secreção de IL-6 junto

ao interferon- γ o que permite a infiltração de linfócitos (TILs), ativando a expressão de MHC I e II (Liao, et al 2003; Chou, et al. 2009; Stockmann, et al 2011).

Enquanto, na fase de regressão ocorre colapso do tecido neoplásico e observa-se as células apoptóticas. Pérez et al. (1998) relataram que os linfócitos T, macrófagos e plasmócitos, produtores de anticorpos IgG, IgG2 e IgG4, têm participação na resposta imune, o que indica que a modulação do crescimento tumoral está condicionada a ela (Pérez, J.; Day, M.J.; Mozos, E. 1998; Chiang, et al 2013; Siddle, H.; Kaufman, Jim. 2013; Mukaratirwa, et al 2009).

Portanto, o TVT pode servir de partida sobre investigações de vias relacionadas a evolução biológica e compreensão de mecanismos da progressão, modulação imunológica e metástase (Ujvari, et al 2016; Akkoc et al 2017).

Flórez et al. (2017) abordaram a cinética do ciclo celular, taxas de apoptose e expressões dos genes *MDR-1*, *TP53*, *BCL-2* e *BAX* e sua associação com a resposta terapêutica ao sulfato de vincristina. A pesar disso, ainda é necessário identificar vias de sinalização e metabolização alteradas, além de identificar possíveis genes que possam explicar a estratégia evolutiva que utiliza o tumor para se estabelecer, manter e progredir (Flórez, et al 2017).

2.2 Câncer e Imunovigilância.

Compreende mais de 200 entidades diferentes, produto do processo dinâmico e complexo que se desenvolve em várias etapas: iniciação, promoção, progressão e manifestações clínicas. A etiologia é complexa e depende das interações do indivíduo com o ambiente e os fenômenos genéticos ou epigenéticos que conferem vantagem proliferativa e levam à sua expansão clonal (Xiaomei, 2006; Bode, 2009; Hlatky, 2014; Vineis, 2014; Chaffer, 2015; Tomasetti, 2015)

Primeira etapa, a de iniciação, ocorre a presença de agentes mutagênicos iniciadores, que alteram a estrutura do material genético, de forma que a célula iniciada se torna sujeita a novas alterações (Inca, 2011; Hlatky; Hahnfeldt, 2014; Hyndman, 2016).

A segunda, promoção, inclui mudanças na dinâmica da divisão celular, causadas por agentes indutores, expansão e acúmulo de alterações, que levam a progressão. Para

a próxima fase, além do microambiente favorável e necessária a evasão da imunovigilância (Inca, 2016; Schreiber RD et al 2011).

A progressão é caracterizada pela instabilidade do genoma, incluindo mudanças estruturais relacionadas ao metabolismo, alta taxa de proliferação, insensibilidade à sinalização inibitória do crescimento, ativação de oncogenes, perda da função de genes supressores, invasão e capacidade metastática (Schreiber, RD. et al 2008; Ahlers JD, Belyakov, IM 2010).

A imunovigilância, atualmente denominada imunoedição, consiste em três fases que são: eliminação, equilíbrio e escape.

Na primeira fase (eliminação), ocorre destruição das células neoplásicas, neste caso a vigilância imunológica funcionou; também pode persistir, e como consequência as células malignas podem não ser completamente eliminadas e continuar para a próxima fase permitindo o surgimento de variantes pouco imunogênicas (Mittal D. 2014).

Autores argumentam que o sistema imunológico contribui com a pressão seletiva *Darwiniana* e como resultado, o tumor cresce "esculpido" pelo SI as custas de variantes celulares mais adaptadas à agressão (Schreiber, RD, et al 2011, Rubtsov YP, et al, 2008, Ahlers JD, 2010).

Durante a fase de equilíbrio, coexistem células transformadas imunogênicas e discretamente imunogênicas e variantes de escape. O estado de equilíbrio pode ser revertido em favor da eliminação ou progredir para o “escape”, dependendo da função imunológica. Esse equilíbrio é área fundamental para investigação e compreensão, podendo ser alvo terapêutico atraente no manejo da doença em estágio subclínico (Rubtsov, et al 2008; Adeegbe, DO. 2013).

2.3 Microambiente tumoral e câncer.

É definido como a complexa rede de células, moléculas, proteínas e citocinas que compõem a massa tumoral. Inclui, além das células tumorais, leucócitos, células endoteliais, epiteliais e a matriz extracelular (MEC). É coordenada por sinalização

molecular (citocinas e quimosinas), que estabelecem resposta inflamatória crônica favorecendo a promoção e progressão (Gujam, et al 2015) **(Figura 1)**.

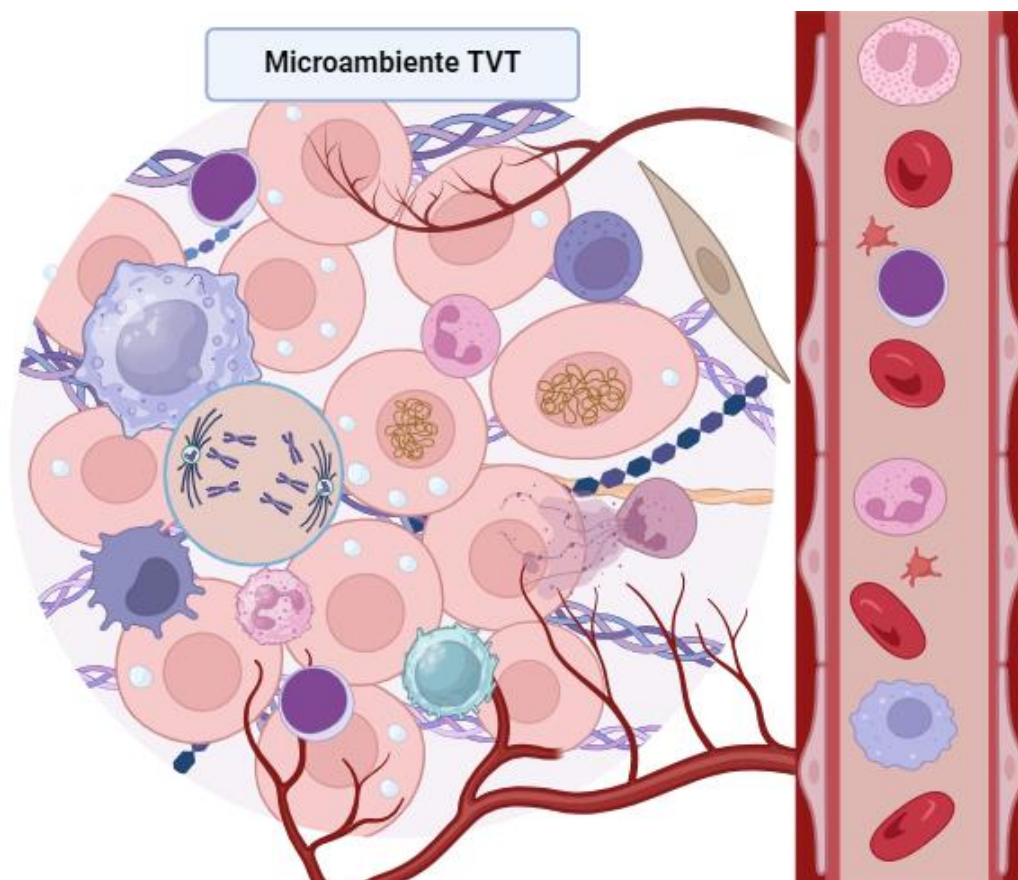


Figura 1. Microambiente tumoral no TVT constituído por vascularização, células inflamatórias e fibroblastos. As células neoplásicas exibem atipias diversas, desde citoplasmáticas até nucleares, inclusive mitose. (Imagem própria).

A matriz extracelular (MEC) é composta por colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas que conferem propriedades estruturais das células e tecidos. Essas proteínas, por sua vez, desempenham papel regulador em ampla variedade de processos. Cada célula mostra o seu perfil de receptores que constituem a interface de comunicação com o microambiente (Huxley-jones, J 2009; Gujam, et al 2014).

O microambiente inflamatório crônico em qualquer câncer está relacionado aos macrófagos associados a tumores (MATs) e seu estabelecimento depende de citocinas e fator de crescimento transformante beta (TGF β). Além disso, recrutam células supressoras, promovem angiogênese, invasão e progressão (Mantovani, A. et al, 2004; Mantovani, A. et al 2008).

2.4. É possível transmitir câncer em humanos?

Os primeiros dados sobre a transmissão potencial vêm de uma série de experimentos de Chester M. Southam, que só podem ser descritos como antiéticos. Apesar dos grandes cortes de sujeitos, a implantação subcutânea levou à formação de nódulos uma semana após, sendo que os mesmos regrediram em 4 semanas, embora, quatro pacientes apresentaram recorrência e um caso apresentou metástases para linfonodos axilares (Moore, AE. 1957; Southam, CM. 1958; Hornblum, AM. 1997).

Cerca do 0,04% dos órgãos transplantados e aproximadamente 0,06% das células-tronco hematopoiéticas transplantadas, desenvolveram câncer (Welsh, JS. 2011). No entanto, De acordo com o último relatório publicado pelo Observatório Global de Doação e Transplantes (GODT) produzido em colaboração com a OMS e a Organização Mundial de Transplantes (OMT), em 2021 foram realizados 144.302 transplantes de órgãos sólidos.

Os números reais podem ser maiores, considerando que, transplantes de órgãos também apresentam risco de desenvolver o sarcoma de Kaposi, causada pelo herpesvírus humano tipo 8 (HHV8) em indivíduos imunocomprometidos. Encontrou-se a presença de marcadores específicos do doador, ou seja, identificadores de um tumor transmissível, em cinco dos oito sarcomas de Kaposi após o transplante (Barozzi, P. 2003; Welsh, JS. 2011).

Os receptores de transplante de órgãos podem desenvolver o sarcoma de Kaposi por três vias: a primeira o órgão já infectado com HHV8 e o ambiente imunossuprimido do receptor média a disseminação viral; a segunda, o doador já é HHV8 positivo e a medicação imunossupressora necessária para o transplante permite a reativação do vírus; a terceira, o órgão transplantado já contém células neoplásicas.

A doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD) é a malignidade mais comum que complica o transplante de órgãos sólidos (TOS). A incidência é variável dependendo do tipo de aloenxerto, com incidência de 1% a 3% em receptores pediátricos de transplante renal, pacientes com deficiência sintomática de testosterona (SDT) 5% a

20%, coração e pulmão 2% a 10% e fígado 1%–5% (Penn, I. 1990; Petrara, MR. et al 2015; Debray, D. et al 2009).

Em geral, PTLD em pacientes com SDT tem apresentação bimodal, com PTLD "inicial" desenvolvendo nos primeiros 2 anos após o transplante e PTLD "tardia" desenvolvendo 5 a 10 anos após o transplante (Schober t et al 2013, Abbas F et al 2020).

A maioria dos PTLDs são “precoces” e relacionados à infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV); com mais de 80% dos casos pediátricos no primeiro ano após o transplante durante o período mais intenso de imunossupressão de células T. (Dharnidharka, VR. et al 2001, Kitchlu A, et al 2019)

A PTLD abrange espectro de características histopatológicas e envolvimento de órgãos, variando de linfoproliferação benigna e apresentação semelhante à mononucleose infecciosa até processos neoplásicos invasivos, como linfoma de Hodgkin clássico. (Fulchieiro, et al 2022).

Portanto, infeccioso ou não, o câncer transmissível também foi claramente identificado em humanos, em condições específicas, e deve ser considerado um dos contribuintes para problemas de saúde humana.

2.5 Gene supressor de tumores *TP53* e *P53*

É um dos genes mais estudados na genética do câncer, está mutado em mais de 50% de todos os tipos de câncer humano e codifica a proteína *P53*, proteína multifuncional que induz ou inibe as vias apoptóticas centrais, cuja deficiência contribui a instabilidade genômica, levando ao acúmulo de mutações e aceleração no desenvolvimento do tumor. (De Leon, et al 2018).

A *P53* é ativada quando há quebras no DNA e induz a produção de proteínas pró-apoptóticas. Uma dessas proteínas é a BAX, outro membro pró-apoptótico que reside na membrana externa da mitocôndria e promove a morte celular diretamente, como proteína formadora de canais, e indiretamente, inibindo os reguladores da morte celular (Jürgensmeier, et al 1998).

TP53 apresenta a peculiaridade de que algumas mutações atuam de forma dominante, produzindo a formação de tetrâmeros inativos, localizado no humano no cromossomo 17. O mecanismo de ação da *P53* consiste em um bloqueio transitório da passagem da fase G1 para a fase S em células com dano no DNA. (Chow, et al 2012).

Foi demonstrado que *P53* tem funções autônomas não celulares afetando outras células adjacentes, regulando a expressão no estroma tumoral de múltiplas proteínas inibidoras de crescimento, levando ao crescimento tumoral *in vivo* e à metástase, pela transformação de células epiteliais adjacentes em células malignas (E. Roshani, ASL. et al 2023, Yan Stein et al 2019).

Mutações no *TP53* estão entre os eventos mais frequentes em múltiplos cânceres. A maioria das mutações são enriquecidas no domínio de ligação ao DNA (DBD) e 80% das mutações DBD são mutações missense em seis códons *hotspot*, que representam quase 25% das mutações. No entanto, mais de 65% das mutações fora dessa região demonstraram ser mutações sem sentido ou truncadas. (V.J. Bykov et al 2018, M.C. Kennedy, S.W. Lowe 2022; J.-M. Schvartzman ET AL 2011).

Mutações missense específicas de *TP53* demonstraram sabotar vias críticas de sinalização intracelular, promover a sobrevivência e o crescimento de células neoplásicas, aumentar invasividade, migração, metástase e desenvolver quimiorresistência (R. Brosh, V. Rotter 2009; E. Roshani ASL et al 2023)

As mutações afetam o MAT através de duas estratégias. Primeiro, a transcrição de *P53* pelo gene mutado promove a secreção de fatores oncogênicos, que por sua vez desencadeiam o recrutamento de células inflamatórias de fenótipo imunossupressor. Em segundo lugar, modula as moléculas de sinalização secretadas pelo estroma (Yan Stein et al 2019).

Os *hotspot*: R175, R282, G245, R213, R273 e R248, são mais propensas a levar à produção de proteínas não funcionais. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), as mutações R248Q, R248W e R273H estão entre as cinco mais frequentes, sendo R248Q a segunda mais frequente (E. Roshani ASL et al 2023).

A mudança de aminoácido na posição 248 interrompe a ligação ao DNA é a quarta mutação de ponto de interrupção comum em câncer de pulmão, mama e ovário, bem como gliomas. (Tang Y, Yao Y, Wei G. 2021; Bullock, A et al. 2000, Joerger, A.C., & Fersht, A.R 2007).

A metodologia deste estudo concentra-se nas mutações R248Q e R248W. No entanto, o tamanho da sequência obtida permite avaliar outros códons que também poderá apresentar alterações, sejam sinónimos ou não.

2.5.1. R248Q: Interferência com a ativação *TP53* e falha na parada G1

Dados da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), estabelece a prevalência de R248Q como mutação somática em 847 tumores diferentes (principalmente mama, cólon, cabeça, pescoço e pele, esôfago, gástrico, pulmão, ovário e próstata). como mutação germinativa em Síndrome de Li-Fraumeni (Bullock A.N. et al 2000).

O mutante *TP53* amplifica a sinalização do receptor tirosina quinase (RTK), promove a migração e proliferação celular, através da sinalização de proteínas quinases (AKT). No entanto, o mecanismo ainda não foi elucidado. A ativação excessiva da sinalização AKT pode mediar variedade de processos, incluindo desregulação do ciclo celular, proliferação e resistência.

Além disso, foi elucidado que AKT ativado fosforila substratos, ou interage com outros fatores, para sinalizar vários processos celulares. Por exemplo, fosforila o gene homólogo doble minuto em camundongo (MDM2) na serina 166 e a 186 para iniciar a translocação nuclear de MDM2, que age para promover a ubiquitinação de *P53* para degradação, bem como reduz as atividades de transcrição. (Mayo L.D., & Donner, D.B. 2001, Lee, J.G. et al 2015, Hanel, W. et al 2013; Thompson LR. et al 2020)

2.5.2. R248W: Promove proliferação, invasão e migração de células neoplásicas.

A mutação R248W promove o crescimento, migração, invasão e disseminação de células neoplásicas do cólon. As células cancerígenas mutantes também foram

significativamente resistentes ao 5-alfa fluorouracilo (5-FU) (GAO, et al 2022; Chin, et al 1992; Wang, et al 2015; Zhou, et al 2019).

A capacidade do mutP53 de ligar as proteínas da família STAT está correlacionada com o grau de estabilização. R248W sofre forte estabilização e promove seletivamente a migração participando da formação de complexos constitutivos com STAT3 fosforilado. (Heddergott, R. et al 2018; Taussing. M. J. 1989)

O estudo dessas alterações presentes nas células cancerígenas é importante, tanto pela alteração na função do gene *TP53*, quanto pela relevância clínica que podem ter quando associadas à resposta de determinada terapia ou prognóstico (Sanchez JJ, et al. 2003).

2.6 Quimosina 8 (CXCL8)

As citocinas são proteínas com ampla variedade de funções, incluindo a regulação da resposta imune e inflamação, bem como a comunicação entre as células. Estas se caracterizam principalmente por serem solúveis em água e terem efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos. Tendem a ser efetores em vez de estruturais e interagem com receptores específicos. (Vilcek, J., & Feldmann, M. 2004)

Podem ser pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, possuem pleiotropismo, desencadeando múltiplos efeitos. São redundantes, ou seja, diferentes citocinas podem produzir o mesmo efeito. Sinérgicas, causando um efeito que é potencializado entre elas. Além de antagônicas, podendo bloquear outras citocinas. (Vilcek, J., & Feldmann, M. 2004)

CXCL8, conhecido como fator de ativação de neutrófilos (FAN) e interleucina 8 (IL-8), foi a primeira citocina identificada originalmente descrita como um quimioatraente de leucócitos. Produzida principalmente por neutrófilos, macrófagos, células-T, células epiteliais e células endoteliais. (G. J. Graham, et al 2012; H. M. Farawela, et al 2016; S. K. Wculek 2015)

Pode produzir diferentes efeitos biológicos ao se ligar a seus receptores: CXCR1, CXCR2 e o receptor de antígeno Duffy para citocinas (DARC). O CXCL8 e seus

receptores estão associados ao desenvolvimento de vários tipos de tumores, especialmente o câncer colorretal e suas metástases hepáticas.

Além de promover a angiogênese, proliferação, invasão, migração e sobrevivência de células neoplásicas colorretais (CRC). CXCL8 e seus receptores também são conhecidos por induzir a transição epitélio-mesenquimal de células CRC, promovendo a evasão da imunovigilância, assim como aumentando a resistência ao anoikis, que promove a formação de células tumorais circulantes (CTC) e sua colonização de órgãos distantes (Slapak, EJ. et al. 2020).

Além de seus receptores, também interage com glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos (PGs), que permitem a ligação a receptores expressos na membrana leucocitária, estimulando o extravasamento. Gradientes intersticiais estabelecidos pela ligação de GAG aumentam a quimiotaxia de leucócitos. (Cambier, S. et al 2023)

A neovascularização induzida por CXCL8, fornece base para a promoção do crescimento tumoral e metástase. Atualmente reconhecida como função crítica. Atua como um atraente crucial para o recrutamento de macrófagos associados a tumores (TAM) mediado por hipóxia, promovendo assim a imunossupressão no microambiente. (Dong, F. et al 2021; Liu, Q. et al. 2016)

A expressão de CXCL8 foi detectada em vários tipos de câncer, incluindo tumores sólidos (cérebro, mama, colo do útero, cólon, gástrico, pulmão, melanoma, mesotelioma, ovário, próstata, rim e tireoide) e malignidades hematológicas (Xie, K. 2001). Podendo ser um biomarcador de prognóstico desfavorável. (Ellis, L, et al 1992).

Teixeira Á et al demonstraram recentemente que CXCL8 induz a liberação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) que podem envolver e proteger células tumorais da citotoxicidade ao evitar o contato com linfócitos T CD8⁺ e NKs. Além de induzir o fenótipo de Macrófagos M2 (Teixeira, et al 2020; Gujam, FJ. et al 2015).

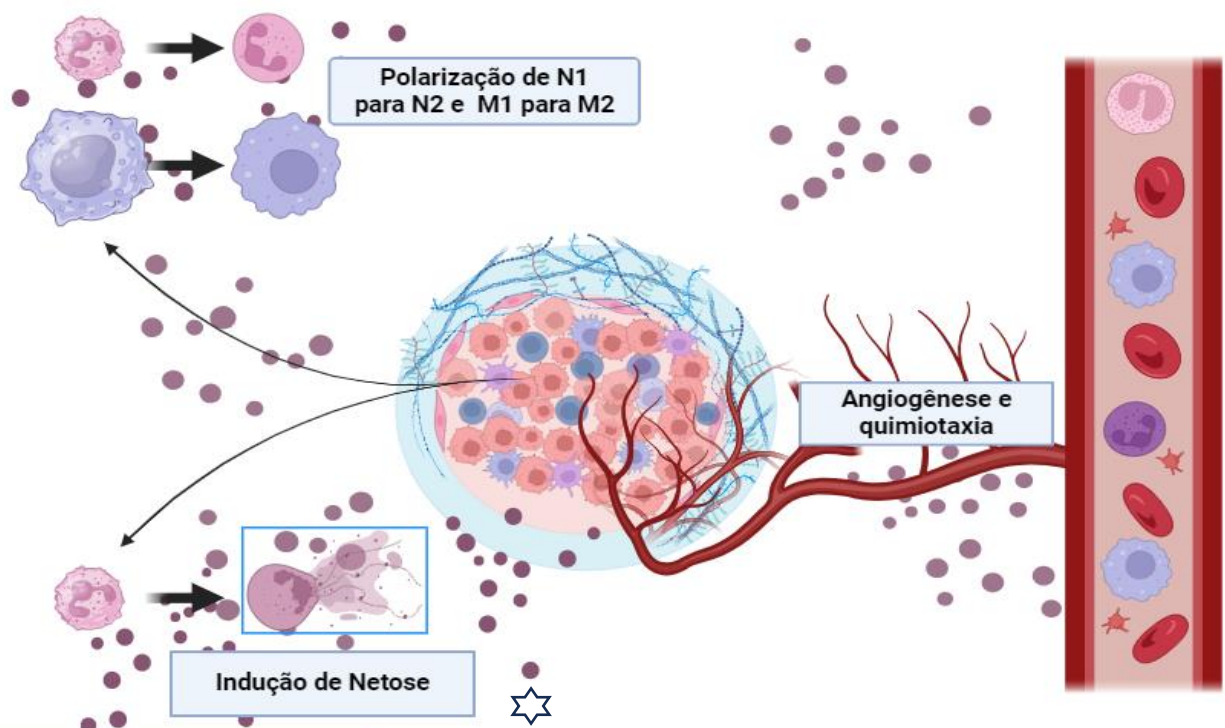


Figura 2. Esquema das funções do IL8. (Imagem própria)

3. Objetivo

3.1. Objetivo geral

Identificar e quantificar a expressão de *P53*, *CXCL8* e das mutações de *TP53* em tumor venéreo transmissível canino e sua relação com o comportamento biológico

3.2 Objetivos específicos

- 1 Identificar e quantificar a expressão de *P53* e *CXCL8* em tumor venéreo transmissível canino
- 2 Identificar e comparar a sequência de DNA do *TP53* do TVT e as espécies *Homo sapiens* e *Canis lúpus familiaris*.
- 3 Analisar a relação entre as mutações e a expressão de *P53* em TVT.
- 4 Estabelecer a relação entre *P53* e *CXCL8* com o comportamento biológico de TVT.
5. Identificar e estabelecer se existe relação entre as mutações e *CXCL8*.

4. Material e Métodos

4.1 Comissão de Ética.

O presente estudo foi aprovado pelo CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP sob o número de protocolo: 0117/2022.

4.2 Seleção das amostras

Amostras pertencentes a 36 (Trinta e seis) cães atendidos no hospital veterinário da faculdade de Botucatu e do Hospital Veterinário da Universidade de Caldas, Colômbia; sem tratamento prévio, predileção por raça, sexo ou idade foram utilizadas.

Do total de amostras, 32 foram divididas em duas partes. Uma parte foi fixada e preservada em blocos de parafina, enquanto a outra foi congelada em tubos *Eppendorf* estéreis, livres de nucleases (NF), com RNA later a -80 graus C°

Os 4 casos faltantes tinham amostras de cultivo primário correspondentes a cada caso, as quais estavam preservadas por congelamento em nitrogênio líquido, além de ter tecido parafinado. Nos controles foi incluído material genético de 8 caninos sem neoplasias.

4.3. Avaliação clínica dos pacientes com TVT

O protocolo incluiu informações sobre a história clínica dos animais e controle reprodutivo, tempo de evolução do processo neoplásico estimado a partir da data de início da apresentação dos sinais clínicos até o momento do diagnóstico.

4.3.1. Aplicação do estadiamento Tumor-Nódulo-Metástase (TNM)

Os animais tiveram avaliação física e específica da lesão, a qual inclui a mensuração do tumor no ponto de maior diâmetro e a avaliação dos linfonodos locais (TNM adaptado ao TVT por Amaral 2005). Em todos os casos houve a classificação do tipo tumoral em Linfocitoide, Plasmocitoide ou Misto.

4.3.2. Avaliação clínica e hematológica.

O acompanhamento hematológico semanal, cálculo da relação neutrófilo-linfócito (NLR) plaqueta linfócito (PLR) e linfócito monócito (LMR), foi feito como parte da avaliação da resposta à terapia. O valor de referência 9,44 para NLR foi estabelecido por Davies et al. (2017) em linfoma multicêntrico.

4.4 Comportamento biológico do TVT

Estabelecidos os grupos conforme as análises dos subtipos citomorfológicos estabelecidos por Amaral et al. (2007) o estado de progressão tumoral foi estabelecido segundo os critérios de Mukaratirwa e Gruys (2003) e de Stockmann et al. (2011). Com base em estudos similares conduzidos pelo grupo de pesquisadores Flórez et al. (2016), Duzanski et al. (2017), Ballesteros et al., (2018) e Alzate et al. (2019).

Os animais receberam protocolo terapêutico idêntico, isto é, infusão semanal de sulfato de vincristina intravenoso na dose de 0.75 mg/m^2 de superfície corporal devidamente acompanhados durante o tratamento de quatro semanas. A resposta inclui três categorias: completa (RC), quando houve regressão total do tumor em até quatro semanas; parcial (RP) quando houve abaixo de 50% de regressão e resistente (R), quando não houver regressão.

4.5 Imunofenotipagem para P53 e CXCL8.

A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para a identificação de P53 anticorpo monoclonal de camundongo e para CXCL8 policlonal de coelho ambos na diluição 1:200. Os anticorpos foram obtidos de fornecedores que garantiram reatividade na espécie canina, porém a metodologia definiu a padronização do processo para os tecidos em estudo. Testados vários tempos de recuperação antigênica e bloqueio de ligações inespecíficas, bem como diferentes diluições de anticorpos (1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400).

Testados diferentes tempos e ciclos de lavagem, diluição, filtração e contra coloração. Permitiu padronizar o processo e reduzir ligações inespecíficas e de artefatos.

Para identificar e quantificar a expressão foi feito método semiquantitativo em duplo cego. Para tanto, a contagem das células tumorais marcadas foi feita em 4 campos homogêneos com a Objetiva 40X, microscópio Opticam, utilizando software Mosaic V2.4™, contabilizadas 100 células em cada quadrante.

A expressão imuno-histoquímica foi feita de modo semiquantitativo como mencionado previamente, no qual avaliou se a intensidade da marcação, a distribuição da expressão no tecido. A distribuição do antígeno foi avaliada a partir dos seguintes critérios: +1 (somente expressão nas células tumorais), +2 (expressão nas células tumorais e epiteliais) e +3 (expressão nas células tumorais, epiteliais e inflamatórias).

4.6. imuno-histoquímica

Preparo da amostra

Utilização de cortes histológicos de 3 micrômetros dispostos em lâmina polarizada (Starfrost). Desparafinação por meio de três banhos de xilol, seguida de hidratação em três banhos de álcool 100%, seguidos de álcool 90%, 70% e água deionizada.

Recuperação

Realizada em autoclave (Pascal) imersa em tampão citrato (pH 6.0) durante 40 minutos.

Após a recuperação, as lâminas foram resfriadas e lavadas com solução TRIS (pH 9.0).

Bloqueio de ligações inespecíficas e incubação de anticorpo primario

A peroxidase endógena com a solução de peróxido de hidrogênio 10% (H₂O₂), por 7 minutos. Ligações inespecíficas em solução de leite desnatado a 4 graus C° durante 60 minutos. Ração para cada anticorpo em diluente de IHQ 1:200, durante *overnight* a 4 graus C°.

Lavagem, revelação e contra coloração

Quatro lavagens com solução TRIS. Incubação com kit de polímero universal (Nichiran™)

por 30 minutos. Após três lavagens com solução TRIX. Logo depois, revelação com solução de uso (DAB) por 7 minutos. Por fim, remoção do excesso de DAB com solução TRIX.

Solução de hematoxilina de Harris 50%. Após lavagem, desidratação e montagem com lamínula e resina histológica (SP15-100, *Permout mounting* médium).

4.7. Design de primers.

Via banco de dados do *National Center for Biotechnology Information (NCIB)*, três sequências de *TP53* para a espécie *Homo sapiens* e três sequências do mesmo gene da espécie *Canis lupus familiaris*, com o pareamento das sequências de DNA realizado utilizando-se software *Geneous prime™*.

Os primers foram projetados com 834 pares de bases (Bp) de forma que o segmento de interesse estivesse localizado no centro de cada fita. A funcionalidade e especificidade foram verificadas em software *Blast™* (Basic Local Alignment Search Tool) e *Geneous prime™*.

4.7.1. Extração de DNA genômico de TVT

A extração de DNA foi realizada seguindo as instruções do kit de purificação de ácidos nucleicos *MagMAX CORE™*. Utilizando fragmentos de 30 mcg do total de 36 espécimes, 32 foram extraídos de tecido congelado e 4 correspondiam a cultivo primário ($2,4 \times 10^6$ Células) dos 4 restantes, os quais não dispunham de tecido congelado.

Primeiramente foi feita lavagem com água livre de nucleases (NF) por 60 s. Foram introduzidas 5 esferas de zircônia de 3 mm junto com o material genético no *ependorf* e processadas no equipamento *Beader Locus™* em três ciclos de 90 segundos a 4350 rpm para macerar e homogeneizar.

Iniciou-se o processo de purificação de DNA com kit de purificação em *ependorf* de 1,5ml com 10ul de solução PK, 20ul de beads magnéticos, 350ul de solução LISE, 350ul de solução BINDING e 200ul de material macerado, incubado a 18 graus C° e

homogeneizados em Vórtex antes de posicionar no estante magnético 3 minutos. Foi retirado então o sobrenadante evitando movimentar os beads com a ponteira.

Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com as soluções WASH 1™ e WASH 2™ do kit de purificação. Foram colocados 500ul das soluções de cada lavagem, usando Vórtex até ficar completamente homogêneo e posteriormente posicionar no estante magnético por 2 minutos e a seguir foi retirado o sobrenadante.

Após do ciclo de lavagem, deixou-se secar 10 minutos em 20 graus C°, para adicionar 100ul de ELUTION™, desta vez homogeneizados com pipeta, incubados 3 minutos fora da estante magnético e 2 minutos no estante, o ELUTION™ foi removido sem movimentar os beads para depositar no tubo *ependorf* mantido a -80 graus C°.

Finalmente 5ul de material genético purificado adicionados com o MIX (43 UI de enzima Gotaq G2, 2 UI de cada primer). Realizado controle negativo com 5uMol de água *NF* e procedeu-se a termociclagem.

4.7.2. Preparo dos primers

O liofilizado foi centrifugado para garantir que permaneça no fundo do tubo, depois diluído em Tris EDTA (TE), de acordo com o conteúdo do liofilizado até uma concentração de 100 uM, formando a solução mãe que foi mantida a - 20 graus C°, removido 10 micromoles em água *nuclease Free (NF)* para formar a solução de uso.

4.7.3. Termociclado

O uso do kit *Eppendorf* PCR convencional, realizou-se desnaturação inicial de 94 graus por 2 minutos, seguida por 40 séries de ciclos de 1 min a 94, 61 e 72 graus C°, seguido por um único ciclo de 72 graus C° por 5 min e ciclo final de 4 graus C°.

4.7.4. Qualidade do DNA

Para se verificar a qualidade do DNA genômico foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8% (INVITROGEN), corado com brometo de etídeo 0,5 µg / µL em solução

de agarose dissolvida em Tris base 0,04 mmol e 50 mmol de EDTA pH 8,0 (Sambrook et al., 1989).

As amostras foram misturadas com tampão de aplicação concentrado 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25 %, glicerol 50%). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (GIBCO BRL – HORIZON 58), a 100 Volts por 20 minutos. O DNA foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (ImageQuant LAS 500 de General Electric™).

4.7.5 Sequenciamento de Sanger

O sequenciamento usou nucleotídeos sintéticos (ddNTPs), que não possuem o grupo-OH no carbono 3' do açúcar ribose. Depois de amplificar e purificar o DNA alvo, a PCR de sequenciamento é iniciada em quatro reações separadas, cada uma com primers específicos para a região em teste.

Após várias rodadas de extensão do DNA molde a partir do iniciador ligado, são gerados fragmentos de DNA amplificados de diferentes comprimentos. Os fragmentos de DNA resultantes foram desnaturados pela temperatura e separados por tamanho na eletroforese. A chamada de base foi feita com a ajuda do software de análise e alinhamento Geneous Prime™.

4.8. Análise estatística

Foi realizada análise de regressão utilizando o ajuste de modelos lineares generalizados, por meio da aplicação do procedimento GENMOD no software SAS™ versão 9.3, empregando distribuição Gama e a função de ligação Log. As variáveis dependentes foram a expressão da CXCL8, *P53* e a presença de mutação no gene *TP53*

As variáveis independentes consideradas foram o subtipo citomorfológico, a resposta ao tratamento, fase clínica, presença de metástases e tipo de crescimento. Calculadas as medidas descritivas de média e desvio padrão das variáveis contínuas e as proporções para as variáveis categóricas e os intervalos de confiança de 95%.

As incidências entre as variáveis categóricas foram realizadas por meio de testes qui-quadrado pelo teste exato de Fisher. Para analisar as comparações múltiplas utilizados os valores de P ajustados pelo método de Tukey-Kramer ($p < 0.05$). A análise de correlação feita pelo método linear de Spearman, uma vez que a pesquisa tinha dados contínuos e dados categóricos, além de não apresentar normalidade.

5. Resultado

5.1 Mutações de *P53*

A sequência do *TP53* em ambas espécies apresentaram similaridade em 80% da sequência, além do fato de que o segmento onde se localizam as duas mutações sob investigação (R248) apresentou 35/36 aminoácidos idênticos.

A sequência de referência do *TP53* humano tem 19.669 pares de bases (pb) de comprimento e está localizada na região cromossômica 17p13.1. A sequência de referência do TVT tem 4.204 pb de comprimento, e está numa região cromossômica que não foi previamente determinada. A análise da base de dados sugere que *TP53* no TVT está localizado no cromossomo 13 a mesma que a espécie *Canis lúpus familiaris*.

As sequências apresentam regiões com alta similaridade, coincidência de 3083 bp. A especificidade dos primers é representada nas **Figuras 3, 4 e 5**

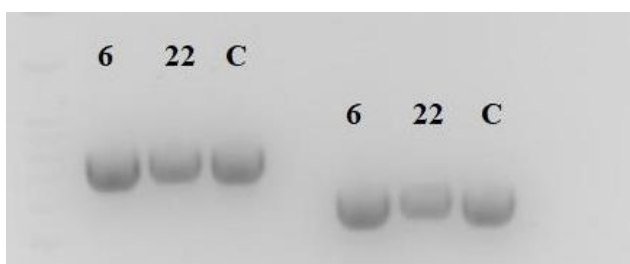


Figura 3. Especificidade do Primer, Eletroforese em Gel de Agarose Visualizada mediante transiluminador ImageQuant LAS 500 da General Electric™. A designação numérica corresponde à identificação da amostra, sendo a letra C referente ao controle.

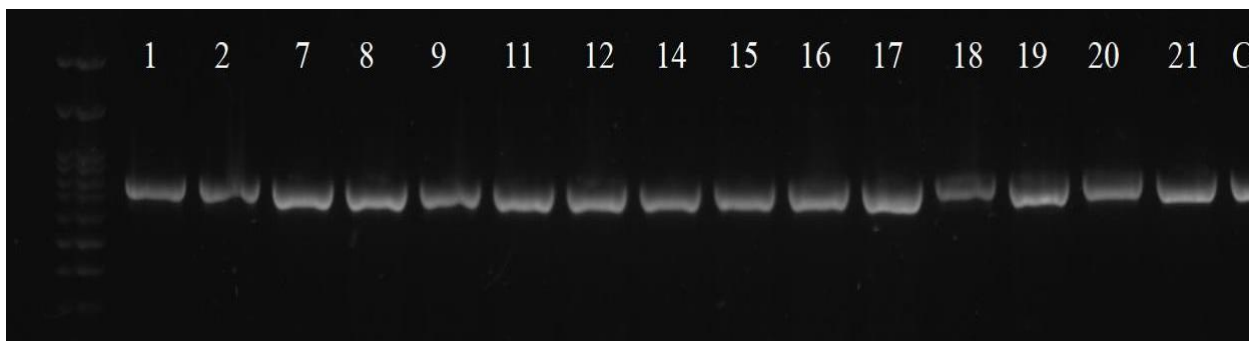


Figura 4. Especificidade do Primer, Eletroforese em Gel de Agarose Visualizada mediante transiluminador ImageQuant LAS 500 da General ElectricTM. A designação numérica corresponde à identificação da amostra, sendo a letra C referente ao controle.



Figura 5. Especificidade do Primer, Eletroforese em Gel de Agarose Visualizada mediante transiluminador ImageQuant LAS 500 da General ElectricTM. A designação numérica corresponde à identificação da amostra, sendo a letra C referente ao controle.

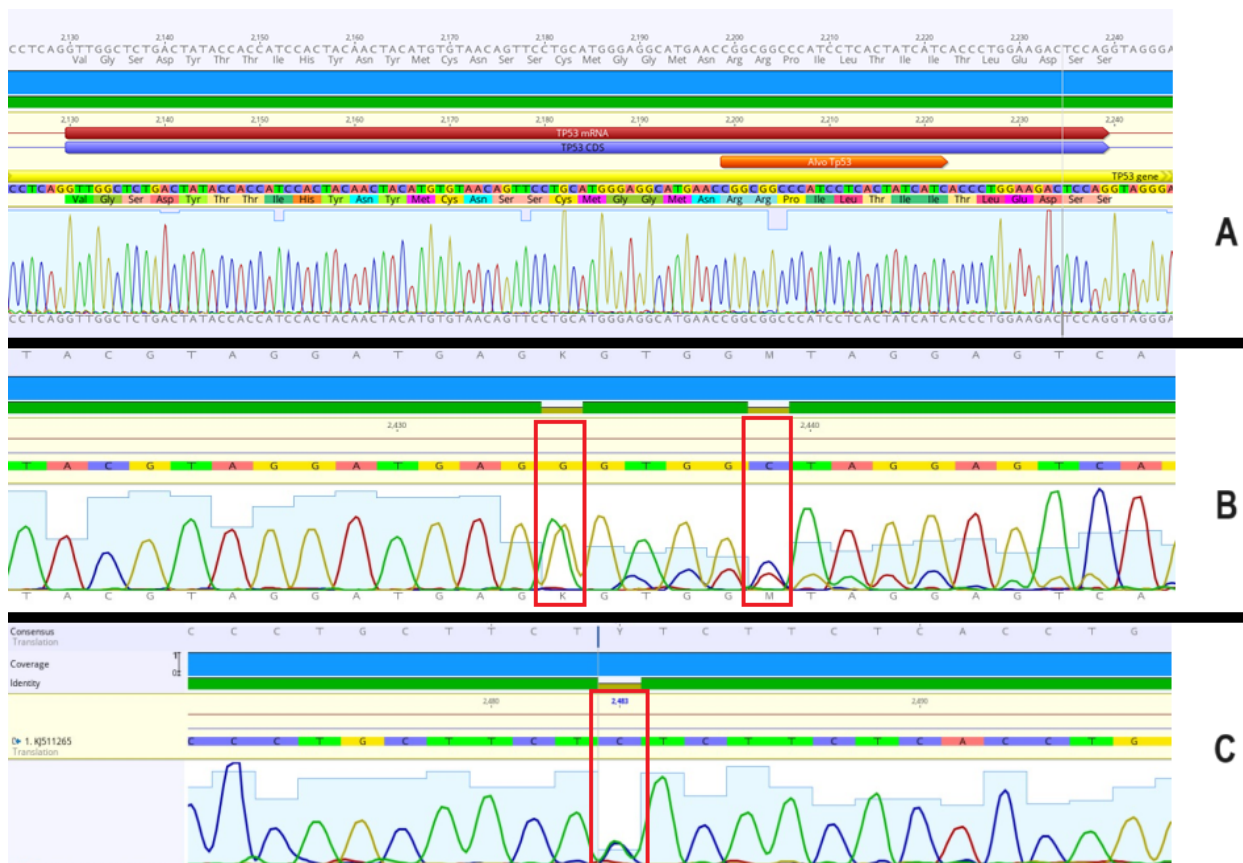


Figura 6. Exemplar de Sequências Adquiridas. Não há evidência de mutações missense (A). Mutações sinônimas foram detectadas nos códons 2434, 2439 (B) e 2483 (C), durante a análise minuciosa de sequências utilizando o software Geneious Prime.

Adicionalmente, avaliados os códons 245, 249 e 273, que corresponderam a mutações nos domínios de união do DNA na espécie *Homo sapiens*, verificando que no TVT, os domínios apresentaram localização diferente 12 códons atrás na sequência, identificando sua localização no TVT: 233, 237 e 261 respectivamente.

A análise de mutações classificou os tumores segundo sua origem geográfica em dois grupos: Grupo A, composto por 18 espécimes da região andina de Colômbia; Grupo B, composto por 17 espécimes do interior de Brasil. A pesquisa identificou que não há significância em relação ao subtipo citomorfológico, resposta, raça, idade, sexo e Imunofenotipagem para IL6, IL8, TGF-B1 e P53.

Ao revisar a totalidade das sequências, foram identificados polimorfismos em nucleotídeos quando se comparava com as sequências de referência nos códons 2434,

2439 e 2483. A pesquisa encontrou que TVT apresenta mutações sinônimas nas sequências do *TP53*.

A localização do códon de mutações sinônimas foi submetida ao teste exato de Fisher, e na análise de probabilidade, obteve-se valor de $P < 0,0001$ para o códon 2434, indicando que a presença dessa mutação ocorreu em 38,89% das amostras do Grupo A e não no Grupo B.

Em relação à mutação 2439, foi observada em apenas um dos casos do Grupo A, sendo um único caso que apresentou essa mutação. No entanto, dado que representa 5,56% do tamanho amostral do grupo, apenas um caso não permite análise confiável. Quanto à mutação 2483, foi encontrada em proporções semelhantes, estando presente em 51,43% das amostras do Grupo A e 48,57% no Grupo B.

5.2. Imunofenotipagem

A pesquisa contou com uma única diferença no tamanho amostral para ambas as expressões. O grupo de subtipo Linfocitoide, para a marcação de *P53*, excluiu um único caso devido ao esgotamento do tecido parafinado e à impossibilidade de substituição.

5.2.1. Expressão *P53*

A expressão dessa proteína foi baixa: <35% das células tumorais. Obtendo um total de 36 observações positivas. O subtipo Plasmocitoide apresentou 14 casos positivos, média de células marcadas de 25,64 e mediana de 24,75. O subtipo Misto, média de 35,87, mediana foi de 34,61 contou com 9 casos positivos. O Linfocitoide com 13 casos positivos, média de 30,63, mediana de 34,50.

A pesquisa encontrou que a expressão de *P53* em TVT não ocorreu exclusivamente a nível nuclear; também foi observada expressão dessa proteína no citoplasma com intensidade variada.

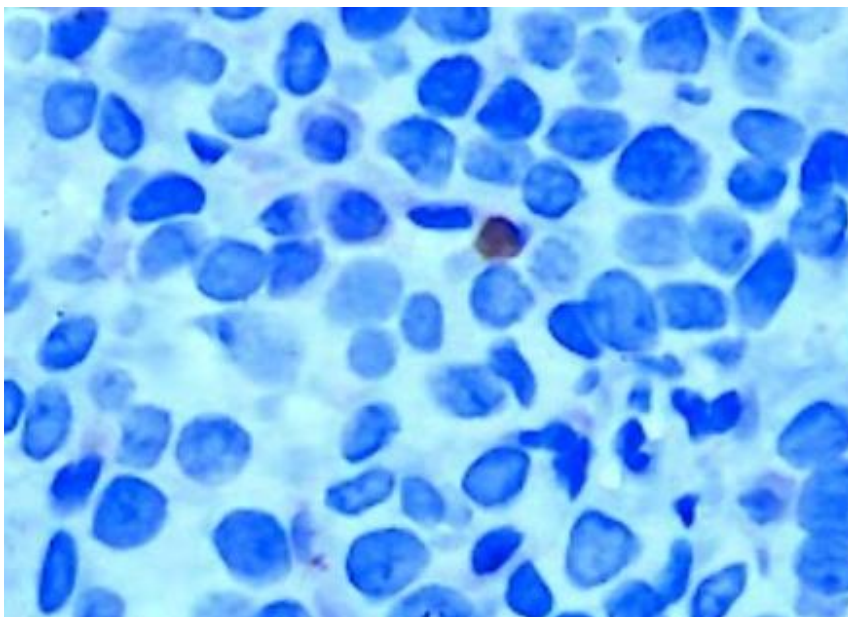


Figura 7. Imunofenotipagem para P53; observa-se marcação no núcleo

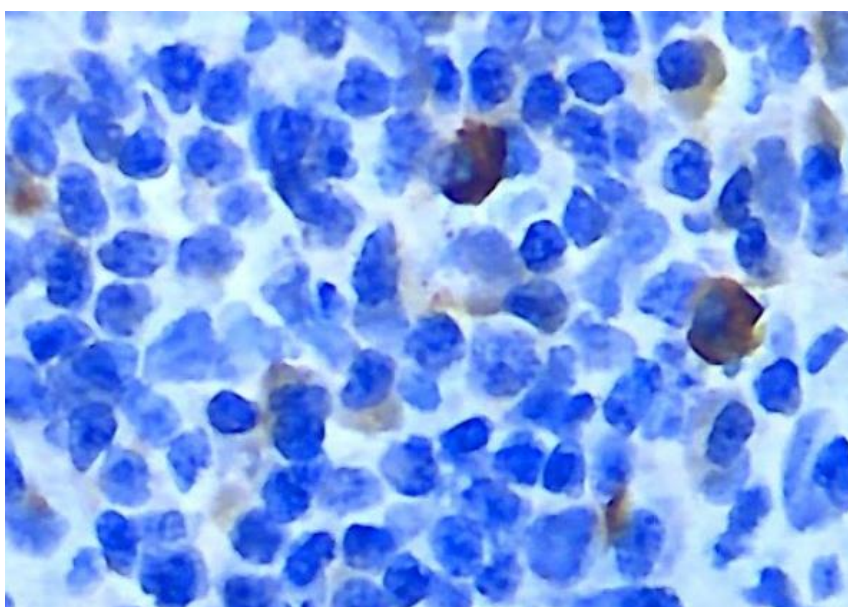


Figura 8. Imunofenotipagem para P53; observa-se marcação no citoplasma

5.2.2. Expressão CXCL8.

A CXCL8 apresentou alta expressão, ultrapassando o 70% das células marcadas. O subtipo Plasmocitoide, apresentou 14 casos positivos, média 81,00 células expressas, desvio padrão 15,11. Este subtipo apresenta variação considerável, com amplitude entre 49,87 e 95,50. No subtipo misto, foram registradas 9 observações, média 88,75 e desvio padrão 9,08, com amplitude entre 66,37 e 95,12. O Linfocitoide, obteve 14 observações, média 77,67 e desvio padrão 15,31. Este subtipo exibe expressão diversa de IL8, com amplitude entre 47,37 e 95,00. (**Figura 9, 10**)

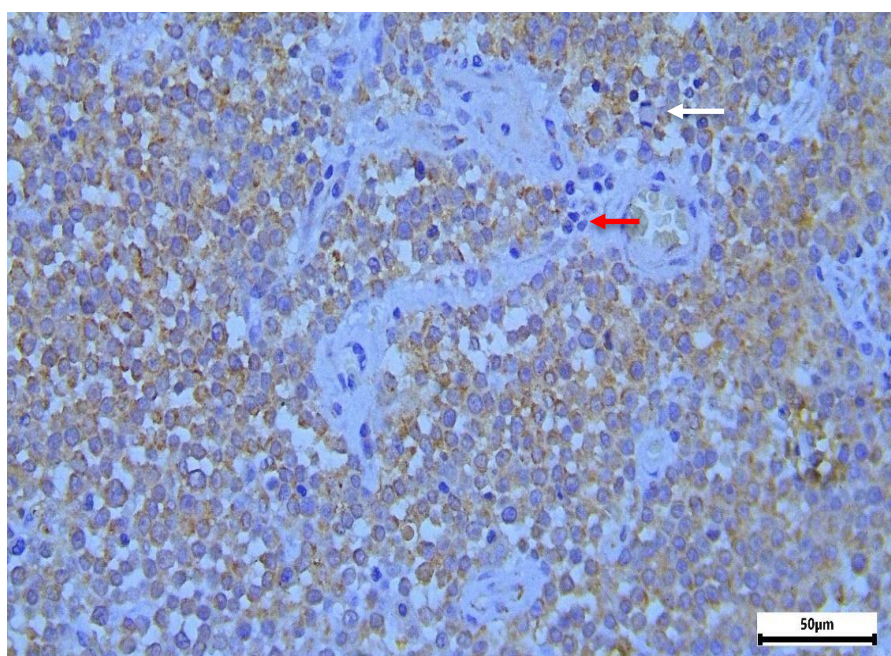


Figura 9. Imunofenotipagem para CXCL8 revela alta expressão com marcação citoplasmática. observa se que células imunes e estromais (setas vermelhas), assim como células tumorais em mitose (seta branca), não apresentam marcação.

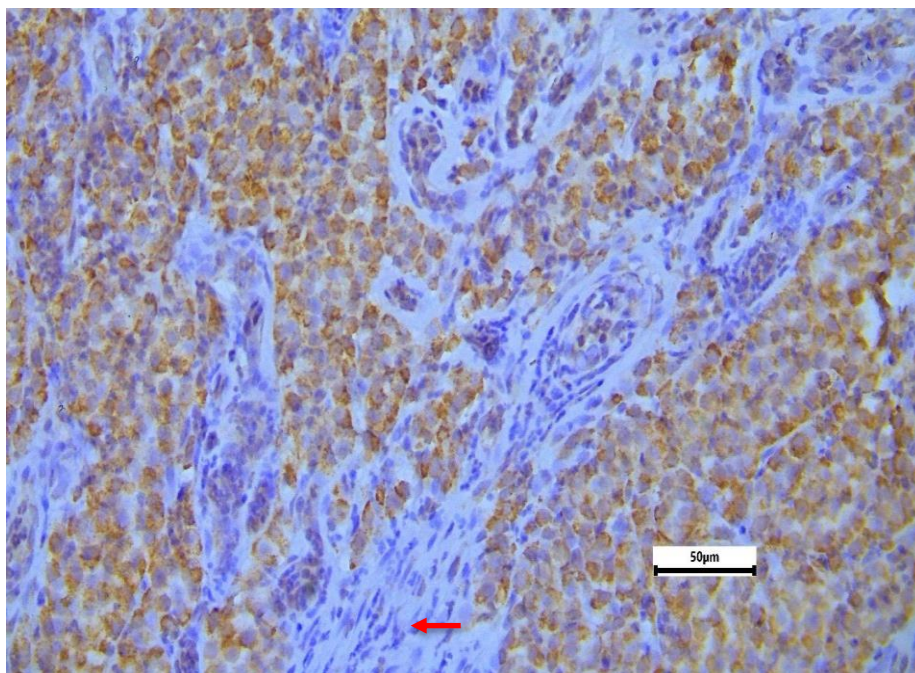


Figura 10. Imunofenotipagem para CXCL8 revela alta expressão com marcação citoplasmática

6. Discussão

A diversidade entre as sequências do *TP53* nas duas espécies poderia implicar diferença no papel que a proteína *P53* desempenha na regulação celular. No entanto, é importante notar que o TVT é doença única que evoluiu ao longo do tempo. Portanto, a comparação das sequências não pode nos informar sobre a evolução normal desse gene.

Mutações nos *Hot Spot* não estão necessariamente relacionadas à oncogênese e à sobrevivência do tumor. Além disso, essas mutações não são as únicas mutações possíveis. É possível que existam alterações que não foram avaliadas no presente estudo semelhante aos resultados encontrados por Sherborne (2016).

A presença ou ausência de uma única mutação não se deve considerar relevante para determinar a sobrevivência do tumor. Uma vez que existem múltiplos fatores que contribuem para a oncogênese e progressão. Também pode haver fatores no microambiente, como infiltração de células imunológicas, angiogênese ou remodelação da matriz extracelular.

Nesta pesquisa foi verificada a mutação R248 na base de dados ClinVar através do software ALFA (Projeto de Frequência de Alelos), no qual foram analisadas as

frequências alélicas em diversas populações. Para a mutação no códon 248 em humanos saudáveis, observou-se frequência de 0,00002 em um total de 54.490 indivíduos, traduzindo-se em apenas um indivíduo portador dessa mutação.

A hipótese baseou-se em uma possível mutação não sinonima nos códons incluídos como hot spots, relacionada ao comportamento biológico. No entanto, a pesquisa encontrou que os espécimes de TVT apresentam uma sequência de aminoácidos preservada, mas sim, polimorfismos de nucleotídeos foram achados indicando que a estrutura tridimensional dos domínios de ligação ao DNA não possui esse tipo de mutação (Shen, X et al 2022)

As mutações sinônimas consistem em alteração na sequência de nucleotídeos que não geram modificação na sequência de aminoácidos. Contudo, esse polimorfismo pode ter efeitos na velocidade de tradução, ligação a fatores de transcrição ou na estabilidade do RNA mensageiro, influenciando a tradução do *P53* (Duncan, A. et al 2023)

A frequência desse tipo de mutação é menor em comparação com as mutações não sinônimas, mas existem estudos que associam as mutações sinônimas a efeitos funcionais no *P53* ou em sua regulação genética, descritos por Duncan, A. et al (2023), Sharp N. (2022) e Shen X. (2022).

Sanchez SA e colaboradores (2009), descreveram dois casos de TVT na América Central, onde foi identificado um polimorfismo de nucleotídeo no códon 147 que não comprometia a sequência de aminoácidos. Em concordância com esse achado, são necessários estudos mais aprofundados que possibilitem estabelecer subgrupos 43 evolutivos de TVT em diferentes regiões geográficas e verificar se essas mutações modulam comportamentos biológicos variados.

A descoberta de mutações sinônimas e a diferença no códon de acordo com a origem geográfica de TVT sugere que, mesmo tendo a origem compartilhada, apresenta diferença evolutiva devido a fatores epigenéticos ou ambientais. A presença desse tipo de mutação poderia explicar a baixa expressão de *P53*.

A expressão citoplasmática de *P53* tem sido descrita em várias neoplasias humanas e está associada a prognósticos desfavoráveis, menor tempo de sobrevida e resposta desfavorável à terapia. O acúmulo da proteína no citoplasma tem sido relacionado a algumas mutações do TP53, interação com outras proteínas, déficit na

fosforilação e perda de sinais de localização nuclear. No entanto, nesta pesquisa, este achado não apresentou evidência estatística relacionada às mutações sinônimas descobertas (Jimbo, N. et al. 2024; Kasuda, K. et al. 2012; Pukkila MJ. et al. 2002).

A expressão da CXCL8 pela imuno-histoquímica observou expressão nas células tumorais acima de 70%. A informação apresenta concordância com o relatado por Sanctis (2024), quem avaliou pela técnica de transcriptômica e bioinformática e relata que CXCL8 se apresenta como um dos genes “*upregulated*” no soro de animais acometidos pelo TVT.

As diferenças observadas nas variáveis estudadas, não revelaram significância. É importante destacar que o tamanho relativamente baixa da amostra no grupo de estudo pode limitar a capacidade de detectar diferenças, ressaltando a necessidade de interpretar os resultados com cautela, devido às possíveis limitações associadas ao tamanho amostral.

Apesar de esta pesquisa não ter encontrado evidências que confirmem sua relação de CXCL8 com as variáveis do estudo, a alta expressão observada, sustenta a conhecida capacidade de progressão do TVT. Outro aspecto a ser avaliado em futuras pesquisas é o antagonismo que as citocinas tumorais exercem em relação as citocinas produzidas pelas células imunitárias, resultado que também foi observado por Carmona et al (2023) para as citocinas IL6 e TGF-B1 numa pesquisa complementar.

A identificação de uma alta expressão de CXCL8 possui relevância clínica e biológica significativa, uma vez que esta citocina pró-inflamatória desempenha um papel crucial na regulação do sistema imunológico e na angiogênese. Sua expressão elevada sugere a possível participação de processos inflamatórios e angiogênicos no desenvolvimento e progressão desse tumor canino.

A associação entre a expressão elevada de CXCL8 e determinadas características clínicas em TVT pode fornecer insights valiosos para a compreensão da biologia tumoral, orientando estratégias terapêuticas que visem modular essas vias. Esse achado não apenas contribui para o entendimento dos tumores caninos, mas também destaca a importância de investigar a função específica de CXCL8, abrindo perspectivas promissoras para aplicações médicas no âmbito humano.

Revelar a função distintiva de CXCL8 na Netose não apenas amplia a compreensão da biologia dos tumores, mas também destaca seu potencial como alvo

terapêutico. Explorar mais a fundo essa relação não apenas promete avanços no tratamento de Tumores Venéreos Transmissíveis (TVT), mas também abre novas perspectivas na gestão de doenças humanas onde CXCL8 e mecanismos como a netose e angiogênese desempenham funções fundamentais.

Esse conhecimento poderia pavimentar o caminho para o desenvolvimento de terapias inovadoras que modulem especificamente o CXCL8, oferecendo possibilidades de tratamento não apenas para o TVT, mas também para condições médicas humanas relacionadas a processos inflamatórios e respostas imunológicas. Além disso, TVT poderia emergir como valioso modelo experimental, proporcionando uma plataforma única para estudar e desenvolver terapias tanto no âmbito veterinário quanto na medicina humana.

8. Conclusão

A mudança de posição observada nos códons avaliados pode indicar que em sua evolução o TVT desenvolveu uma estratégia diferente da humana para driblar os mecanismos de apoptose mediados pelo *TP53*.

A preservação da sequência de aminoácidos no segmento de interesse do gene *TP53* nos espécimes de estudo e nos controles sem neoplasia sugere que a estrutura do gene nos 4 pontos de união ao DNA avaliados não apresenta alterações. Esse achado indica que a progressão tumoral não depende do *TP53* e poderia ser explicada pelo entendimento dos mecanismos de evasão e modulação do sistema imunológico, os quais incluem a capacidade de secreção de citocinas e fatores de crescimento, além da capacidade de regular a diferenciação das células imunitárias e as células estromais.

A descoberta de uma mutação sinônima no polimorfismo de um único nucleotídeo em TVT, que não compromete a sequência de aminoácidos nos domínios de ligação ao DNA, juntamente com a baixa expressão de *P53* nas amostras avaliadas, sugere que essa mutação compromete a estrutura ou a quantidade da proteína codificada. No entanto, são necessários estudos futuros para avaliar a estrutura dessa proteína e confirmar essa nova hipótese.

As características de sinergismo, antagonismo, redundância e plasticidade de CXCL8 são mecanismos-chave na progressão desta neoplasia. A alta expressão desta

citocina, juntamente com achados de transcriptômica previamente descritos, tornam este tumor um potencial modelo para o estudo da indução de Netose, bem como um modelo *in vitro* para a avaliação de tratamentos de imunoterapia anti-IL8.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA*

- Abbas F, El Kossi M, Shaheen IS, Sharma A, Halawa A. Post-transplantation lymphoproliferative disorders: current concepts and future therapeutic approaches. *World J Transplant.* (2020) 10(2):29–46. doi: 10.5500/wjt.v10.i2.29
- Adams VJ, Evans KM, Sampson J, Wood JL. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *J Small Anim Pract.* 2010;51(10):512-524. doi:10.1111/j.1748-5827.2010.00974.x
- Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol.* 2013;4:190. Published 2013 Jul 11. doi:10.3389/fimmu.2013.00190
- Ahlers, Jeffrey & Belyakov, Igor. (2009). Memories that last forever: Strategies for optimizing vaccine T-cell memory. *Blood.* 115. 1678-89. doi:10.1182/blood-2009-06-227546.
- Ahrim Youn, Richard Simon, Identifying cancer driver genes in tumor genome sequencing studies, *Bioinformatics*, Volume 27, Issue 2, 15 January 2011, Pages 175–181, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq630>
- Akkoc A, Nak D, Demirer A, Şimşek G. Immunocharacterization of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in canine transmissible venereal tumors. *Biotech Histochem.* 2017;92(2):100-106. doi:10.1080/10520295.2016.1259500
- Alzate JM, Montoya-Florez LM, Pérez JE, Rocha NS, Pedraza-Ordóñez FJ. The role of the multi-drug resistance 1, *p53*, b cell lymphoma 2, and bcl 2-associated X genes in the biologic behavior and chemotherapeutic resistance of canine transmissible venereal tumors. *Vet Clin Pathol.* 2019;48(4):730-739. doi:10.1111/vcp.12805
- Amaral AS (2005). Transmissible canine venereal tumor: critérios cytological de malignidade e characterization cytomorphological correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA. (PhD thesis, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu).
- Amaral, A.S., Gaspar, L.F.J., Bassani-Silva, S. and Rocha, N.S. (2004) Cytological Diagnosis of Transmissible Venereal Tumor in the Region of Botucatu, Brazil (Descriptive Study: 1994 to 2003). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99, 167-171.
- Baez-Ortega A, Gori K, Strakova A, et al. Somatic evolution and global expansion of an ancient transmissible cancer lineage. *Science.* 2019;365(6452):eaau9923. doi:10.1126/science.aau9923
- Balasundaram A, Doss CGP. Unraveling the Structural Changes in the DNA-Binding Region of Tumor Protein *p53* (*TP53*) upon Hotspot Mutation *p53* Arg248 by Comparative Computational Approach. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022; 23(24):15499. <https://doi.org/10.3390/ijms232415499>
- Ballesterio Fêo H, Montoya Flórez L, Yamatogi RS, et al. Does the tumour microenvironment alter tumorigenesis and clinical response in transmissible venereal tumour in dogs? *Vet Comp Oncol.* 2018;16(3):370-378. doi:10.1111/vco.12388
- Ballesteros, F.H.; Montoya, L.M.; Yamatogi, R.S.; Duzannski, A. P.; Araújo, J.P.; Oliveira, R.A.; Rocha, N.S. Does genetic alterations alter tumorigenesis in transmissible venereal tumor in dogs? *Cienc Rural*, in press, 2020. doi.org/10.1590/0103-8478cr20200082
- Barozzi P, Luppi M, Facchetti F, et al. Post-transplant Kaposi sarcoma originates from the seeding of donor-derived progenitors [published correction appears in *Nat Med.* 2003 Jul;9(7):975]. *Nat Med.* 2003;9(5):554-561. doi:10.1038/nm862

*ASSOCIACAO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS. NBR 10520/2023.

- Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1825(1):29-36. doi:10.1016/j.bbcan.2011.10.001
- Belov K. Contagious cancer: lessons from the devil and the dog. *Bioessays*. 2012;34(4):285-292. doi:10.1002/bies.201100161
- Bendrik C, Dabrosin C. Estradiol increases IL-8 secretion of normal human breast tissue and breast cancer *in vivo*. *J Immunol*. 2009;182(1):371-378. doi:10.4049/jimmunol.182.1.371
- Bièche I, Chavey C, Andrieu C, et al. CXC chemokines located in the 4q21 region are up-regulated in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(4):1039-1052. doi:10.1677/erc.1.01301
- Bode, A., Dong, Z. Cancer prevention research — then and now. *Nat Rev Cancer* 9, 508–516 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrc2646>
- Boettcher S, Miller PG, Sharma R, et al. A dominant-negative effect drives selection of *TP53* missense mutations in myeloid malignancies. *Science*. 2019;365(6453):599-604. doi:10.1126/science.aax3649
- Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*. 2005;120(3):303-313. doi:10.1016/j.cell.2004.12.018
- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 68, p. 394–424, 2018. doi: 10.3322/caac.21492
- Brosh, R., Rotter, V. When mutants gain new powers: news from the mutant *p53* field. *Nat Rev Cancer* 9, 701–713 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrc2693>
- Bullock, A. N., Henckel, J., & Fersht, A. R. (2000). Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant *p53* core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene*, 19(10), 1245-1256.
- Bullock, A., Henckel, J. & Fersht, A. Análisis cuantitativo del plegamiento residual y la unión del ADN en el dominio central *p53* mutante: definición de estados mutantes para el rescate en la terapia del cáncer. *Oncogen* 19 , 1245–1256 (2000). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203434>
- Bykov, V., Eriksson, S., Bianchi, J. et al. Targeting mutant *p53* for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 18, 89–102 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.109>
- Cambier S, Gouwy M, Proost P. The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. *Cell Mol Immunol*. 2023;20(3):217-251. doi:10.1038/s41423-023-00974-6
- Casteleyn C, Sleenckx N, De Spiegelaere W, Heindryckx F, Coulon S, Van Steenkiste C. New therapeutic targets in veterinary oncology: man and dog definitely are best friends. *Vet J*. 2013;195(1):6-7. doi:10.1016/j.tvjl.2012.06.011
- Chaffer CL, Weinberg RA. How does multistep tumorigenesis really proceed?. *Cancer Discov*. 2015;5(1):22-24. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0788
- Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):R15. doi:10.1186/bcr1648
- Chiang HC, Liao AT, Jan TR, et al. Gene-expression profiling to identify genes related to spontaneous tumor regression in a canine cancer model. *Vet Immunol Immunopathol*. 2013;151(3-4):207-216. doi:10.1016/j.vetimm.2012.11.009
- Chin, K.-V., Ueda, K., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1992). Modulation of Activity of the Promoter

of the Human MDR 1 Gene by Ras and *P53*. *Science* 255, 459–462. doi:10.1126/science.1346476

Choi YK, Kim CJ. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and *p53* gene in canine transmissible venereal tumor. *J Vet Sci.* 2002;3(4):285-292.

Chou PC, Chuang TF, Jan TR, et al. Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;130(1-2):25-34. doi:10.1016/j.vetimm.2009.01.002

Chow MT, Möller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(1):23-32. doi:10.1016/j.semcancer.2011.12.004

Chung IF, Chen CY, Su SC, et al. DriverDBv2: a database for human cancer driver gene research. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D975-D979. doi:10.1093/nar/gkv1314

Crossin KL, Krushel LA. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn.* 2000 Jun;218(2):260-79. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<260::AID-DVDY3>3.0.CO;2-9. PMID: 10842356.

Davies, O., Szladovits, B., Polton, G., Garden, O. A., Leo, C., & Lara-Garcia, A. (2018). Prognostic significance of clinical presentation, induction and rescue treatment in 42 cases of canine centroblastic diffuse large B-cell multicentric lymphoma in the United Kingdom. *Veterinary and comparative oncology*, 16(2), 276–287. <https://doi.org/10.1111/vco.12378>

de León Joel, Pareja Arturo. Inmunología del cáncer I: bases moleculares y celulares de la respuesta inmune antitumoral. *Horiz. Med.* 2018 Jul [citado 2022 Nov 29] ; 18(3): 80-89. Doi: <http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n3.11>.

Debray D, Baudouin V, Lacaille F, Charbit M, Rivet C, Harambat J, et al. De novo malignancy after solid organ transplantation in children. *Transplant Proc.* (2009) 41(2):674–5. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.12.020

Decker B, Davis BW, Rimbault M, 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. doi:10.1101/gr.190314.115

Devarajan P, Johnston JJ, Ginsberg SS, Van Wart HE, Berliner N. Structure and expression of neutrophil gelatinase cDNA. Identity with type IV collagenase from HT1080 cells. *J Biol Chem.* 1992;267(35):25228-25232.

Dharnidharka VR, Sullivan EK, Stablein DM, Tejani AH, Harmon WE. Risk factors for posttransplant lymphoproliferative disorder (ptld) in pediatric kidney transplantation: a report of the north American pediatric renal transplant cooperative study (NAPRTCS)1. *Transplantation.* (2001) 71(8):1065–8. doi: 10.1097/00007890-200104270-00010

Do Amaral, Anne Santos et al. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. *Revista Portuguesa de ciências veterinárias*, v. 103, n. 8, p. 253-260, 2007.

Do JH, Oh SH, Song EJ, Chung JS, Kang CD, Lee EY. Treatment Outcome of Multidrug Resistance Related mRNA Expression and c-Jun-N-Terminal Kinase Activity in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Korean J Lab Med.* 2007 Aug;27(4):229-236. Korean. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2007.27.4.229>

Dong F, Qin X, Wang B, et al. ALKBH5 Facilitates Hypoxia-Induced Paraspeckle Assembly and IL8 Secretion to Generate an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* 2021;81(23):5876-5888. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-1456

Duncan, A.; Nogueira, D.; Ricks, R.; Kuo, H.-C.; Ravindranath, L.; Dobi, A.; Cullen, J.; Srivastava, S.; Castanha, GT; Petrovics, G.; e outros. Associação de polimorfismos de nucleotídeo único *TP53* com câncer de próstata em uma coorte de homens com diversidade racial. *Biomedicinas* 2023, 11, 1404. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051404>

Ehrlich P. The Collected Papers of Paul Ehrlich. Proc R Soc Med. 1957;50(3):210.

Eisenmann ED, Stromatt JC, Fobare S, Huang KM, Buelow DR, Orwick S, Jeon JY, Weber RH, Larsen B, Mims AS, Hertlein E, Byrd JC, Baker SD. TP-0903 está activo en modelos preclínicos de leucemia mieloide aguda con mutación/delección de *TP53*. Cánceres _ 2023; 15(1):29. <https://doi.org/10.3390/cancers15010029>

Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. Histopathology. 1992;20(6):479-489. doi:10.1111/j.1365-2559.1992.tb01032.x

Elmira Roshani Asl, Davoud Rostamzadeh, Pascal H.G. Duijf, Sahar Mafi, Behnaz Mansoori, Shirin Barati, William C. Cho, Behzad Mansoori, Mutant *P53* in the formation and progression of the tumor microenvironment: Friend or foe, Life Sciences, 315, 2023, 121361, ISSN 0024-3205, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121361>.

Farawela, H. M., M. El-Ghamrawy, M. S. Farhan, R. Soliman, S. M. Yousry, and H. A. Abdel Rahman, "Association between Duffy antigen receptor expression and disease severity in sickle cell disease patients", Hematology, vol. 21, issue 8: Taylor & Francis, pp. 474-479, 2016.

Flórez MM, Fêo HB, da Silva GN, et al. Cell cycle kinetics, apoptosis rates and gene expressions of MDR-1, *TP53*, BCL-2 and BAX in transmissible venereal tumour cells and their association with therapy response. Vet Comp Oncol. 2017;15(3):793-807. doi:10.1111/vco.12220

Fulchiero R., Amaral S. Doença linfoproliferativa pós-transplante após transplante renal pediátrico. Frontiers in Pediatrics.10-2022. DOI=10.3389/fped.2022.1087864

G. Rechavi, N. Katzir, B. Ramot, Kaposi's sarcoma among AIDS patients: Transmissible venereal tumour by cell engraftment?, Medical Hypotheses, 34, 4, 1991, 338-341, ISSN 0306-9877, [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(91\)90051-Y](https://doi.org/10.1016/0306-9877(91)90051-Y).

G.J. Graham, M. Locati, A. Mantovani, A. Rot, M. Thelen, The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors, Immunology Letters, Volume 145, Issues 1–2, 2012, Pages 30-38, ISSN 0165-2478, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.04.004>.

Ganguly B, Das U, Das AK. Canine transmissible venereal tumour: a review. Vet Comp Oncol. 2016;14(1):1-12. doi:10.1111/vco.12060

Gao Xiaolei, Zheng Xuan, Zhang Yixin, Dong Liying, Sun Liangjie, Zhao Na, Ding Chong, Ma Zeyun, Wang Yixiang. Deficient or R273H and R248W Mutations of *p53* Promote Chemoresistance to 5-FU via TCF21/CD44 Axis-Mediated Enhanced Stemness in Colorectal Carcinoma. Frontiers in Cell and Developmental Biology-9, 2022 DOI=10.3389/fcell.2021.788331. ISSN=2296-634X

Gaspar LFJ, Ferreira I, Colodel MM, Brandão CVS, Rocha NS. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: cell morphology and influence on P-glycoprotein expression. Turk J Vet Anim Sci 2010; 34: 447–454.

Goridis, C, and J F Brunet. "NCAM: structural diversity, function and regulation of expression." Seminars in cell biology vol. 3,3 (1992): 189-97. doi:10.1016/s1043-4682(10)80015-7

Gujam FJ, McMillan DC, Mohammed ZM, Edwards J, Going JJ. The relationship between tumour budding, the tumour microenvironment and survival in patients with invasive ductal breast cancer. Br J Cancer. Sep 29;113(7):1066-74. doi: 10.1038/bjc.2015.287. 2015.

Gujam FJA, Edwards J, Mohammed ZMA, Going JJ, McMillan DC. The relationship between the tumour stroma percentage, clinicopathological characteristics and outcome in patients with operable ductal breast cancer. Br J Cancer. Jul 8;111(1):157-65. doi: 10.1038/bjc.2014.279, 2014

Hainaut P, Pfeifer GP. Somatic *TP53* Mutations in the Era of Genome Sequencing. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6(11):a026179. Published 2016 Nov 1. doi:10.1101/cshperspect.a026179

- Hanel, W., Marchenko, N., Xu, S., Xiaofeng Yu, S., Weng, W., & Moll, U. (2013). Two hot spot mutant *p53* mouse models display differential gain of function in tumorigenesis. *Cell Death & Differentiation*, 20(7), 898-909.
- Hayes HM Jr, Biggar RJ, Pickle LW, Hoover R, Toft JD 2nd. Canine transmissible venereal tumor: a model for Kaposi's sarcoma?. *Am J Epidemiol.* 1983;117(1):108-109. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a113505
- Hlatky L, Hahnfeldt P. Beyond the cancer cell: progression-level determinants highlight the multiscale nature of carcinogenesis risk. *Cancer Res.* 2014;74(3):659-664. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2508
- Ho MM, Hogge DE, Ling V. MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 2008;36(4):433-442. doi:10.1016/j.exphem.2007.11.014
- Hornblum AM. They were cheap and available: prisoners as research subjects in twentieth century America. *BMJ.* 1997;315(7120):1437-1441. doi:10.1136/bmj.315.7120.1437
- Hsiao YW, Liao KW, Chung TF, Liu CH, Hsu CD, Chu RM. Interactions of host IL-6 and IFN-gamma and cancer-derived TGF-beta1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(7):1091-1104. doi:10.1007/s00262-007-0446-5
- Hsiao YW, Liao KW, Hung SW, Chu RM. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;87(1-2):19-27. doi:10.1016/s0165-2427(02)00026-0
- Hsiao YW, Liao KW, Hung SW, Chu RM. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;87(1-2):19-27. doi:10.1016/s0165-2427(02)00026-0
- Huxley-Jones J, Pinney JW, Archer J, Robertson DL, Boot-Handford RP. Back to basics--how the evolution of the extracellular matrix underpinned vertebrate evolution. *Int J Exp Pathol.* 2009;90(2):95-100. doi:10.1111/j.1365-2613.2008.00637.x
- Inca. Incidência de cancer no Brasil – Estimativa 2016. Acesso em: 22 jul. 2020. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>>.
- J.-M. Schwartzman, P.H. Duijf, R. Sotillo, C. Coker, R. Benezra. Mad2 is a critical mediator of the chromosome instability observed upon Rb and *p53* pathway inhibition. *Cancer Cell*, 19 (2011), pp. 701-714. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.04.017>
- Jenkins L, Jungwirth U, Avgustinova A, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Suppress CD8+ T-cell Infiltration and Confer Resistance to Immune-Checkpoint Blockade. *Cancer Res.* 2022;82(16):2904-2917. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-4141
- Jimbo N, Ohbayashi C, Fujii T, Takeda M, Mitsui S, Tsukamoto R, Tanaka Y, Itoh T, Maniwa Y. Implication of cytoplasmic *p53* expression in pulmonary neuroendocrine carcinoma using next-generation sequencing analysis. *Histopathology.* 2024 Jan;84(2):336-342. doi: 10.1111/his.15059. Epub 2023 Oct 10. PMID: 37814580.
- Joerger, A. C., & Fersht, A. R. (2007). Structural biology of the tumor suppressor *p53* and cancer-associated mutants. *Advances in cancer research*, 97, 1-23.
- Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(9):4997-5002. doi:10.1073/pnas.95.9.4997
- Katzir N, Rechavi G, Cohen JB, et al. "Retroposon" insertion into the cellular oncogene *c-myc* in canine transmissible venereal tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(4):1054-1058. doi:10.1073/pnas.82.4.1054

Ke, CH., Tomiyasu, H., Lin, YL. et al. El tumor venéreo transmisible canino establecido en ratones inmunodeficientes reprograma los perfiles de expresión génica asociados con un microambiente tumoral favorable para permitir la malignidad del cáncer. *BMC Vet Res* 18 , 4 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03093-4>

Kennedy, M.C., Lowe, S.W. Mutant *p53*: it's not all one and the same. *Cell Death Differ* 29, 983–987 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00989-y>

Khadiullina R, Mirgayazova R, Davletshin D, Khusainova E, Chasov V, Bulatov E. Evaluación de la estabilidad térmica de las proteínas mutantes *p53* mediante fluorimetría diferencial de barrido. *vida* _ 2023; 13(1):31. <https://doi.org/10.3390/life13010031>

Kim TM, Yang IS, Seung BJ, et al. Cross-species oncogenic signatures of breast cancer in canine mammary tumors. *Nat Commun.* 2020;11(1):3616. Published 2020 Jul 17. doi:10.1038/s41467-020-17458-0 (Tae Min)

Kitchlu A, Dixon S, Dirk JS, Chanchlani R, Vasilevska-Ristovska J, Borges K, et al. Elevated risk of cancer after solid organ transplant in childhood: a population-based cohort study. *Transplantation.* (2019) 103(3):588–96. doi: 10.1097/TP.0000000000002378

Kumaraguruparan R, Prathiba D, Nagini S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, *p53*, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science.* 2006 Oct;81(2):218-224. DOI: 10.1016/j.rvsc.2005.08.002.

Lee, J. G., Ahn, J. H., Jin Kim, T., Ho Lee, J., & Choi, J. H. (2015). Mutant *p53* promotes ovarian cancer cell adhesion to mesothelial cells via integrin $\beta 4$ and Akt signals. *Scientific reports*, 5(1), 1-12.

Liao KW, Hung SW, Hsiao YW, Bennett M, Chu RM. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;92(3-4):149-162. doi:10.1016/s0165-2427(03)00032-1

Liu Q, Li A, Tian Y, et al. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;31:61-71. doi:10.1016/j.cytogfr.2016.08.002

Ma X, Yu H. Global burden of cancer. *Yale J Biol Med.* 2006;79(3-4):85-94.

Manning J, Indrova M, Lubyova B, et al. Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated tumours. *Immunology.* 2008;123(2):218-227. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02689.x

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):436-444. doi:10.1038/nature07205

Mantovani A, Allavena P, Sica A. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer.* 2004;40(11):1660-1667. doi:10.1016/j.ejca.2004.03.016

Mascarenhas, Mariana B. et al. Immunohistochemical study of genital and extragenital forms of canine transmissible venereal tumor in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* [online]. 2014, v. 34, n. 3 [Accessed 29 November 2022], pp. 250-254. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000300009>

Mayo, L. D., & Donner, D. B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11598-11603.

Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. Nuevos conocimientos sobre la immunoedición del cáncer y sus tres fases componentes: eliminación, equilibrio y escape. *Curr Opin Immunol.* 2014; 27 : 16-25. doi: 10.1016 / j.coi.2014.01.004.

- Moore AE, Rhoads CP, Southam CM. Homotransplantation of human cell lines. *Science*. 1957;125(3239):158-160. doi:10.1126/science.125.3239.158
- Mukaratirwa, S.; Gruys, E. Canine transmissible venereal tumour: Cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. *A review. Vet Q.* 25, n.3, p.101-111, 2003.
- Murchison EP, Wedge DC, Alexandrov LB, et al. Transmissible [corrected] dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage [published correction appears in *Science*. 2014 Feb 14;343(6172):730]. *Science*. 2014;343(6169):437-440. doi:10.1126/science.1247167
- Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss RA. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*. 2006;126(3):477-487. doi:10.1016/j.cell.2006.05.051
- Murphy G, Gavrilovic J. Proteolysis and cell migration: creating a path?. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11(5):614-621. doi:10.1016/s0955-0674(99)00022-8
- Opdenakker G, Masure S, Grillet B, Van Damme J. Cytokine-mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis. *Lymphokine Cytokine Res*. 1991;10(4):317-324.
- Parker, H.G.; Ostrander, E.A. Hiding in plain view—an ancient dog in the modern world. *Sci*. 343, p.376-378, 2014.
- Passos, G. A.; Bertrand, J. C. Projeto Transcriptoma. Análise da Expressão Gênica em Larga Escala Usando DNA – Arrays. *Biotec Ciên Desenv*. P. 34-37, 2010
- Pearse, Anne-Maree & Swift, Kate & Hodson, Pamela & Hua, Bobby & McCallum, Hamish & Pyecroft, Stephen & Taylor, Robyn & Eldridge, Mark & Belov, Katherine. (2012). Evolution in a transmissible cancer: A study of the chromosomal changes in devil facial tumor (DFT) as it spreads through the wild Tasmanian devil population. *Cancer genetics*. 205. 101-12. doi: 10.1016/j.cancergen.2011.12.001.
- Penet, M.F.; Krishnamachary, B.; Chen, Z.; Jin, J.; Bhujwalla, Z.M. Molecular imaging of the tumor microenvironment for precision medicine and theranostics. *Adv Cancer Res*. 124, p.235–56, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-411638-2.00007-0
- Peng, K., Zhang, Y., Liu, D. et al. MMP2 es un biomarcador relacionado con la inmunoterapia y se correlaciona con el infiltrado de fibroblastos asociado al cáncer en el melanoma. *Cancer Cell Int* 23 , 26 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02862-5>
- Penn I. Cancers complicating organ transplantation. *N Engl J Med*. (1990) 323(25):1767–9. doi: 10.1056/NEJM199012203232510
- Penn I. Tumors arising in organ transplant recipients. *Adv Cancer Res*. 1978;28:31-61. doi:10.1016/s0065-230x(08)60645-4
- Pérez, J.; Day, M.J.; Mozos, E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Vet Immunol Immunopathol*. 64, n.2, p.133-147, 1998.
- Petrara MR, Giunco S, Serraino D, Dolcetti R, De Rossi A. Post-transplant lymphoproliferative disorders: from epidemiology to pathogenesis-driven treatment. *Cancer Lett*. (2015) 369(1):37–44. doi: 10.1016/j.canlet.2015.08.007
- Pukkila MJ, Kumpulainen EJ, Virtaniemi JA, Johansson RT, Halonen PM, Kellokoski JK, Kosunen AS, Nuutinen J, Kosma VM. Nuclear and cytoplasmic p53 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic implications. *Head Neck*. 2002 Aug;24(8):784-91. doi: 10.1002/hed.10124. PMID: 12203805.
- Ramírez RR, García JCJA, Nevárez GAM, et al. Transmissible venereal tumor with metastasis to a spleen hemangioma in a bitch. *Vet Mex*. 2010;41(4):305-310.
- Rawlings NG, Simko E, Bebachuk T, Caldwell SJ, Singh B. Localization of integrin alpha(v)beta3 and

vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in cutaneous and oral melanomas of dog. *Histol Histopathol.* 2003;18(3):819-826. doi:10.14670/HH-18.819

Rebbeck, C.A.; Thomas, R.; Breen, M.; Leroi, A.M.; Burt, A. Origins and evolution of a transmissible cancer. *Evolution.* 63, n.9, p.2340-2349, 2009.

Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity.* 2008;28(4):546-558. doi:10.1016/j.immuni.2008.02.017

Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10(5):593-619. doi:10.1586/1744666X.2014.894886

Sánchez Jiménez, J., Gómez Ángel, D., & Galera Ruiz, H.. (2003). Valor pronóstico del parámetro inmunohistoquímico *p53* en los estadios I y II del carcinoma epidermoide de lengua móvil. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, 25(5), 280-287. Recuperado en 29 de noviembre de 2022, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-05582003000500005&lng=es&tlng=es.

Santos, F.G.A.; Vasconcelos, A.C.; Nunes, J.E.S.; Cassali, G.D.; Paixao, T.A.; Moro, L. The canine Transmissible Venereal Tumor – General Aspects and Molecular Approach (Review). *Biosci J.* 21, p. 41-53, 2005.

Schober T, Framke T, Kreipe H, Schulz TF, Großhennig A, Hussein K, et al. Characteristics of early and late PTLD development in pediatric solid organ transplant recipients. *Transplantation.* (2013) 95(1):240–6. doi: 10.1097/TP.0b013e318277e344

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011 Mar 25;331(6024):1565-70. doi: 10.1126/science.1203486. PMID: 21436444.

Schulz-Heddergott R, Stark N, Edmunds SJ, Li J, Conradi LC, Bohnenberger H, et al. Therapeutic Ablation of Gain-of-Function Mutant *P53* in Colorectal Cancer Inhibits Stat3-Mediated Tumor Growth and Invasion. *Cancer Cell* (2018) 34(2):298–314.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2018.07.004

Sharp N. Mutations matter even if proteins stay the same. *Nature.* 2022 Jun;606(7915):657-659. doi: 10.1038/d41586-022-01091-6. PMID: 35676345.

Shen X, Song S, Li C, Zhang J. Synonymous mutations in representative yeast genes are mostly strongly non-neutral. *Nature.* 2022 Jun;606(7915):725-731. doi: 10.1038/s41586-022-04823-w. Epub 2022 Jun 8. PMID: 35676473; PMCID: PMC9650438.

Sherborne AL, Lavergne V, Yu K, Lee L, Davidson PR, Mazor T, Smirnoff IV, Horvai AE, Loh M, DuBois SG, Goldsby RE, Neglia JP, Hammond S, Robison LL, Wustrack R, Costello JF, Nakamura AO, Shannon KM, Bhatia S, Nakamura JL. Somatic and Germline *TP53* Alterations in Second Malignant Neoplasms from Pediatric Cancer Survivors. *Clin Cancer Res.* 2017 Apr 1;23(7):1852-1861. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0610. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27683180; PMCID: PMC5570538.

Siddle HV, Kaufman J. A tale of two tumours: comparison of the immune escape strategies of contagious cancers. *Mol Immunol.* 2013;55(2):190-193. doi:10.1016/j.molimm.2012.10.017

Siddle HV, Kaufman J. Immunology of naturally transmissible tumours. *Immunology.* 2015;144(1):11-20. doi:10.1111/imm.12377

Sizova, D.; Charbaut, E.; Delalande, F.; Poirier, F.; High, A.A.; Parker, F; Dorsselaer, A.V.; Duchesne, M.; Diu-Hercend, A. Proteomics analysis of brain tissue from an Alzheimer's disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Neurobiology of Aging.* 28, p.357-370, 2007

Slapak EJ, Duitman J, Tekin C, Bijlsma MF, Spek CA. Matrix Metalloproteases in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Key Drivers of Disease Progression?. *Biology (Basel).* 2020;9(4):80. Published 2020 Apr 18. doi:10.3390/biology9040080

Sofia Karachrysafi, Polyxeni Georgiou, Dimitrios Kavvadas, Foteini Papafotiou, Sofia Isaakidou, Ioannis E. Grammatikakis & Theodora Papamitsou (2023) Immunohistochemical study of MMP-2, MMP-9, EGFR and IL-8 in decidual and trophoblastic specimens of recurrent pregnancy loss cases, The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 36:1, DOI: 10.1080/14767058.2023.2218523

Southam CM. Homotransplantation of human cell lines. Bull N Y Acad Med. 1958;34(6):416-423.

Stockmann D, Ferrari HF, Andrade AL, Cardoso TC, Luvizotto MC. Detection of the tumour suppressor gene *TP53* and expression of *p53*, Bcl-2 and p63 proteins in canine transmissible venereal tumour. Vet Comp Oncol. 2011;9(4):251-259. doi:10.1111/j.1476-5829.2010.00260.x

Strakova A, Ní Leathlobhair M, Wang GD, et al. Mitochondrial genetic diversity, selection and recombination in a canine transmissible cancer. Elife. 2016;5:e14552. Published 2016 May 17. doi:10.7554/eLife.14552

Stromberg, P.C.; Meuten, D.J. Trimming Tumors for Diagnosis and Prognosis. In: Meuten DJ. Tumors in Domestic Animals. Quinta Edição. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc. p. 27-43, 2017.

Su S, Chen J, Yao H, et al. CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. Cell. 2018;172(4):841-856.e16. doi:10.1016/j.cell.2018.01.009

Sullu Y, Demirag GG, Yildirim A, Karagoz F, Kandemir B. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. Pathol Res Pract. 2011;207(12):747-753. doi:10.1016/j.prp.2011.09.010

Tang, Y., Yao, Y., & Wei, G. (2021). Unraveling the allosteric mechanism of four cancer-related mutations in the disruption of *p53*-DNA interaction. The Journal of Physical Chemistry B, 125(36), 10138-10148.

Taussing. M. J. Neoplasia: Processes in Pathology and Microbiology. Edit. Blackwell Scientific Publications. Second edition. Pag. 689 – 809. 1989.

Teijeira Á, Garasa S, Gato M, et al. CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Agonists Produced by Tumors Induce Neutrophil Extracellular Traps that Interfere with Immune Cytotoxicity. Immunity. 2020;52(5):856-871.e8. doi:10.1016/j.immuni.2020.03.001

Templeton NS, Stetler-Stevenson WG. Identification of a basal promoter for the human Mr 72,000 type IV 636 Role of IL 8 and MMP 2 and 9 in breast cancer collagenase gene and enhanced expression in a highly metastatic cell line. Cancer Res; 51: 6190-3. 1991.

Thompson LR, Oliveira TG, Hermann ER, Chohanadisai W, Clarke SL, Montgomery MR. Distintos tipos de mutación de *TP53* exhiben una mayor sensibilidad a la ferroptosis independientemente de los cambios en la actividad de la proteína reguladora del hierro. Revista Internacional de Ciencias Moleculares. 2020; 21(18):6751. <https://doi.org/10.3390/ijms21186751>

Tiwari KP, Bhaiyat MI, Chikweto A, Inga A, Sharma RN and Pawaiya RVS (2014) Immunohistochemical detection of *p53* tumor suppressor protein in round cell tumors of dogs in grenada, West Indies. Adv. Anim. Vet. Sci. 2 (3S): 23 – 27. <http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2014/2.3s.23.27>

Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. Science. 2015 Jan 2;347(6217):78-81. doi: 10.1126/science.1260825.

Yasuda, K., Kato, S., Sakamoto, Y., Watanabe, G., Mashiko, S., Sato, A., Kakudo, Y., Ishioka, C."Induction of apoptosis by cytoplasmically localized wild-type *p53* and the S121F mutant super *p53*". Oncology Letters 3.5 (2012): 978-982.

Vázquez-Mota, N., Simón-Martínez, J., Córdova-Alarcon, E. et al. The T963C mutation of *TP53* gene does not participate in the clonal origin of canine TVT. Vet Res Commun **32**, 187–191 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11259-007-9013-y>

Vilcek, J., & Feldmann, M. (2004). Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. Trends in pharmacological sciences, 25(4), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.02.011>

Vineis P, Wild CP. Global cancer patterns: causes and prevention. Lancet. 2014 Feb 8;383(9916):549-57. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62224-2.

Wang, Y. H., and Scadden, D. T. (2015). Harnessing the Apoptotic Programs in Cancer Stem-like Cells. EMBO Rep. 16, 1084–1098. doi:10.15252/embr.201439675

Wasif N, Maggard MA, Ko CY, Giuliano AE. Invasive lobular vs. ductal breast cancer: a stage-matched comparison of outcomes. Ann Surg Oncol. 2010;17(7):1862-1869. doi:10.1245/s10434-010-0953-z

Wculek SK, Malanchi I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. Nature. 2015 Dec;528(7582):413-417. DOI: 10.1038/nature16140.

Welsh JS. Contagious cancer. Oncologist. 2011;16(1):1-4. doi:10.1634/theoncologist.2010-0301

Xie K. Interleucina-8 y biología del cáncer humano. Factor de crecimiento de citoquinas Rev. 2001; 12 : 375–391. doi: 10.1016 / S1359-6101 (01) 00016-8

Yan Stein, Ronit Aloni-Grinstein, Varda Rotter, Mutant *p53*: un actor potencial en la configuración de la diafonía tumor-estroma, Journal of Molecular Cell Biology , volumen 11, número 7, julio de 2019, páginas 600–604, <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz071>

Yan Stein, Ronit Aloni-Grinstein, Varda Rotter, Mutant *p53*—a potential player in shaping the tumor–stroma crosstalk, Journal of Molecular Cell Biology, Volume 11, Issue 7, July 2019, Pages 600–604, <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz071>

Zhou, X., Hao, Q., and Lu, H. (2019). Mutant *P53* in Cancer Therapy-The Barrier or the Path. J. Mol. Cel Biol 11, 293–305. doi:10.1093/jmcb/mjy072

CAPÍTULO 2

Artigo científico

7. Artigo científico

Mutações sinônimas de *TP53* e expressão de *CXCL8* como mecanismos de evasão do apoptose e imunovigilância no Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVT).

González-Zambrano^{1*}, C.M.; Flórez, L.M.M²; Dinau, F.C.³; Celis, E.L.H⁴; Araújo Jr, J. P.⁵; Pedraza-Ordoñez F⁶; Rogério Antonio de Oliveira⁷; Rocha, N.S⁸.

^{1, 8} Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada (LPIC), Faculdade de medicina veterinária e zootecnia (FMVZ), Departamento de Patologia de FMB, Universidade estadual paulista (UNESP), Botucatu, S.P, Brasil.

² Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Nacional. Bogotá, Colômbia

³ Laboratório de Patologia Veterinária, Faculdade de medicina veterinária e zootecnia (FMVZ), Departamento de Clínica Veterinária de FMVZ, Universidade estadual paulista (UNESP), Botucatu, S.P, Brasil.

^{4,5} Laboratório de Virologia, Instituto de Biociências (IBTEC), Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade estadual paulista (UNESP). Botucatu, Brasil

⁶ Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Clínica Veterinária, Universidade de Caldas, Manizales, Colômbia.

⁷ Laboratório de Bioestatística, Instituto de Biociências, Departamento de Biodiversidade e Bioestatística,

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil.

*carlos.gonzalez-zambrano@unesp.br

RESUMO

Introdução. O TVT por sua natureza transmissível, utiliza mecanismos envolvidos na metástase, seu comportamento semelhante às neoplasias malignas, capacidade de iniciação, promoção e progressão é alvo de pesquisas por diversos autores. A expressão gênica diversa tem sido avaliada e correlacionada com seu comportamento. Nesta pesquisa, avalia-se as mutações nos domínios de Union ao DNA do gene *TP53* relacionada a expressão de *P53* e a expressão de *CXCL8*, bem como a interação delas no comportamento biológico. **Métodos.** Análise de mutações *TP53* via Sequenciamento Sanger. Análise Imuno-histoquímica da expressão de *P53* e *CXCL8*. **Resultado.** A sequência do *TP53*, exclui mutações não sinônimas. Mesmo assim o TVT apresenta polimorfismo em nucleotídeos que são aceitos como mutações sinônimas. A expressão de *CXCL8* ultrapassa 70%. **Discussão.** O gene *TP53* do TVT apresenta mutações sinônimas. Isso sugere que o tumor conseguiu evadir os mecanismos de apoptose, gerando afetação na transcrição da proteína *P53*. A expressão de *CXCL8* confirma a capacidade de modular as células imunológicas, angiogênese e escape imunológico. **Conclusão.** O TVT evade mecanismos de apoptose mediados pela proteína *P53* por meio de mutações sinônimas no *TP53*, além de alto potencial como modelo para o estudo da indução de Netose e evasão do sistema imunológico, assim como um ótimo modelo para avaliar tratamentos de imunoterapia anti-IL8.

Palavras-chave: TVT, Mutações, *TP53*, *P53*, *CXCL8*.

Tabelas

Tabela 1. Anticorpos primários utilizados na pesquisa

Anticorpo	Origem	Laboratorio	Diluição
Anti IL8 (ab84995)	Policlonal coelho	ABCAM	1:200
<i>P53</i> Protein (Dako Omnis) DO-7	Monoclonal Camundongo	Agilent	1:200

Tabela 2. Sequências de referência

Especie	Sequencia
Homo sapiens	NM_001407266 NM_001407265 NM_001407262
Canis lupus familiaris	KP279764 AF060514 KP279761

Tabela 3. *Primer*

Oligonucleotideo	Sequencia
TP53 P1 FORWARD	GGG ACA GCC AAG TCT GTT ACT T
TP53 P1 REVERSE	TTG TCT TGC TTG CTT ACC TCG

Conflito de Interesses

Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida sem a presença de quaisquer relações comerciais ou financeiras que possam ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

Contribuições dos Autores

Conceituação: Carlos Mario González Zambrano; Luis Mauricio Montoya Flórez; Noeme Sousa Rocha; Francisco Javier Pedraza Ordoñez. **Curadoria de Dados:** Carlos Mario González Zambrano; Fernando Carmona Dinau. **Análise Formal:** Eliana Hurtado Celis; Rogerio Antonio de Oliveira. **Aquisição de Financiamento:** Noeme Sousa Rocha. **Investigação:** Carlos Mario González Zambrano; Fernando Carmona Dinau; Eliana Hurtado Celis. **Metodologia:** Carlos Mario González Zambrano; Luís Mauricio Montoya Flórez; João Pessoa Araújo Junior; Noeme Sousa Rocha. **Administração do Projeto:** Luís Mauricio Montoya Flórez. **Recursos:** Noeme Sousa Rocha; João Pessoa Araújo Junior. **Software:** João Pessoa Araújo Junior; Rogerio Antonio de Oliveira; Eliana Hurtado Celis. **Supervisão:** Noeme Sousa Rocha. **Validação:** Noeme Sousa Rocha; Luis Mauricio Montoya Flórez; João Pessoa Araújo Junior. **Visualização:** Carlos Mario

González Zambrano; Luis Mauricio Montoya Flórez; Noeme Sousa Rocha. **Redação - Rascunho Original:** Carlos Mario González Zambrano. **Redação - Revisão & Edição:** Luis Mauricio Montoya Flórez; Noeme Sousa Rocha; Francisco Javier Pedraza Ordoñez

Perspectiva

A futura integração de novos marcadores por meio de Imunofenotipagem não apenas enriquecerá a compreensão do TVT, todavia oferecerá a visão completa dos mecanismos moleculares subjacentes. Permitirá exploração aprofundada da dinâmica celular, da resposta apoptótica e de outros processos cruciais ao desenvolvimento e progressão do TVT. Entretanto, para fortalecer ainda mais nossas conclusões e garantir a robustez dos resultados, é necessário considerar o aumento do número de amostras. Essa medida adicional fornecerá base sólida para generalizações e permitirá interpretação precisa dos resultados. Com a expansão do conjunto de dados, não apenas aprimorar a validade das observações, também aumentará a confiabilidade das correlações identificadas. Em última análise, essa abordagem fortalecerá a relevância clínica da pesquisa para futuras investigações e avanços na compreensão e tratamento do TVT.

Anexos

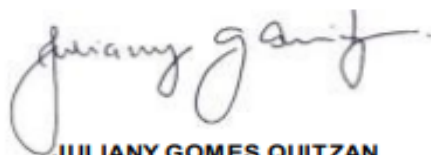
Anexo A. Atestado comissão de ética para uso de animais

ATESTADO

Atesto que o Projeto "Análises da expressão de P53, CXCL8 e das mutações de TP53 no tumor venéreo transmissível canino, relacionado ao comportamento biológico" **Protocolo CEUA 0117/2022**, a ser conduzido por CARLOS MARIO GONZALEZ ZAMBRANO, responsável/orientador Noeme Souza Rocha, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 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.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/07/2022 a 01/01/2024
Nome Comum / Espécie / Linhagem	//
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	AMOSTRAS CONSERVADAS EM PARAFINA E CONGELAÇÃO.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 08/06/2022



JULIANY GOMES QUITZAN
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Anexo B. Padronização da Avaliação Semiquantitativa

- **Condição da amostra:**

- Boa - Poucos (menos de 3) dobramentos e espaços vazios.
- Regular - Muitos dobramentos (maior que 3) e espaços vazios, porém é possível distinguir as células.
- Ruim - Dobramentos e espaços vazios não é possível distinguir as células.

- **Contagem das células com expressão do anticorpo:**

- Critério:
 - Avaliar 4 campos homogêneos em duplicata com a Obj. 40X. Contar 100 células em cada campo e fazer a média.

- **Intensidade da Coloração:**

- Avaliação em Obj. 4X-10X.
- Critérios:
 - Dividir o campo em 4 e contar em quantos quadrantes há marcação.
 - 0/+ (ausente), +1 (fraca), +2 (média/forte e 2/4 do campo), +3 (média/forte e 3/4 do campo) e +4 (média/forte e todo campo)

- **Distribuição do Antígeno (dividir em 4 quadrantes):**

- Critérios:
 - 3+: expressão nas células epiteliais, inflamatórias e fibroblastos.
 - 2+: expressão nas células de TVT e epiteliais.
 - 1+: somente expressão nas células de TVT.

Anexo C. Termo de parceria



TERMO DE PARCERIA ENVOLVENDO USO DE ANIMAIS

O Laboratório da patologia veterinária da universidade de caldas da Colômbia, vem por meio deste declarar a parceria no Projeto de Pesquisa intitulado "*Análises da expressão de p53, MMP2, CXCL8 e da mutação de TP53 em tumor venéreo transmissível canino relação com o comportamento biológico*", que será desenvolvido pelo pesquisador Carlos Mario Gonzalez-Zambrano, sob orientação de Noeme Sousa Rocha, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – FMVZ – UNESP.

O objetivo com o apoio da parceria é aumentar o numero de amostras (n) da pesquisa aprovada pela comissão de ética com o número 117/2022 e acatando as sugestões da banca da qualificação, a fim de aumentar o impacto da publicação da investigação, que será realizada a partir de tecido emblocado e material genético extraído (DNA), armazenado em repositório esclarecendo que não haverá contato direto com animais vivos.

Ainda, o Médico Veterinário Francisco Javier Pedraza-Ordoñez (Professor titular da Universidade de Caldas), responsável pelo acompanhamento dos animais na época que foram obtidas as amostras, certifica que estes cães foram mantidos sob condições adequadas de ética e bem estar animal no Biotério da nossa Faculdade.

(Em casos de animais de ONG/ Zoológico, favor solicitar que o Médico Veterinário responsável pelo local dê ciência à realização do projeto, quando este não for o responsável pelo termo de parceria).

Estamos cientes de que os resultados desse estudo poderão ser publicados em eventos e revistas científicas da área de interesse dos pesquisadores.

Botucatu, 06/09/2023

Pesquisador
Carlos Mário Gonzalez-Zambrano
Endereço: Rua Judith da Silva Vieira casa 79 R.
Caima
Telefone: +55(14)997521341
Email: carlos.gonzalez-zambrano@unesp.br

Responsável pela parceria
Prof. Dr. Francisco Pedraza-Ordoñez
E mail: fpedraza@ucaldas.edu.co

Orientador do projeto: Noeme Sousa Rocha
Endereço: Departamento de Patologia FMVZ,
Distrito de Rubiao Jr CEP: 18818-000
E mail: noeme.rocha@unesp.br

Anexo D. Resumo dos casos

CASO TVT	NOME	RAÇA	SEXO	IDADE (ANOS)	RESPOSTA A TERAPIA	FASE CLINICA
COL16200	GITANA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL16202	LUNA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL16260	CANELA 2	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL16261	LUCAS	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL16417	COKY	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL16418	CANELA 3	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL16264	MUÑECO	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL16581	YUNI	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL17074	KIRA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL17075	NENA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL17168	MANZANITA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL17325	LULU	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL17401	CALLEJERA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL17554	NEGRA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL17648	SEM NOME	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL17684	MONA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL17723	SASHA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
COL17732	CASALLO	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR206880	TERRA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR212125	PITOCO	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR212578	LUNA	RD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR213120	NINA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Parcial	Regressão
BR213404	NEGAO	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR213339	NINA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR214123	KIKO	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR214195	SIMBA	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR217085	BOB	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Regressão
BR215648	BETHOVEN	SRD	Macho	Mayor de 8	Completa	Progressão
BR216136	MARELO	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR216631	PIPOCA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Parcial	Progressão
BR217052	BENZE	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Resistente	Progressão
BR217407	SCOOPY	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR217405	TIGRAO	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR217370	BIDU	SRD	Macho	Mayor de 8	Completa	Progressão
BR217747	CHATOCA	RD	Femêa	Entre 2 e 8	Resistente	Progressão
BR217784	CHECHEL	SRD	Macho	Mayor de 8	Completa	Regressão
BR218434	DORI	RD	Femêa	Entre 2 e 8	Parcial	Progressão
BR201601	ZULI	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR201602	RUBIA	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR201603	SHEYD	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão

BR201604	SEM NOME	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR201607	SEM NOME	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR201605	SEM NOME	SRD	Femêa	Entre 2 e 8	Completa	Progressão
BR201606	SEM NOME	SRD	Macho	Entre 2 e 8	Completa	Progressão

Anexo E. Atividades realizadas durante o período de mestrado

- Trabalho apresentado no XXXIV Congresso de iniciação científica da UNESP ano 2022:** “Comportamento biológico do Tumor Venereo transmissível pelo exame citopatológico” por: Fernando Carmona Dinau, Carlos Mario González-Zambrani, Noeme Sousa Rocha, Luis Mauricio Montoya Flórez, Viiian Gisel Suares Arias, Pedro Pol Ximenes e Fernanda Barthelson carvalho de Moura
- Trabalho apresentado no XXXV Congresso de iniciação científica da UNESP ano 2023:** “Imunoexpressão de IL6, TGF-B1 e CD8+ sua relação com o comportamento biológico do Tumor Venéreo Transmissível canino” Por: Fernando Carmona Dinau, Carlos Mario González-Zambrano, Rogério Antonio de Oliveira, Luis Mauricio Montoya Flórez, Noeme Sousa rocha
- Artigo em processo de publicação:** “Utilidade e Repetibilidade dos Biomarcadores de Inflamação em abordagem sistêmico e citológico no Tumor Venéreo Transmissível Canino e sua Relação com o Comportamento Biológico” Por: Carlos Gonzalez-Zambrano; Fernando Carmona Dinau; Gabrielle Cristine da Silva³, est MV; Gabriella Costa Ribeiro⁴, MV, est MSc; Rogério Antonio de Oliveira, Estatístico; Mauricio Montoya Florez, Noeme Sousa Rocha
- Artigo em processo de Publicação:** “Understanding Canine Transmissible Venereal Tumor through its Transcriptional Profile” Por: Paula de Sanctis, Fernando C. Dinau, Carlos M. González-Zambrano, Mauricio Montoya-Flórez, João P. Araújo, Noeme Sousa R.