

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO – I.
EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA E CARACTERIZAÇÃO
GENOTÍPICA DE DLADQA-1 (MHC-II); II. ESTUDO IMUNO-
HISTOQUÍMICO DA RESPOSTA IMUNE LOCAL**

**Karina Ferreira de Castro
Médica Veterinária**

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO – I.
EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA E CARACTERIZAÇÃO
GENOTÍPICA DE DLADQA-1 (MHC-II); II. ESTUDO IMUNO-
HISTOQUÍMICO DA RESPOSTA IMUNE LOCAL**

**Karina Ferreira de Castro
Orientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária.

2015

C355t Castro, Karina Ferreira de
Tumor venéreo transmissível canino – I. Expressão gênica e proteica e caracterização genotípica de DLADQA-1 (MHC-II); Estudo imuno-histoquímico da resposta imune local / Karina Ferreira de Castro. – – Jaboticabal, 2015
xxi, 111 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientadora: Mirela Tinucci Costa

Banca examinadora: Rosângela Zacarias Machado, Marcos Rogério André, Noeme Sousa Rocha, Felipe Augusto Ruiz Sueiro
Bibliografia

1. Câncer. 2. DLADQA-1. 3. Hospedeiro. 4. MHC. 5. Transmissível. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO - I. EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE DLADQA-1 (MHC-II); II. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA RESPOSTA IMUNE LOCAL

AUTORA: KARINA FERREIRA DE CASTRO

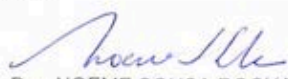
ORIENTADORA: Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. ROSÂNGELA ZACARIAS MACHADO
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. NOEME SOUSA ROCHA
Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu


Prof. Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO
VetPat - Laboratório de Patologia Veterinária / Campinas/SP

Data da realização: 20 de novembro de 2015.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KARINA FERREIRA DE CASTRO – Nascida em 13 de fevereiro de 1979, na cidade de Santos, SP. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL) – Espírito Santo do Pinhal/SP, em março de 1998, concluindo-o em dezembro de 2002. Realizou especialização (Residência Médica) em Clínica Médica de Pequenos Animais no Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB) – São João da Boa Vista/SP, no período de 2003 a 2005 e concluiu o curso de Pós Graduação *Lato Sensu* em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais na mesma instituição em 2006. Realizou Mestrado em Clínica Médica Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal no período de 2008 a 2010. Ingressou no curso de Doutorado em Clínica Médica Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal em 2011 sob a orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Realizou doutorado sanduiche na University of Cambridge/UK durante dez meses sob a supervisão da Dra. Elizabeth Proby Murchison. Desde março de 2005 atua como docente e médica veterinária no Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), São José do Rio Preto/SP, lecionando nas disciplinas de Semiologia, Clínica Médica de Pequenos Animais e Patologia Clínica. É presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIRP) da mesma instituição desde 2013 e subcoordenadora do Curso de Medicina Veterinária desde 2015.

VENCERÁS

*Não desanimes.
Persiste mais um tanto.
Não cultives pessimismo.
Centraliza-te no bem a fazer.
Esquece as sugestões do medo destrutivo.
Segue adiante, mesmo varando a sombra dos próprios erros.
Avança ainda que seja por entre lágrimas.
Trabalha constantemente.
Edifica sempre.
Não consintas que o gelo do desencanto te entorpeça o coração.
Não te impressiones nas dificuldades.
Convence-te de que a vitória espiritual é construção para o dia-a-dia.
Não desistas da paciência.
Não creias em realizações sem esforço.
Silêncio para a injúria.
Olvido para o mal.
Perdão às ofensas.
Recorda que os agressores são doentes.
Não permitas que os irmãos desequilibrados te destruam o trabalho ou te apaguem a
esperança.
Não menosprezes o dever que a consciência te impõe.
Se te enganaste em algum trecho do caminho, reajusta a própria visão e procura o rumo
certo.
Não contes vantagens nem fracassos.
Não dramatizes provações ou problemas.
Conserva o hábito da oração para quem se te faz a luz na vida íntima.
Resguarda-te em Deus e persevera no trabalho que Deus te confiou.
Ama sempre, fazendo pelos outros o melhor que possas realizar.
Age auxiliando.
Serve sem apego.
E assim vencerás.*

Pelo Espírito Emmanuel

Médium Francisco Cândido Xavier

DEDICATÓRIA

Aos meus pais tão amados, Ângela (in memoriam) e José, e à minha iluminada vovó Helena, pelo carinho, apoio, incentivo e amor incondicional durante todos os momentos da minha vida, sem vocês eu nunca teria conseguido chegar até aqui...

Aos meus preciosos irmãos Raquel e Antônio Carlos, por todo o amor e companheirismo de sempre e que tornam minha vida mais que especial...

Aos animais desse estudo e a todos aqueles que contribuem para o desenvolvimento científico.

AGRADECIMENTOS

À Deus e amigos espirituais por toda força e por iluminar e abençoar meus momentos. Por proporcionar família e amigos amorosos, presente em todas as fases da minha vida.

Ao Conselho da Pós Graduação pelo apoio e oportunidade para realização dessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela aquisição da bolsa do Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE). Foi um ano de grande enriquecimento pessoal e profissional proporcionado por esta bolsa.

À minha orientadora Profa. Mirela Tinucci-Costa pela oportunidade, orientação, dedicação, apoio, paciência e amizade durante todos esses anos de trabalho. Por ser uma verdadeira mãe e exemplo inspirador para mim.

À minha mãe, Ângela Maria Ferreira de Castro (*in memoriam*), por todo amor, carinho e dedicação. A sua ausência ainda é muito dolorosa, mas sinto que continua comigo nessa caminhada. Essa conquista também é sua por sempre me apoiar em tudo e por me guiar com sabedoria, alegria, carinho e com infinito amor de MÃE. Você estará sempre ao meu coração.

À minha família que eu tanto amo, meu pai José, vovó Helena e meus amados irmãos Antônio Carlos e Raquel. Aos meus cunhados Renato e Carol por serem tão especiais para mim e para a nossa família. Por me apoiarem imensamente em todas as minhas escolhas e, principalmente, durante a minha ausência vivendo na Inglaterra.

Expresso minha eterna gratidão à Dr. Elizabeth Proby Murchison e Andrea Strakova pelo grande aprendizado e amizade durante o período em Cambridge/UK. Agradeço

imensamente por acreditarem e confiarem em mim e no meu trabalho, me proporcionando um ano de extremo crescimento pessoal e profissional. Por cada dia de ensinamento e pelos bons momentos de lazer.

Aos professores que participaram das bancas de qualificação (Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi, Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, Prof. Dr. Marcos Rogério André e Profa. Dra. Sabryna Gouveia Calazans) e defesa final (Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha, Dr. Felipe Augusto Ruiz Sueiro, Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado e Prof. Dr. Marcos Rogério André). Expresso minha gratidão pelo pronto aceite na participação das bancas e pelo grande auxílio na correção da tese, contribuindo imensamente para a melhoria e finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira pelo auxílio e paciência durante a análise estatística.

Aos queridos amigos de Cambridge: Anna, Jin, Sheryl, Constanza, Maire, Haleema, Mayra, Jorge, Dharini, Alice, Melissa, Rodrigo e Tiago. Vocês foram fundamentais para o maravilhoso ano em Cambridge/UK.

À todos aqueles que me auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho em Cambridge: Madeleine, David, Barbara, Fernando, Angie, Ana, Bety, Lorraine, Fiona.

Aos professores Dr. Halim Atique Netto, Msc. Tábata Salum Calille Atique e Dra. Roselene Nunes da Silveira Chabariberi, por tornarem possível a realização do doutorado, aceitando minhas ausências nesse período, inclusive o afastamento de um ano inteiro na Inglaterra. Por confiarem e acreditarem no meu trabalho durante os 10 anos de UNIRP.

Às minhas queridas amigas Carla, Talita, Tatianna, Ana Silvia e Elaine por todo apoio, conversas, desabafos e incentivos durante o processo de confecção deste trabalho e, principalmente, por serem parceiras tão queridas.

À minha querida amiga Juliana Giantomassi Machado pela grande amizade e pela imensa ajuda durante diversas etapas dessa tese. Por acreditar mais em mim do que eu mesma.

Às minhas queridas amigas Marília e Rosana por toda amizade desde a época da residência e pelo grande auxílio durante a confecção da tese. Vocês são muito especiais para mim.

Aos meus alunos, residentes e estagiários que, dia após dia, me ensinam, incentivam e impulsionam na carreira acadêmica.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Carcinogênese.....	2
2.2 Cânceres transmissíveis.....	3
2.3 Complexo principal de histocompatibilidade (MHC).....	6
2.4 Tumor venéreo transmissível canino (CTVT).....	10
2.5 Antígenos tumorais.....	13
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 MATERIAL E METÓDOS.....	18
4.1 Seleção dos animais.....	18
4.2 Coleta e armazenamento das amostras.....	19
4.3 Amostras controle.....	22
4.4 Transporte das amostras.....	23
4.5 Extração de DNA e RNA.....	23
4.5.1 Extração de DNA das amostras teciduais e de sangue.....	23
4.5.2 Extração de RNA das amostras tumorais.....	24
4.6 Amplificação total do genoma (WGA).....	24
4.7 Mensuração da concentração de DNA e RNA.....	24
4.8 Transcrição reversa.....	24
4.9 PCR em tempo real quantitativa (qPCR)	25
4.9.1 Rearranjo LINE-1/c-myc.....	26

4.9.2 Detecção de CDKN2A.....	26
4.9.3 Amplificação e expressão do gene <i>DLADQA-1</i>	27
4.9.4 Análise dos resultados.....	29
4.10 PCR convencional (cPCR) para o gene <i>DLADQA-E2</i>	30
4.11 Eletroforese em gel de agarose.....	31
4.12 Purificação dos produtos da cPCR.....	31
4.13 Sequenciamento por capilaridade (Método Sanger).....	31
4.14 Análise imuno-histoquímica.....	32
4.15 <i>Western Blotting</i>	33
4.15.1 Preparação das amostras protéicas.....	33
4.15.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	34
4.15.3 Transferência das bandas protéicas.....	35
4.15.4 Incubação com anticorpo primário.....	35
4.15.5 Incubação com anticorpo secundário.....	35
4.16 Coloração com Coomassie Brilliant Blue.....	36
4.17 Espectrometria de massa.....	36
4.18 Análise estatística.....	38
5 RESULTADOS.....	38
5.1 Dados epidemiológicos.....	38
5.2 Exame citológico e histopatológico.....	38
5.3 Rearranjo <i>LINE-1/c-myc</i>	39
5.4 Detecção do gene <i>CDKN2A</i>	41
5.5 Amplificação e expressão gênica de <i>DLADQA-1</i> (<i>MHC-II</i>).....	43
5.6 Proporção de <i>DLADQA-1</i> tumor x hospedeiro.....	47
5.7 Caracterização genotípica do loco <i>DLADQA-1</i> (Sequenciamento).....	52
5.7.1 Genótipo tumoral.....	52
5.7.2 Genótipo do hospedeiro.....	53
5.7.3 Genótipo dos animais controle.....	55

5.7.4 Comparação entre o genótipo dos hospedeiros do CTVT e dos animais controle.....	56
5.8 Expressão proteica.....	58
5.9 Antígenos tumorais - <i>Western Blotting</i>	60
6 DISCUSSÃO.....	70
7 CONCLUSÃO.....	85
8 PERSPECTIVAS.....	86
9 REFERÊNCIAS.....	88
APÊNDICE.....	100
APÊNDICE A – Questionário e termo de consentimento livre esclarecido respondido e assinado pelos proprietários dos animais incluídos no presente estudo.....	101
APÊNDICE B - Resumo dos procedimentos realizados com as amostras biológicas colhidas no presente estudo.....	103
APÊNDICE C - Protocolos utilizados para a realização da técnica de qPCR.....	104
APÊNDICE D – Curvas padrões construídas com os valores controles obtidos pela técnica de qPCR.....	105
APÊNDICE E – Protocolos utilizados para a realização da técnica de cPCR.....	106
APÊNDICE F – Tampões utilizados na técnica de <i>Western blotting</i>	107
APÊNDICE G – Sequenciamento de proteínas obtido pela espectrometria de massa.....	109



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 024674/12 do trabalho de pesquisa intitulado "Tumor venéreo transmissível canino – I. c-DNA *microarrays* e análise imuno-histoquímica na avaliação da expressão gênica e proteica; II. Estudo das variantes genéticas", foi alterado para "**Tumor venéreo transmissível canino – I. Expressão gênica e proteica e caracterização genotípica de DLADQA-1 (MHC-II); II. Estudo imuno-histoquímico da resposta imune local**", sob a responsabilidade da Profª Drª Mirela Tinucci Costa está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de outubro de 2015.

Jaboticabal, 07 de outubro de 2015.


Profª Drª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO – I. EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE DLADQA-1 (MHC-II); II. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA RESPOSTA IMUNE LOCAL

RESUMO - O tumor venéreo transmissível canino (CTVT) é um câncer transmissível que propaga-se, naturalmente, entre os cães pela transferência alogênica de células tumorais, principalmente, durante o coito. Trata-se da mais antiga linhagem tumoral conhecida na natureza e uma de suas características marcantes é a habilidade de se desenvolver e se evadir da rejeição imunológica, como enxerto alogênico, apesar da estrita e contínua vigilância do sistema imunológico. Há a hipótese de que as células do CTVT não expressam MHC-II, como um mecanismo de escape à detecção imune, e que a positividade detectada em muitas amostras tumorais possa ser atribuída à infiltração de células do hospedeiro no sítio do tumor. Objetivou-se avaliar a expressão gênica e proteica e a caracterização genotípica do loco DLADQA-1 (MHC-II) em tumores venéreos transmissíveis de ocorrência espontânea em cães. Adicionalmente, detectar a interação entre anticorpos séricos e antígenos tumorais específicos do CTVT. Para tanto, foram incluídos neste estudo 20 cães provenientes de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil, com CTVT de ocorrência natural. As amostras tumorais foram coletadas antes do tratamento quimioterápico (M1) e três semanas após o início da quimioterapia (M2). A análise de expressão gênica foi realizada pelo método de qPCR e de expressão proteica de CD3, CD79, MAC387, Ki67 e MHC-II, pelo método de imuno-histoquímica. Foi realizado sequenciamento por capilaridade para caracterização genotípica e estudo dos antígenos tumorais pela técnica de *Western Blotting*. Amostras de CTVT e de seus hospedeiros provenientes de outros países foram empregados para estudos comparativos. Foi observada diferença significativa de células imunomarcadas para MHC-II e CD3 entre M1 e M2 detectando-se maior expressão em M2. Não houve expressão gênica de DLADQA-1 em nenhuma amostra de CTVT em M1 e M2. O elevado grau de semelhança genotípica do loco DLADQA-1 entre as amostras tumorais, as quais diferem de seus respectivos hospedeiros, condiz com a origem clonal desta neoplasia. Não houve diferença significativa entre os genótipos de DLADQA-1 entre os animais hospedeiros e controle. As bandas proteicas detectadas em CTVTs em diferentes tumores de cães do Brasil e em amostras oriundas de diferentes regiões geográficas também foram detectadas em língua de cão com CTVT e de outro cão controle, tornando assim indefinido se as bandas detectadas no atual estudo são específicas para a neoplasia em questão.

Palavras-chave: câncer, DLADQA-1, hospedeiro, MHC, transmissível

CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOUR – I. GENE AND PROTEIN EXPRESSION AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF DLADQA-1 (MHC-II); II. IMMUNOHISTOCHEMISTRY EVALUATION OF LOCAL IMMUNE RESPONSE.

ABSTRACT – The canine transmissible venereal tumor (CTVT) is a transmissible cancer that is spread between dogs by the allogeneic transfer of living cancer cells during coitus. It is the oldest cancer lineage known in nature and one of the most remarkable features of CTVT is its ability to develop and evade the immune rejection, as an allogeneic graft, despite the strict and continuous surveillance of the immune system. It has been hypothesized that CTVT cells do not express MHC-II as an escape mechanism to immune detection, and MHC-II positivity detected in tumor samples can be attributed to infiltrating host cell at the tumor site. The aims of this study were: evaluate gene and protein expression and genotypic characterization of DLADQA-1 locus (MHC-II) in spontaneous transmissible venereal tumours in dogs. Additionally, to detect the interaction between serum antibodies and specific tumor antigens of CTVT. For this, 20 dogs from São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil with naturally occurring CTVT were included and samples were collected before chemotherapy (M1) and three weeks after starting chemotherapy (M2). The gene expression analysis was performed by qPCR method and protein expression of CD3, CD79, MAC387, Ki67 and MHC-II by immunohistochemistry method. Sequencing was performed by capillary method and the study of tumor antigens by the Western Blotting technique. CTVT samples and their hosts from other countries have been used for comparative studies. Significant differences were observed in MHC-II and CD3 immunostained cells between M1 and M2 with higher expression in M2. There was no gene expression of DLADQA-1 in any sample of CTVT in M1 and M2. The genotypic similarity between tumor samples, which differ from their respective hosts, is consistent with a clonal origin of this tumour. There was no significant difference between the genotypes of hosts and control dogs. The detection of two protein bands in different CTVT from Brazil and samples from different geographic regions were also detected in tongue of CTVT dog and another control dog. Therefore, it unclear whether the bands which were identified in this study are specific from the cancer in question.

Keywords: cancer, DLADQA-1, host, MHC and transmissible

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Genes MHC-I, MHC-II e MHC-III em mamíferos (Adaptado de Wagner, 2003).....	08
Tabela 2 Dados clínicos e amostras coletadas dos pacientes portadores de CTVT incluídos no presente estudo.....	20
Tabela 3 Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na qPCR para LINE-1/c-myc e CDKN2A.....	27
Tabela 4 Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na qPCR para DLADQA-1 exon 2.....	28
Tabela 5 Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de cPCR para amplificação de DLADQA-E2.....	31
Tabela 6 Anticorpos primários, especificidades e clones utilizados nas reações de imuno-histoquímicas.....	32
Tabela 7 Controles positivos e negativos realizados nos ensaios da técnica de Western-blot	61

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Esquema ilustrativo das amostras coletadas e armazenadas dos animais portadores de CTVT e amostras controle.....	23
Figura 2	Ilustração esquemática do rearranjo LINE-1/c-myc (2A) e da deleção homocigótica do CDKN2A (2B) no CTVT.....	27
Figura 3	Ilustração esquemática do desenho dos oligonucleotídeos. (A) Oligonucleotídeos iniciadores tumor alelo-específicos (setas cor roxa) ligam-se a região de DLADQA-1 no exon 2 que inclui uma variante específica do tumor, ou seja, esses oligonucleotídeos alinham-se especificamente ao alelo tumoral e não ao alelo do hospedeiro. (B) Oligonucleotídeos iniciadores não alelo específicos (setas cor vermelha) ligam-se a região de DLADQA-1 no exon 2, que não inclui qualquer variante, ou seja, esses oligonucleotídeos alinham-se com ambos alelo tumoral e alelo do hospedeiro.....	28
Figura 4	Curvas de dissociação por qPCR para os genes DLADQA-1 exon 2 não alelo-específico (A) e DLADQA-1 exon 2 tumor alelo-específico (B).....	30
Figura 5	Fotomicrografias de CTVT. Aspecto citológico (5A) e histopatológico (5B), ilustrando figuras de mitose em anáfase (H&E; 40x; 30µm).....	39
Figura 6	Representação gráfica da detecção do rearranjo LINE-1/c-myc pela técnica de qPCR, a partir de amostras de gDNA. O rearranjo LINE-1/c-myc foi detectado em todas as amostras de CTVT em M1 (6A), em 3 amostras de CTVT em M2 (6B) e ausente em todas as amostras de sangue de seus hospedeiros correspondentes (6C). As amostras tumorais estão descritas pelo número da amostra seguido da letra T ou TF (ex. 765T/767TF) e as amostras do hospedeiro (sangue) finalizadas com a letra H (ex. 765H). A ausência de amostras de alguns tumores em M2 e de alguns hospedeiros, devido à indisponibilidade das mesmas, estão representadas pela ausência de identificação.....	40

- Figura 7** Comparação dos resultados obtidos na detecção do rearranjo LINE-1/c-myc por qPCR, a partir de amostras de gDNA, entre as amostras de tumor e hospedeiro (sangue), e entre ambas fases de progressão. **(A)** O rearranjo LINE-1/c-myc foi detectado nas amostras tumorais e apresentou-se ausente em todas as amostras de sangue dos hospedeiros. **(B)** Não houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos em M1 e M2 ($p= 0,1579$). Letras iguais denotam ausência de significância ($p<0,05$) pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney..... 41
- Figura 8** Representação gráfica de CDKN2A por meio da técnica de qPCR a partir de amostras de gDNA. O gene CDKN2A foi detectado em todas as amostras tumorais em ambas fases de desenvolvimento (8A e 8B) e também em seus hospedeiros correspondentes (8C) e, ainda, apresentou-se em níveis mais elevados nas amostras de sangue dos hospedeiros quando comparado às amostras tumorais (8C). As amostras tumorais estão descritas pelo número da amostra seguido da letra T ou TF (ex. 765T/767TF) e as amostras do hospedeiro (sangue) finalizadas com a letra H (ex. 765H). A ausência de amostras de alguns tumores em M2 e de alguns hospedeiros, devido à indisponibilidade das mesmas, estão representadas pela ausência de identificação..... 42
- Figura 9** Comparação dos resultados obtidos na detecção do gene CDKN2A por qPCR, a partir de amostras de gDNA, entre as amostras de tumor e hospedeiros, e entre ambas fases de progressão. **(A)** Foi observada diferença estatística significativa dos resultados obtidos entre tumores e hospedeiros, os quais apresentaram-se mais elevados nos hospedeiros quando comparados aos tumores ($p<0.0001$). **(B)** Foi observada diferença estatística significativa entre os resultados obtidos em M1 e M2 ($p= 0,0002$), os quais apresentaram-se mais elevados em M2 quando comparados à M1. Letras diferentes denotam significância ($p<0,05$) pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney..... 43
- Figura 10** Representação gráfica da detecção de DLADQA-1 por meio da técnica de qPCR a partir de amostras de gDNA. DLADQA-1 tumor alelo específico foi detectado em todas as 20 (20/20) amostras de CTVT em M1 e em 3 (3/9) amostras de CTVT em M2 (10A). DLADQA-1 não alelo específico foi detectado em todas as amostras de CTVT em ambas fases de progressão (10B). As amostras tumorais estão descritas pelo número da amostra seguido da letra T ou TF (ex. 765T/767TF) e as amostras do hospedeiro (sangue) finalizadas com a letra H (ex. 765H). As amostras com numeração única representam

- as amostras coletadas somente em M1..... 44
- Figura 11** Comparação dos resultados obtidos na amplificação de DLADQA-1 tumor alelo específico (11A) e DLADQA-1 não alelo específico (11B) por qPCR, a partir de amostras de gDNA tumoral, entre os dois momentos. Foi observada diferença estatística significativa entre os resultados obtidos entre M1 e M2, os quais apresentaram-se mais elevados em M1 quando comparados a M2. tanto com a utilização dos oligonucleotídeos DLADQA-1 tumor alelo específico ($p=0,0273$) como de DLADQA-1 não alelo específico ($p=0,0017$). Letras diferentes denotam significância ($p<0,05$) pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney..... 45
- Figura 12** Representação gráfica da expressão gênica de DLADQA-1 por RT-qPCR, a partir de amostras de cDNA. Não foi observada expressão gênica de DLADQA-1 tumor alelo específico em nenhuma amostra de CTVT em ambas fases de progressão (12A). Detectou-se expressão gênica de DLADQA-1 não alelo específico em todas as amostras de CTVT em ambas fases de progressão, com maior expressão em M2 (12B). As amostras tumorais estão descritas pelo número da amostra seguido da letra T ou TF (ex. 765T/767TF) e as amostras do hospedeiro (sangue) finalizadas com a letra H (ex. 765H). As amostras com numeração única representam as amostras coletadas somente em M1..... 46
- Figura 13** Comparação dos resultados obtidos na expressão gênica de DLADQA-1 por RT-qPCR, a partir de amostras de cDNA tumoral, entre os dois momentos. Não foi observada diferença estatística significativa na expressão gênica de DLADQA-1 tumor alelo específico entre M1 e M2 ($p= 0,8571$) (13A). Detectou-se diferença estatística significativa entre os resultados obtidos em M1 e M2, os quais apresentaram-se mais elevados em M2 quando comparados a M1 em DLADQA-1 não alelo específico ($p=0,0089$) (13B). Letras diferentes denotam significância ($p<0,05$) pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney..... 47
- Figura 14** Esquema ilustrativo da proporção de DLADQA-1 de tumor e hospedeiro em amostras de gDNA coletadas somente na fase M1. A porção ilustrada na cor verde representa as cópias de DLADQA-1 em gDNA do hospedeiro. A porção ilustrada em azul representa as cópias tumorais de DLADQA-1 (gDNA)..... 48

Figura 15	Esquema ilustrativo da proporção de DLADQA-1 de tumor e hospedeiro em amostras de gDNA coletadas em M1 e M2 do mesmo hospedeiro. A porção ilustrada na cor verde representa as cópias de DLADQA-1 (gDNA) do hospedeiro como proporção do total de DLADQA-1 detectado em amostras de gDNA. A porção ilustrada em azul representa as cópias tumorais de DLADQA-1 em amostras de gDNA.....	49
Figura 16	Esquema ilustrativo da proporção de DLADQA-1 de tumor e hospedeiro em amostras de cDNA coletadas somente na fase M1. A porção em cor verde representa a expressão de DLADQA-1 cDNA do hospedeiro como proporção do total de DLADQA-1 detectado.....	50
Figura 17	Esquema ilustrativo da proporção de DLADQA-1 de tumor e hospedeiro em amostras de cDNA coletadas nas fase M1 e M2 do mesmo hospedeiro. A porção em cor verde representa a expressão de DLADQA-1 do hospedeiro como proporção do total de DLADQA-1.....	51
Figura 18	Resumo das 16 variantes identificadas no loco DLADQA-1 (exon 2) em 17 amostras de TVT (verde) e de seus hospedeiros correspondentes (rosa). Os resultados ilustrados em amarelo indicam a presença de variantes (heterozigose ou homozigose) e em azul ausência de variantes. Amostras tumorais marcadas com o símbolo (H), demonstram que o genótipo tumoral é o mesmo genótipo apresentado pelo hospedeiro.....	54
Figura 19	Ilustração esquemática da presença ou ausência de heterozigosidade nos tumores. Pico vermelho: T; pico azul: C; pico vermelho e azul: T/C; pico preto: G; pico verde: A; 757H e 759H: amostras do hospedeiro; 757TF e 759TF: amostras tumorais.....	55
Figura 20	Resumo das 12 variantes identificadas no loco DLADQA-1 (exon 2) em 20 amostras de animais controle (cinza). Os resultados ilustrados em amarelo indicam presença de variantes (heterozigose ou homozigose) e em azul indicam ausência de variantes.....	56
Figura 21	Representação gráfica da comparação da frequência de cada nucleotídeo nas diferentes posições de variantes do loco DLADQA-1 entre os animais hospedeiros de CTVT e controle. Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste Exato de Fisher e Qui-Quadrado.....	57

- Figura 22** Fotomicrografias de CTVT. **(A)** Aspecto histológico do CTVT (H&E; 40x; 30µm). **(B)** Imunomarcção para proliferação celular (Ki67; 40x; 30µm). **(C)** Imunomarcção para linfócitos T (CD3; 40x; 30µm). **(D)** Imunomarcção para linfócitos B (CD79; 40x; 30µm) **(E)** Imunomarcção para macrófagos (MAC387; 40x; 30µm) e **(F)** células positiva para MHC-II (MHC-II; 40x; 30µm). Cambridge, 2014..... 59
- Figura 23** Representação gráfica do número mínimo e máximo de células imunomarcadas expressando Ki67 (A) p=0,2902, MHC-II (B) p=valor 0,0082, CD3 (C) p=valor 0,0080, CD79 (D) p=0,3129 e MAC 387 p=0,2153 (E) em tecido tumoral em M1 e em M2. As caixas representam os intervalos interquartil (percentil 25-percentil 75). As barras representam os valores mínimos e máximos de células imunomarcadas. Letras diferentes denotam significância (p<0,05) pelo teste de Mann-Whitney..... 60
- Figura 24** Fotodocumentação de membrana de Western-blot. Presença de banda específica, de aproximadamente 39 kDa, nas colunas de tecido tumoral (seta vermelha). M: marcador; CTVT: tumor venéreo transmissível canino; Testis: testículo. Cambridge, 2014..... 62
- Figura 25** Fotodocumentação de membrana de Western-blot. Presença de duas bandas específicas, de aproximadamente 39kDa e 45kDa, nas colunas de tecido tumoral (seta vermelha). M: marcador; CTVT: tumor venéreo transmissível canino; Testis: testículo. Cambridge, 2014..... 63
- Figura 26** Fotodocumentação de membrana de Western-blot. Presença de duas bandas específicas, de aproximadamente 39kDa e 45 kDa, nas colunas de tecido tumoral (seta vermelha). M: marcador; CTVT: tumor venéreo transmissível canino; Testis: testículo. Cambridge, 2014..... 64
- Figura 27** Ilustração esquemática dos resultados obtidos através da técnica de *Western Blotting* com amostras séricas provenientes do Brasil colhidas após o completo tratamento quimioterápico. Células na cor amarela referem-se à ausência de bandas e na cor azul presença de bandas positivas em diferentes intensidades: + (intensidade leve), ++ (intensidade moderada) e +++ (intensidade forte)..... 65

- Figura 28** Ilustração esquemática dos resultados obtidos através da técnica de *Western Blotting* com amostras séricas provenientes do Brasil colhidas antes ou após o tratamento quimioterápico. Células na cor amarela referem-se à ausência de bandas e na cor azul presença de bandas positivas em diferentes intensidades: + (intensidade leve), ++ (intensidade moderada) e +++ (intensidade forte)..... 66
- Figura 29** Ilustração esquemática dos resultados obtidos através da técnica de *Western Blotting* com amostras séricas provenientes do Paquistão, Austrália e África do Sul. Células na cor amarela referem-se à ausência de bandas e na cor azul presença de bandas positivas em diferentes intensidades: + (intensidade leve), ++ (intensidade moderada) e +++ (intensidade forte)..... 66
- Figura 30** Ilustração esquemática dos resultados obtidos através da técnica de *Western Blotting* com amostras séricas controle, ou seja, amostras de soro colhidas de animais provenientes da Inglaterra. Células na cor amarela referem-se à ausência de bandas e na cor azul presença de bandas positivas em diferentes intensidades: + (intensidade leve), ++ (intensidade moderada) e +++ (intensidade forte)..... 67
- Figura 31** Ilustração esquemática dos resultados obtidos a partir da espectrometria de massa com as amostras tumorais 756TF e 768TF das duas bandas de peso molecular aproximado de 39kDa e 45kDa, identificadas através da técnica de Western-blot..... 68
- Figura 32** Fotodocumentação de membrana de Western-blot. Presença de duas bandas de aproximadamente 39kDa e 45 kDa, nas colunas de tecido tumoral e controle (seta preta). M: marcador; CTVT: tumor venéreo transmissível canino; Testis: testículo; Tongue: língua. Cambridge, 2014..... 69

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos cânceres surge como resultado de mutações cumulativas em células somáticas durante a vida de um organismo e constitui uma expansão clonal de células transformadas com o genótipo derivado do hospedeiro (STRATTON et al., 2009). Em vertebrados, os tumores não são, de modo geral, contagiosos ou transmitidos a outros indivíduos, por serem alvos do reconhecimento imunológico e rejeitados por ação de proteínas polimórficas de superfície celular, particularmente as do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em vertebrados (WAGNER, 2003; BELOV, 2011; STRAKOVA; MURCHISON, 2015).

Alguns tumores são induzidos por agentes infecciosos, tais como vírus e parasitas (*Spirocerca lupis*, *Hymenolepis nana*) e, embora estes agentes sejam contagiosos, esses tumores surgem no hospedeiro ainda pela transformação de células somáticas (ZUR HAUSEN, 2009; MURCHISON et al., 2014; METZGER et al., 2015; MUEHLENBACHS et al., 2015).

Para tornar-se transmissível, o câncer deve adquirir competências para suportar a transmissão física de suas células cancerígenas e para escapar da ação do sistema imune do hospedeiro. Uma vez transmissível, o câncer deve adquirir configuração genômica que proporcione um longo tempo de vida sem que isso induza a morte do hospedeiro (STRAKOVA; MURCHISON, 2015).

O tumor venéreo transmissível canino (CTVT), a doença tumoral da face do diabo da Tasmânia (DFTD) e, mais recentemente, um câncer fatal em moluscos semelhante a leucemia são considerados os únicos cânceres naturalmente transmissíveis em animais (MURGIA et al., 2006; REBBECK et al., 2009; MURCHISON et al., 2014; METZGER et al., 2015). Nesses casos, a própria célula tumoral propaga-se naturalmente entre os indivíduos como uma linhagem celular contagiosa (REBBECK et al., 2009; MURCHISON et al., 2014). O CTVT, descrito pela primeira vez em 1810 por Blaine (BLAINE, 1810), é um tumor sexualmente transmissível em cães que se originou há milhares de anos (MURGIA et al., 2006; REBBECK et al., 2009; MURCHISON et al., 2014).

A notável semelhança entre os cariótipos do CTVT, que diferem claramente das células de cães normais, sugere não só uma origem comum dessa neoplasia, mas também destaca a natureza estável deste clone (MURCHISON, 2009).

Muitos cânceres em seres humanos se valem de mecanismos de escape à detecção imune modulando a expressão de MHC (ALGARRA; COLLADO; GARRIDO, 1997). No caso do CTVT, estudos sugerem que as células tumorais sub-regulam a expressão de moléculas de MHC, presumivelmente por um processo de imunosseleção (YANG; CHANDLER; DUNNE-ANWAY, 1987; HSIAO et al., 2002; MURGIA et al., 2006). Os genes do MHC desempenham papel fundamental na proteção de espécies de vertebrados contra doenças infecciosas e cânceres transmissíveis (BELOV, 2011), e na rejeição de enxertos (WAGNER; BURNETT; STORB, 1999). Por sua vez, o CTVT escapa dessa estrita e contínua vigilância imunológica do hospedeiro e a análise da expressão gênica, proteica e avaliação genotípica do MHC-II dos tumores e de seus hospedeiros pode contribuir e melhorar a compreensão da interação entre o CTVT e o sistema imune do hospedeiro e de mecanismos pelos quais esta neoplasia consegue persistir como um enxerto alogênico no hospedeiro.

Adicionalmente, a identidade dos candidatos a antígenos tumorais pode fornecer dados importantes sobre os mecanismos pelos quais o CTVT escapa do sistema imunológico como um enxerto alogênico, proporcionando não só a compreensão das estratégias de evasão imune dessa doença infecciosa única, mas, possivelmente também a elucidação dos mecanismos biológicos que podem ser explorados para evitar a rejeição do enxerto em pacientes transplantados e nas doenças autoimunes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinogênese

Avaliando células cancerígenas em divisão celular, David Von Hansemann e Theodor Boveri no final do século XIX e início do século XX, observaram a presença de alterações cromossômicas bizarras e isso desencadeou a proposta de que os

cânceres são caracterizados por clones de células anormais causados por anormalidades no material genético (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009).

O câncer engloba centenas de doenças distintas com diversos fatores de risco e epidemiológicos e surge quando uma única linhagem celular adquire mutações somáticas que promovem uma contínua proliferação celular (MURCHISON, 2009; DEAKIN et al., 2012), que pode invadir tecidos normais e induzir metástases (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009).

Considerando-se que o câncer resulta do acúmulo de mutações somáticas selecionadas durante a evolução tumoral, os processos de mutação e de seleção natural desempenham função essencial na carcinogênese. Entretanto, a mutação somática não é o único processo que influencia a progressão para o câncer. Alterações do sistema imunológico, estado hormonal, expressão de genes e sinalização entre tecidos pode afetar a probabilidade e o momento da progressão neoplásica (FRANK; NOWAK, 2004).

A característica molecular da carcinogênese é a instabilidade genética, o que permite que as células normais evoluam, progressivamente, para um estado neoplásico e adquiram as características necessárias que lhes permitam tornarem-se cancerígenas. Segundo Hanahan; Weinberg (2000), as principais capacidades biológicas que as células cancerosas adquirem durante o desenvolvimento de tumores incluem a manutenção da sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, resistência a morte celular, imortalidade replicativa, indução de angiogênese, ativação das capacidades de invasão e metástases, reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

2.2 Cânceres transmissíveis

O câncer é o resultado inevitável do potencial de células para multiplicar-se e adaptar-se ao seu ambiente e, geralmente, limitado a um único hospedeiro. Entretanto, por vezes, podem escapar de seus hospedeiros e tornarem-se linhagens clonais “parasitárias” (MURCHISON et al., 2012). Adicionalmente, são descritos tumores induzidos por agentes infecciosos, tais como vírus, bactérias e parasitas, no

entanto, apesar desses agentes poderem ser contagiosos, a doença por si não é considerada transmissível, pois ainda assim é ocasionada pela transformação neoplásica de células somáticas do hospedeiro (ZUR HAUSEN, 2009; WELSH, 2011; METZGER et al., 2015).

Embora não se tenha o conhecimento da ocorrência natural de cânceres transmissíveis que afetam os seres humanos, há raros relatos de transmissão de câncer entre dois ou mais indivíduos que podem ocorrer em determinadas situações biológicas. Isso envolve a transferência acidental de células cancerígenas através de transplantes de órgãos ou de células hematopoiéticas (BIRKELAND; STORM, 2002; BRUNSTEIN et al., 2002; BUELL et al., 2004; GANDHI; STRONG, 2007; STRAUSS; THOMAS, 2010; WANG et al., 2011; WELSH, 2011), durante procedimentos cirúrgicos, transferência deliberada de células cancerosas entre humanos para fins experimentais, ou transferência intrauterina (GARTNER et al., 1996; TOLAR; NEGLIA, 2003; GANDHI; STRONG, 2007). No entanto, estes casos são extremamente raros, e menos de 0,06% dos pacientes transplantados desenvolvem câncer por meio de órgãos ou de células (FENG et al., 2003).

A transferência de células cancerígenas entre indivíduos é normalmente impedida por ação das barreiras físicas, além da competente ação do sistema imunológico. Todavia, a habilidade dos cânceres transmissíveis em contornar esses obstáculos demonstra o potencial dessas células cancerosas em tornarem-se “parasitas” de linhagens clonais (MURCHISON et al., 2012).

O câncer para tornar-se transmissível deve adaptar-se tanto para suportar a transmissão física de células cancerígenas entre os hospedeiros, como para se evadir do sistema imune de um hospedeiro alogênico. Uma vez transmissível, o câncer deve também adquirir uma configuração genômica que lhe proporcione um longo tempo de vida (STRAKOVA; MURCHISON, 2015).

O tumor venéreo transmissível canino (CTVT), a doença tumoral da face do diabo da Tasmânia (DFTD) e, mais recentemente, um câncer fatal em moluscos (*Mya arenaria*) semelhante à leucemia são considerados os únicos três cânceres naturalmente transmissíveis em animais. Esses cânceres são transmitidos pela

transferência física de células tumorais viáveis que podem ser transplantadas a hospedeiros não relacionados (PYECROFT et al., 2007; MURCHISON, 2009; BELOV, 2011; METZGER et al., 2015). Além dos tumores transmissíveis citados, um sarcoma identificado em colônia de hamsters de laboratório foi transmitido experimentalmente entre indivíduos, através da picada de mosquito e por meio de canibalismo (BRINDLEY; BANFIELD, 1961; COOPER; MACKAY; BANFIELD, 1964; BANFIELD et al., 1965).

Até onde se conhece, a transmissão de células tumorais de um indivíduo a outro ocorre por implantação em tecido escarificado ou por via hemolinfática. No caso do CTVT, o mais comum é a transmissão venérea entre cães, originada há milhares de anos (MURGIA et al., 2006; REBBECK et al., 2009; MURCHISON et al., 2014). O tumor facial DFTD é agressivo e surgiu há menos de 20 anos atrás e está ameaçando a sobrevivência dessa espécie na natureza (HAWKINS et al., 2006). O câncer semelhante à leucemia, fatal na maioria dos portadores, foi inicialmente documentado em 1970 e afeta bivalves marinhos, como moluscos, mexilhões e ostras na costa leste da América do Norte. Caracteriza-se pela alteração neoplásica das células da hemolinfa dessa espécie (METZGER et al., 2015).

Em cada um desses casos, o genótipo tumoral não se correlaciona com o genótipo de seus hospedeiros correspondentes, o que demonstra que a neoplasia não ocorre devido à transformação neoplásica das células somáticas dos seus hospedeiros. Além disso, as células tumorais encontradas nos animais afetados em diferentes regiões geográficas são semelhantes entre si, confirmando assim sua origem clonal (MURGIA et al., 2006; PEARSE; SWIFT, 2006; METZGER et al., 2015).

O número diplóide no cão normal consiste em 78 cromossomos, sendo 76 acrocêntricos e um par sexual metacêntrico (COHEN, 1978; PINHEIRO et al., 1986). Na década de 1960, Takayama e Makino analisaram o cariótipo de CTVTs de diferentes locais no Japão e caracterizava-se por 59 cromossomos, dos quais 17 metacêntricos e 42 acrocêntricos (TAKAYAMA; MAKINO, 1961). Diversos estudos posteriores demonstraram que o cariótipo de CTVTs de diferentes países são caracterizados por 57-59 cromossomos, com 15-17 metacêntricos e 42-44

acrocêntricos (MAKINO, 1963; WEBER et al., 1965; BARSKI; CORNEFERT-JENSEN, 1966; KAKPAKOVA et al., 1968; MURRAY et al., 1969; IDOWU, 1977; RICHARDSON et al., 1987).

As células tumorais do CTVT e DFTD se comportam como parasitas infecciosos sendo transmitidos de um hospedeiro para outro, esquivando-se das proteínas do MHC. Embora esses dois cânceres tenham comportamento biológico semelhante, evoluíram de forma independente e a resposta imune e adaptação aos seus hospedeiros são únicas. Assim, CTVT e DFTD são considerados excelentes modelos de estudo de imunologia de tumores e da evolução de cânceres infecciosos (WELSH, 2011).

Em seres humanos e em outros vertebrados, proteínas especializadas e codificadas por genes do MHC são responsáveis pela rejeição de enxertos. O sistema imunológico utiliza os antígenos MHC para diferenciar o "próprio" do "não próprio" por essas proteínas variarem entre indivíduos, e o sistema imune reage contra essas células que apresentam antígenos MHC "não próprios" (BRADLEY, 1991). Portanto, as proteínas codificadas pelos genes do MHC conferem proteção a espécies de vertebrados contra doenças infecciosas e cânceres transmissíveis (BELOV, 2011).

2.3 Complexo principal de histocompatibilidade (MHC)

O MHC, também conhecido como antígeno leucocitário canino (ALC), é um grande complexo gênico com múltiplos locos encontrados na maioria dos vertebrados, cujas moléculas apresentam antígenos às células do sistema imune. Trata-se de uma das regiões do genoma mais extensivamente estudadas em diversas espécies (WAGNER; BURNETT; STORB, 1999). As proteínas codificadas pelo MHC são expressas na superfície celular e mediam o reconhecimento imune pela interação com os linfócitos T (WAGNER; 2003). Essas proteínas, altamente polimórficas, são consideradas a maior e a principal barreira ao transplante alogênico (KUMANOVICS; TAKADA; LINDAHL, 2003).

O MHC canino foi mapeado no cromossomo telomérico 12 por hibridação fluorescente *in situ* (FISH) (DUTRA; MIGNOT; PUCK, 1996; WAGNER, 2003), e

vários genes identificados nessa região apresentam sequência com significativa semelhança aos seus homólogos humanos (WAGNER, 2003).

A partir de estudos imunológicos e estruturais em mamíferos, os genes MHC foram subdivididos em três classes: Classe I (MHC-I), Classe II (MHC-II) e Classe III (MHC-III) (Tabela 1). Enquanto as moléculas da Classe I e II consistem em glicoproteínas de superfície celular, estruturalmente semelhantes e envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos T, os genes da Classe III codificam uma variedade de moléculas relacionadas ao sistema imune e não imune, a maioria das quais não estão envolvidas na apresentação de antígenos e incluem citocinas e componentes do sistema complemento (WAGNER, 2003; BELOV, 2011).

Os antígenos da Classe I são expressos por todas as células somáticas nucleadas, interagem com as células T citotóxicas CD8+ e atuam apresentando peptídeos próprios (*self*). Os antígenos da Classe II são expressos somente pelas células apresentadoras de antígenos, como os linfócitos B, macrófagos e monócitos, células dendríticas e células de Langerhans (WAGNER; BURNETT; STORB, 1999), ligam-se às células T *helper* (CD4+) e agem apresentando peptídeos exógenos (*nonself*) (BELOV, 2011). Esta apresentação de antígenos *self* ou *nonself* é importante na regulação da resposta imune (WAGNER, 2003; BELOV, 2011).

A região de DLA classe II, assim como a região do MHC Classe II em outras espécies, é dividida em sub-regiões BTNL2-DOB, DOB-DOA, DOA-COL11A2, COL11A2-DAX (DEBENHAM et al., 2005). Do ponto de vista imunológico, a região mais importante é a região BTNL2 e esta sub-região contém os locos DR e DQ. A espécie canina apresenta dois genes funcionais DR (DLA-DRA1 e DLA-DRB1) e dois genes funcionais DQ (DLA-DQA1 e DLA-DQB1) (KENNEDY et al., 2000; DEBENHAM et al., 2005) (Tabela 1).

Tabela 1. Genes MHC-I, MHC-II e MHC-III em mamíferos (Adaptado de Wagner, 2003)

Nome do loco (Referência)	Localização cromossômica
MHC-I	
DLA-88 (BURNETT et al., 1997)	12
DLA-79 (BURNETT; GERAGHTY, 1995)	18
DLA-12 (BURNETT et al., 1997)	12
DLA-64 (BURNETT et al., 1997)	12
DLA-12a (BURNETT et al., 1997)	12
DLA-53 (BURNETT et al., 1997)	12
DLA-A (SARMIENTO; STORB, 1990)	12
MHC-II	
DLA-DRA1 (WAGNER et al., 1995)	12
DLA-DRB1 (WAGNER et al., 1996b)	12
DLA-DRB2 (WAGNER et al., 1996b)	12
DLA-DQA1 (WAGNER et al., 1996a)	12
DLA-DQB1 (WAGNER et al., 1998)	12
DLA-DQB2 (WAGNER et al., 1998)	12
MHC-III	
C4 (DOXIADIS et al., 1986)	12
TNF-alfa (ZUCKER et al., 1994)	12
HSP-70 (WAGNER, dado não publicado)	12

As moléculas de MHC são expressas por genes variáveis e polimórficos presentes nos vertebrados, com um enorme número de alelos em cada loco de MHC. Tal fato permite que as próprias moléculas MHC comportem-se como antígenos em rejeição ao transplante e, então, o peptídeo MHC do enxerto seria reconhecido como *nonself* e, portanto, rejeitado (BELOV, 2011).

Conhecendo a participação do MHC no reconhecimento antigênico, seria esperado que o CTVT, um enxerto alogênico, fosse rejeitado por duas importantes razões: 1) o MHC do hospedeiro apresentaria o antígeno tumoral como *nonself* para o sistema imune do hospedeiro, e 2) o próprio MHC tumoral se apresentaria como *nonself* e geraria uma incompatibilidade com o sistema imune do hospedeiro.

Os primeiros estudos de MHC em cães utilizando métodos sorológicos revelaram que espécimes de CTVT compartilham um tipo de DLA específico e consistente (EPSTEIN; BENNETT, 1974). Por meio da imuno-histoquímica (IHQ), Perez, Day e Mozos (1998) pesquisaram o MHC-II e mostraram um padrão disperso e aleatório de positividade na amostra tumoral. No entanto, provou-se difícil de comprovar se as células MHC positivas observadas representavam a expressão de MHC nas células do tumor ou as infiltradas do hospedeiro (EPSTEIN; BENNETT, 1974; COHEN; SHALEV; KRUP, 1984; YANG; CHANDLER; DUNNE-ANWAY, 1987; PEREZ; DAY; MOZOS, 1998; HSIAO et al., 2008).

Em outro estudo, empregando técnica de separação celular para identificar especificamente as células de CTVT na amostra, Cohen, Shalev e Krup (1984) demonstraram que as células tumorais não expressaram β 2-microglobulina, um peptídeo de MHC-I e, assim, a expressão de β 2-microglobulina observada era oriunda das células do hospedeiro e não das células tumorais.

Alguns trabalhos sugerem que as células do CTVT (HSIAO et al., 2002) e do DFTD (SIDDLÉ et al., 2013) perderam a expressão de moléculas de MHC, presumivelmente por meio de um processo de imunoseleção. Da mesma forma, muitos cânceres em seres humanos modulam a expressão de MHC como um mecanismo de escape à detecção imune (ALGARRA; COLLADO; GARRIDO, 1997).

Murgia et al. (2006) investigaram, por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), a expressão de MHC em amostras de CTVT empregando os genes MHC-I (DLA-88) e MHC-II (DLA-DRB1). Esses pesquisadores demonstraram níveis reduzidos de expressão gênica de DLA-88 e não houve expressão para DLA-DRB1 nos tumores avaliados. No mesmo estudo foi realizada a avaliação genotípica de MHC-II nas amostras de CTVT e confirmou-se que todos os CTVTs estudados compartilharam os mesmos haplótipos. Dois grupos no loco DLA-DQA1 foram identificados; enquanto alguns CTVTs apresentaram-se haplóides, outros permaneceram diplóides. Esses achados contrastam com estudos posteriores que sugerem que o loco DLA-DQA1 foi submetido a uma perda de heterozigose (MURCHISON et al., 2014).

A perda de heterozigose (LOH) é um termo amplamente utilizado para descrever perdas gênicas, incluindo grandes ou pequenas deleções do gene (ou partes dele), assim como perda com ou sem reduplicação do outro cromossomo, além de eventos de recombinação não recíproca, como a conversão gênica (THIAGALINGAM; LAKEN; WILLSON, 2001; WIJNHOFEN et al. 2001).

O sistema imunológico dos mamíferos apresenta mecanismos específicos para a detecção de células que não expressam moléculas MHC. As células *natural killer* (NK) são linfócitos especializados que se tornam citotóxicos quando ativados pela detecção de ausência de MHC. Os mecanismos pelos quais os cânceres transmissíveis escapam da morte celular por ação das células NK permanecem desconhecidos (BROWN et al., 2011). O desenvolvimento de um microambiente tumoral imunossupressor que induza a tolerância imunológica ou anergia pode ser uma característica importante do câncer transmissível para escape do sistema imunológico (HSIAO et al., 2002; HSIAO et al., 2004; HSIAO et al., 2008; LIU et al., 2008). Essa sugestão é apoiada pela observação de que o CTVT raramente induz a metástase do microambiente tumoral estabelecido, exceto em hospedeiros imunossuprimidos e filhotes recém-nascidos (STRAKOVA; MURCHISON, 2015).

A progressão do CTVT é influenciada pelo sistema imune (COHEN, 1973; YANG; JONES, 1973; DAS; DAS, 2000). O CTVT transplantado experimentalmente apresenta uma fase de crescimento tumoral rápida, seguida por uma fase de latência e regressão, que pode ser completa em pacientes adultos e saudáveis, e está associada a uma intensa infiltração linfocitária local (MIZUNO et al., 1989). Estudos avaliaram alguns aspectos da resposta imune, como a participação dos linfócitos T e B (MIZUNO et al., 1989; SILVEIRA et al., 2009), macrófagos e a expressão de MHC (PÉREZ et al., 1998) em cães experimentalmente transplantados, entretanto, poucos estudos têm pesquisado a resposta imune local em CTVTs de ocorrência espontânea.

2.4 Tumor venéreo transmissível canino (CTVT)

O tumor venéreo transmissível canino (CTVT) é um câncer transmissível que propaga-se, naturalmente, entre os cães pela transferência alogênica de células

tumorais durante o coito ou por transplante de células tumorais viáveis. Estudos genéticos indicam que o CTVT surgiu pela primeira vez como um câncer que desenvolveu-se pela transformação de células somáticas, em um único cão que viveu há 11.000 anos e, posteriormente, sofreu adaptações para tornar-se transmissível entre os hospedeiros e para conseguir sobreviver como um enxerto alogênico (MURGIA et al., 2006; REBBECK et al., 2009; MURCHISON et al., 2014).

Disseminou-se mundialmente nos últimos 500 anos e, atualmente, é considerado uma doença infecciosa para os cães. O CTVT surgiu, provavelmente, a partir de uma célula somática, possivelmente de macrófagos ou células dendríticas do animal de origem, por meio de processos evolutivos que são comuns entre todos os cânceres (MOZOS et al., 1996; MARCHAL et al., 1997). No ciclo de transmissão do CTVT, uma marca genética foi identificada com a descoberta de que aproximadamente 40% de todas as mutações no CTVT foram ocasionadas por exposição à luz ultravioleta do sol (MURCHISON et al., 2014). Trata-se da mais antiga linhagem tumoral conhecida na natureza e, ao invés de morrer junto com o seu hospedeiro original, as células desse câncer continuam vivas sendo transmitidas entre cães nos dias atuais (STRAKOVA; MURCHISON, 2015).

Altamente prevalente em muitas partes do mundo, sendo considerado endêmico em, pelo menos, 90 países de todos os continentes, sua disseminação é associada à presença de cães errantes. Estima-se que o CTVT apresente uma prevalência entre um e dez por cento na maior parte dos países da América do Sul e América Central, bem como em parte da África e Ásia. No Brasil, a prevalência estimada está entre um e três por cento (STRAKOVA; MURCHISON, 2014). Contudo, alguns países como Canadá, República Tcheca, Finlândia, Holanda, Nova Zelândia, Suécia, Suíça e Reino Unido apresentam-se livres de CTVT. Nesses países há somente relatos de casos importados de CTVT vindos de regiões endêmicas (STRAKOVA; MURCHISON, 2014).

O CTVT é um câncer sexualmente transmissível em que o contato físico duradouro e injúrias na mucosa genital propiciam a transferência mecânica de células cancerígenas entre indivíduos (COHEN, 1985). Acomete a espécie canina e a doença usualmente manifesta-se clinicamente pelo aparecimento de nódulos

localizados na genitália externa de machos e fêmeas, muito embora localizações extragenitais não sejam incomuns (BRANDÃO et al., 2002; GANGULY; DAS; DAS, 2013), muitas vezes ocorrendo sem o envolvimento genital concomitante, o que sugere a existência de outras vias de transmissão, como lambeduras, farejamento ou via parto (GINEL et al., 1995; PEREZ et al., 1998).

Metástases do tumor já foram descritas, entretanto o acometimento de locais extracutâneos é raro, afetando, principalmente filhotes e pacientes imunossuprimidos (BRANDÃO et al., 2002; MUKARATIRWA; GRUYS, 2003; SILVA et al., 2007; TINUCCI-COSTA, 2008).

A quimioterapia é considerada o tratamento mais efetivo, e podem ser utilizados diversos quimioterápicos, tais como o sulfato de vincristina, vimblastina, doxorubicina e ciclofosfamida. Entretanto, o sulfato de vincristina, como agente único semanalmente é o protocolo padrão, ainda que muitos animais apresentem resistência a esse quimioterápico (LORIMIER; FAN, 2007; VALADÃO; SCARPELLI; METZE, 2010; FONSECA et al., 2012).

O desenvolvimento de um câncer é geralmente caracterizado por sucessivas ondas de crescimento clonal, impulsionado pela aquisição de mutações condutoras (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009). Os processos moleculares promovidos por mutações condutoras podem esclarecer as vias biológicas subjacentes ao câncer, tais como autonomia proliferativa, resistência à morte celular e instabilidade genômica (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O CTVT compartilha uma série de supostas mutações genéticas condutoras com alguns cânceres em seres humanos, algumas das quais possivelmente ocorreram no tumor original e incluem rearranjo envolvendo gene *c-myc* (KATZIR et al., 1985), deleção homozigótica do loco *CDKN2A* (NOBORI et al., 1994), perda de homozigose de *SETD2* e um rearranjo envolvendo *ERG* com fusão gênica *NEK1-ERG* (MURCHISON et al., 2014).

Elementos de transposição são sequências de DNA que podem se mover no genoma e são considerados a principal fonte de mutações espontâneas, perfazendo aproximadamente 40% do genoma humano (GARCIA-PEREZ et al., 2007). No CTVT, o rearranjo do proto-oncogene *c-myc*, resultante da inserção do segmento de

DNA conhecido como LINE-1 (elemento nuclear transponível) no primeiro exon do gene *c-myc*, o qual não foi identificado em qualquer outro tecido canino, é considerado específico para o CTVT (KATZIR et al., 1985; KATZIR et al., 1987; CHU et al., 2001; CHOI; KIM, 2002; LIAO et al., 2003; VONHOLDT; OSTRANDER, 2006).

Estudos adicionais descreveram a presença do rearranjo específico LINE-1/*c-myc* em CTVTs de diferentes países (AMARIGLIO et al., 1991; MURGIA et al., 2006; FONSECA et al., 2012), fornecendo mais evidências da origem clonal desta neoplasia e também sendo considerado marcador do diagnóstico molecular do CTVT. Essa especificidade do rearranjo LINE-1/*c-myc* em células de CTVT poderia explicar a manutenção e a propagação do material genético entre hospedeiros em diferentes países por muitos anos (BROOKS et al., 2003; MURGIA et al., 2006; VONHOLDT; OSTRANDER, 2006; VÁSQUEZ-MOTA et al., 2008).

O inibidor da quinase 2A dependente de ciclina (CDKN2A) é um gene supressor de tumores, que está envolvido na regulação do ciclo celular e as células incapazes de produzir esse inibidor podem estar propensas à transformação neoplásica (NOBORI et al., 1994). Uma das mutações sofridas pelos CTVTs, também compartilhada por cânceres em seres humanos, foi a deleção homozigótica do loco CDKN2A, encontrando-se ausente em todas as células do CTVT (MURCHISON et al., 2014; STRAKOVA; MURCHISON, 2015).

2.5 Antígenos tumorais

Estudos moleculares revelaram que antígenos associados a tumores (TAAs) são consequência de alterações genéticas e epigenéticas em células cancerígenas ou produtos de genes que codificam proteínas virais (PARDOLL, 2003; SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). A razão para respostas humorais espontâneas em pacientes com câncer não é conhecida, mas deve incluir abundância de antígeno ou a sua imunogenicidade na “configuração maligna” (VESELY et al., 2011).

Estudos proteômicos e imunológicos revelaram centenas de diferentes antígenos oriundos de diversos tumores humanos (NOVELLINO; CASTELLI; PARMIANI, 2005; REUSCHENBACH; VON KNEBEL DOEBERITZ; WENTZENSEN,

2009). Inicialmente, os antígenos tumorais foram classificados como antígenos tumores-específicos (TSAs), incluindo aqueles expressos apenas por células tumorais, e antígenos associados a tumores (TAAs), incluindo os homólogos mutados de proteínas expressas em células normais. A classificação atual inclui apenas TAAs, os quais são divididos em TAAs compartilhados e únicos (REUSCHENBACH; VON KNEBEL DOEBERITZ; WENTZENSEN, 2009)

Reuschenbach, Von Knebel Doeberitz e Wentzensen (2009) realizaram uma sistemática revisão de literatura de TAAs indutores de resposta humoral em pacientes humanos com câncer e foram identificados mais de cem antígenos. A maioria destes antígenos foi relacionada com proteínas superexpressas ou mutadas. A maior parte desses antígenos (42%) representou proteínas citoplasmáticas, 26% foram expressas predominantemente no núcleo (fatores de transcrição, reguladores do ciclo celular), 21% foram proteínas de membranas (receptores, proteínas de adesão celular) e 10% proteínas extracelulares (proteínas da matriz extracelular, proteínas secretadas). Os antígenos mais frequentemente analisados foram o p53, MUC1, NY-ESO-1, c-myc, survivina, p62, ciclina B1 e HER-2/neu. Anticorpos contra esses antígenos foram frequentemente detectados em pacientes humanos com câncer, entretanto, para a maioria dos antígenos estudados, anticorpos raramente foram encontradas em indivíduos saudáveis. Os tumores mais frequentemente analisados foram tumores de mama, colorretal, pulmão e fígado.

Anteriormente, uma análise semelhante, que listou todos os TAAs reconhecidos pelas células T (CD8+ ou CD4+) havia sido realizada por Novellino, Castelli e Parmiani (2005). Nesse estudo, estes antígenos foram classificados em quatro grupos diferentes. Aqueles melhores caracterizados foram os antígenos compartilhados, chamados de antígenos câncer-testículo (CT) por causa de sua expressão em diferentes tumores humanos e, entre tecidos normais, em espermatozoides e, ocasionalmente, placenta. Antígenos CT são resultantes da reativação de genes que estão silenciados em tecidos normais, e incluem a família de genes MAGE, BAGE GAGE. O segundo grupo compreende antígenos de diferenciação, compartilhados entre tumores e tecido normal, no qual o tumor surgiu. Estes TAAs são encontrados, principalmente, em melanomas e em melanócitos

normais e estão normalmente envolvidos na biossíntese de melanina. O terceiro grupo apresenta ampla ocorrência e superexpressão de TAAs. Esses antígenos estão presentes em diferentes tipos histológicos de tumores, bem como em muitos tecidos normais, geralmente com baixo nível de expressão. É possível que estes antígenos super expressos desencadeiem uma resposta anti-câncer por quebrar a tolerância estabelecida anteriormente. Dentre esses TAAs estão as proteínas antiapoptóticas livina e survivina, hTERT e a proteína supressora de tumores p53. O último grupo inclui as TAAs exclusivas, que surgem a partir de mutações pontuais de genes normais, tais como β -catenina, caspase-8 e CDK-4, os quais são considerados os alvos mais específicos para imunoterapia em cânceres em seres humanos.

No CTVT, uma das características mais marcantes é a sua habilidade de se evadir da rejeição imunológica, como um enxerto alogênico. Décadas de pesquisas têm conduzido a algum conhecimento de como o CTVT se evade da destruição pelo sistema imune do hospedeiro. Em primeiro lugar, a apresentação direta de peptídeos alogênicos e MHC aos receptores de células T parece ser evitada pela sub-regulação de proteínas do MHC (MURCHISON, 2009). Isso parece ser acompanhado pela produção e secreção de citocinas, incluindo TGF beta, o qual poderia impedir o reconhecimento pelas células NK, as quais seriam normalmente ativadas pela ausência de MHC (HSIAO et al., 2004).

Além disso, o CTVT produz substâncias que inibem a diferenciação de células dendríticas e que são, especificamente, citotóxicas para as células dendríticas e células B (LIAO et al., 2003; LIU et al., 2008). No entanto, anticorpos direcionados contra os antígenos tumorais do CTVT podem ser prontamente detectados no soro de animais com CTVT (POWERS, 1968; COHEN, 1973; EPSTEIN; BENNETT, 1974). Estes anticorpos já foram identificados circulando como antígenos tumorais solúveis, assim como o revestimento da superfície de células tumorais do CTVT *in vivo* (COHEN, 1973; EPSTEIN; BENNETT, 1974; PALKER; YANG, 1985).

Os anticorpos anti-CTVT parecem proporcionar alguma proteção para o hospedeiro, podendo também bloquear a imunidade contra o câncer, embora o mecanismo pelo qual isso ocorra permanece pouco compreendido (BENNETT et al.,

1975; HESS et al., 1975; BESCHORNER et al., 1979).

De acordo com Tinucci-Costa (1994), ao estudar fator de transferência dializável e RNA imune na imunoterapia de cães portadores de CTVT de ocorrência espontânea, houve detecção de antígenos candidatos do CTVT apresentando intervalo de peso molecular aproximado entre 30kDa e 45kDa, entretanto não foi realizado o sequenciamento proteico para obtenção da identidade desses antígenos.

Apesar da importância dos anticorpos em controlar o curso do CTVT, os seus alvos, ou seja, os antígenos tumorais, ainda não foram identificados. Além disso, os estudos sobre os antígenos tumorais do CTVT foram realizados em cães transplantados experimentalmente e não em casos de ocorrência natural, o que pode-se traduzir em diferentes respostas, tendo em vista o comportamento biológico do tumor natural e o transplantado (CHEN; MELLMAN, 2013).

A resposta imune do câncer tem sido reconhecida há mais de cem anos e há inúmeras pesquisas que buscam elucidar as interações celulares e moleculares entre o tumor e o sistema imune do hospedeiro. A complexidade dessas interações é tão vasta, que ainda não há um consenso sobre os princípios que explicam por que os tumores se evadem e se desenvolvem, apesar da estrita e contínua vigilância do sistema imunológico.

O estudo do MHC no CTVT é relevante pelo fato de que o CTVT é capaz de persistir como um enxerto alogênico em cães, sem rejeição. E, embora o CTVT seja uma linhagem clonal de células cancerígenas, pode se apresentar em diferentes graus de agressividade e invasividade em hospedeiros caninos. Dessa forma, pergunta-se: Como o CTVT escapa da vigilância imunológica do hospedeiro e consegue persistir como um enxerto? O MHC desempenha um papel fundamental no reconhecimento e na rejeição de enxertos e, como o CTVT escapa dessa captura, os resultados da expressão gênica, proteica e caracterização genotípica do MHC-II dos tumores e de seus hospedeiros podem auxiliar no entendimento da persistência dessa neoplasia.

Espera-se que as células do CTVT não expressem MHC-II e a positividade detectada em muitas amostras tumorais possa, na verdade, ser atribuída à infiltração de células do hospedeiro no sítio do tumor. Este paradigma estimulou o

desenvolvimento do estudo em tela. Adicionalmente, objetiva-se avaliar a resposta imune local caracterizando células inflamatórias infiltradas em CTVTs de ocorrência natural em dois diferentes momentos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão gênica, proteica e caracterização genotípica do loco DLADQA-1 (MHC-II), e a resposta imune local, por meio da investigação da infiltração inflamatória (linfócitos T, linfócitos B e macrófagos) em tumores venéreos transmissíveis de ocorrência espontânea em cães, correlacionando-os com os momentos pré e três semanas após o início do tratamento quimioterápico. Adicionalmente, detectar a interação entre anticorpos séricos e antígenos tumorais específicos do CTVTs.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a expressão gênica de *DLADQA-1* em CTVTs de ocorrência natural nos momentos pré e três semanas após o início da quimioterapia;
- Verificar a presença e origem (tumoral ou de células do hospedeiro) de MHC-II nas amostras de CTVT;
- Avaliar a amplificação de *DLADQA-1* tumor alelo específico e *DLADQA-1* não alelo específico em gDNA de amostras tumorais, a fim de estimar a quantidade de contaminação por células do hospedeiro nas amostras tumorais;
- Avaliar se há predisposição genotípica no hospedeiro para o desenvolvimento dessa neoplasia, quando comparado aos animais controle;
- Verificar a resposta imune local pela avaliação de células inflamatórias em CTVTs e compará-la em dois diferentes momentos;
- Verificar se anticorpos de animais portadores de CTVT identificam antígenos específicos em amostras tumorais e, ainda, se esses anticorpos são capazes de

identificar esses mesmos antígenos em tumores de cães do Brasil e de diferentes regiões do mundo antes e após a quimioterapia.

- Investigar a identidade desses antígenos tumorais por sequenciamento proteico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos animais

Foram incluídos neste estudo 20 cães (Tabela 2) com TVT de ocorrência natural de diferentes raças, idades, machos ou fêmeas, atendidos no Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” do Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) - São José do Rio Preto/São Paulo/Brasil, segundo as coordenadas geográficas: latitude 20° 49' 13" Sul e longitude 49° 22' 47" Oeste.

Após suspeita clínica de CTVT pelo exame físico, o critério para diagnóstico foi o exame citológico para triagem diagnóstica, e então procedeu-se o exame histopatológico, com amostras tumorais coletadas por biopsia incisional. A detecção do rearranjo LINE-1/c-myc, considerado o diagnóstico molecular desta neoplasia, também foi realizado como exame adicional para confirmação do diagnóstico.

Além da anamnese, para aquisição de informações detalhadas a respeito dos animais incluídos neste estudo, os proprietários responderam um questionário (Apêndice A), contendo perguntas sobre dados epidemiológicos e reprodutivos, além do endereço e telefones de contato para facilitar o acompanhamento durante o tratamento. O tratamento quimioterápico foi realizado em 18 dos 20 animais incluídos neste estudo.

Os proprietários foram orientados sobre todos os procedimentos e assinaram um termo de livre consentimento facultando-lhes a opção de aceitar ou não participar do estudo. O protocolo experimental deste estudo foi submetido e aprovado (Protocolo nº 024674/12) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), órgão assessor da Congregação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal.

4.2 Coleta e armazenamento das amostras

Após triagem diagnóstica por meio do exame físico e através da citologia aspirativa por agulha fina ou *imprint*, procedeu-se a coleta das amostras tumorais. As amostras de CTVT foram colhidas no momento do diagnóstico, antes do início do tratamento quimioterápico (Momento 1 - M1), em 20 pacientes e, em 45% dos casos (9/20), as amostras também foram colhidas três semanas após o início da quimioterapia (Momento 2 - M2), ou seja, durante a fase de regressão, entretanto, antes da regressão total do tumor. Amostras de sangue com anticoagulante (EDTA) foram colhidas de 17 (17/20) pacientes, além da amostra do tumor. As amostras de soro, obtidas através da coleta de sangue sem anticoagulante, foram colhidas de 8 pacientes, sendo que de 4 (4/8) colhidas antes do tratamento quimioterápico, de 3 (3/8) após o tratamento quimioterápico completo e de 1 (1/8) antes e após o tratamento quimioterápico completo (Tabela 2 e Figura 1).

Tabela 2. Dados clínicos e amostras coletadas dos pacientes portadores de CTVT incluídos no presente estudo.

Animais	Ano coleta	Raça	Sexo	Idade (anos)	Localização do tumor	Amostras coletadas	Momento coleta (CTVT)	Momento coleta (soro)
1 (756)	2011	Pit Bull	F	2	Vagina	SG/T	M1	_____
2 (757)	2011	SRD	F	10	Vagina	SG/T	M1	_____
3 (758)	2012	SRD	M	4	Pênis	SG/T	M1	_____
4 (759)	2012	SRD	F	5	Vagina	SG/T	M1	_____
5 (760)	2012	SRD	F	3	Vagina	T	M1	_____
6 (761)	2012	SRD	F	5	Vagina	SG/T	M1 e M2	_____
7 (762)	2012	SRD	M	4	Pênis	T	M1	_____
8 (763)	2012	SRD	F	5	Vagina	SG/T	M1	_____
9 (764)	2012	Shih Tzu	F	4	Vagina	SG/T	M1	_____
10 (765)	2012	Border Collie	F	4	Vulva/Vagina	SG/T	M1 e M2	_____
11 (766)	2012	Shih Tzu	F	7	Vagina	SG/T	M1 e M2	_____
12 (767)	2012	SRD	M	3	Pênis	T	M1	_____
13 (768)	2012	SRD	F	6	Vagina	SG/T/S	M1 e M2	Pós trat
14 (769)	2012	SRD	F	4	Vulva/Vagina	SG/T/S	M1	Pré trat
15 (770)	2012	SRD	M	3	Pênis	SG/T/S	M1 e M2	Pré trat
16 (771)	2012	Poodle	F	4	Vagina	SG/T/S	M1	Pré trat
17 (772)	2013	SRD	M	5	Pênis	SG/T/S	M1 e M2	Pré e Pós trat
18 (773)	2013	SRD	F	5	Vagina	SG/T/S	M1 e M2	Pré trat
19 (774)	2013	SRD	M	4	Cavidade nasal	SG/T/S	M1 e M2	Pós trat
20 (775)	2013	Border Collie	M	3	Penis/Prepúcio/Pálpebra	SG/T/S	M1 e M2	Pós trat

SRD: sem raça definida; F: fêmea; M: macho; SG: sangue; T: tumor; S: soro; M1: momento 1; M2: momento 2; Pré trat: antes do tratamento quimioterápico; Pós trat: após o tratamento quimioterápico completo.

A quimioterapia foi realizada pela administração de sulfato de vincristina (0,5 mg/m² por via intravenosa) semanalmente, por quatro a seis semanas, em média, em 18 dos 20 animais incluídos neste estudo. Os animais foram avaliados, por meio de exame clínico e laboratorial (hemograma e bioquímicos), antes do tratamento e semanalmente, previamente à reaplicação do quimioterápico e para acompanhamento da resposta à quimioterapia.

Previamente às coletas das amostras tumorais por biopsia incisional com a utilização de bisturi, os animais foram anestesiados utilizando-se de morfina (0,3 mg/Kg por via intramuscular) como medicação pré anestésica, e diazepam (0,5 mg/Kg por via intravenosa), seguida pela administração de propofol (4 mg/Kg por via intravenosa) para indução anestésica. Doses subsequentes de propofol foram feitas, quando necessário, para manutenção da anestesia. O procedimento cirúrgico foi realizado no centro cirúrgico do Hospital Veterinário “Dr Halim Atique” – UNIRP com utilização de materiais estéreis.

Amostras tumorais (um ou mais fragmentos de 1cm³) (Quadro 1) e as amostras de soro, destinadas às técnicas moleculares e *Western Blotting*, respectivamente, foram acondicionadas em criotubos estéreis, livres de RNase e DNase, e mantidas, imediatamente após a coleta, em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento do processamento. Parte das amostras tumorais (fragmentos menores de 0,5 cm³) foi acondicionada, imediatamente após a coleta, em frascos contendo 2,0 mL de solução de RNA later - RNA later Stabilization Solution - Life Technologies (Carlsbad, California, USA) e, em seguida, congelada em nitrogênio líquido (-196°C) (Quadro 1). As amostras de sangue com anticoagulante (EDTA) dos cães hospedeiros destinadas à técnica de PCR convencional e sequenciamento foram coletadas, adequadamente homogeneizadas e armazenadas em solução de RNA later na proporção de 1:3 (0,5 mL de sangue total:1,5 mL de solução de RNA later) e, posteriormente, mantidas sob refrigeração entre 2 e 6°C (Figura 1 e Apêndice B).

Fragmentos tumorais e tecido controle também foram armazenados em solução de formol a 10% tamponada durante 24-48 horas e, em seguida, transferidos para frascos contendo álcool 70% para posterior processamento para análise histopatológica e imuno-histoquímica (Figura 1 e Apêndice B).

Quadro 1. Descrição da forma de armazenamento das amostras tumorais

Forma de armazenamento	Número das amostras
Amostras de tumores congeladas (-196°C)	756TF, 757TF, 758TF, 759TF, 760TF, 761T1F, 761T2F, 762TF, 763TF, 764TF, 765T1F, 766T1F, 767TF, 775T3F
Amostras de tumores com <i>RNA later</i> congeladas (-196°C)	765T2, 766T2, 768T1, 768T2, 769T, 770T1, 770T2, 771T, 772T1, 772T2, 773T1, 773T2, 774T1, 774T2, 775T1, 775T2, 775T4

4.3 Amostras controle

Amostras controle foram coletadas de mucosa genital de cinco cães hípidos de São José do Rio Preto/São Paulo/Brasil (latitude 20° 49' 13" Sul e longitude 49° 22' 47" Oeste), sem prévio contato com o CTVT, seguindo o mesmo protocolo de coleta e anestesia, descritos anteriormente. Além dessas amostras, foram colhidas amostras de sangue total acrescidas de anticoagulante (EDTA) de outros 15 animais e soro de 13 animais saudáveis oriundos de São José do Rio Preto/São Paulo/Brasil (Figura 1 e Apêndice B), e de mais três animais provenientes de Cambridge/Reino Unido (latitude 52° 12' 0" Norte e longitude 0° 7' 0" Leste). As amostras de sangue com anticoagulante (EDTA) foram acondicionadas em frascos contendo solução de RNA later (*RNA later Stabilization Solution* - Life Technologies) em proporção de 1:3 (1mL de solução de RNA later:2,5 mL de sangue total) e, em seguida, mantidas sob refrigeração entre 2 e 8°C.

as recomendações do fabricante.

4.5.2 Extração de RNA das amostras tumorais

A extração de RNA das amostras tumorais, conservadas em RNAlater ou congeladas, foi realizada com auxílio do kit RNeasy Mini Kit – QIAGEN (Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 Amplificação total do genoma (WGA)

O gDNA original obtido a partir das amostras de tumor e sangue dos hospedeiros e animais controle foi amplificado por meio do kit Whole Genome Amplification – WGA - GE Healthcare, GenomePhi V2 DNA amplification kit (Chalfont St. Giles, UK) e o procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7 Mensuração da concentração de DNA e RNA

O aparelho NanoDrop™ ND-8000 - Thermo Scientific (Boston, Massachusetts, EUA) foi utilizado para determinar a concentração e a pureza das amostras de DNA e RNA extraídas. A quantificação de DNA e RNA nas amostras também foi mensurada por fluorometria através do Qubit - Fluorometer. Qubit® 2.0. Invitrogen (Paisley, Scotland, UK). Para quantificar o RNA obtido das amostras tumorais, foi utilizado o Qubit® RNA HS Assay Kit - Life Technologies (Carlsbad, California, USA) e para quantificação do DNA foi utilizado o Qubit® dsDNA HS Assay Kit - Life Technologies (Carlsbad, California, USA), de acordo com as orientações do fabricante.

A integridade do RNA foi avaliada pelo equipamento BioAnalyzer kit para RNA 6000 Nano Series - Agilent (Santa Clara, California, EUA).

4.8 Transcrição reversa

Para eliminação de qualquer contaminação com gDNA, o RNA total extraído foi tratado com DNase - DNase I, Amplification Grade – Invitrogen (Paisley,

Scotland, UK), procedimento conduzido utilizando 5µL de mRNA (200ng/µL), 1µL de tampão de reação 10X DNase I, 1µL DNase I (1U/µL) e 3µL de água destilada. A solução foi incubada durante 15 minutos a 22°C e em seguida, a DNase foi inativada pela adição de 1µL de EDTA 25 mM e posterior incubação a 65°C por dez minutos.

A transcrição reversa do RNA para o DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se a enzima SuperScript III™ Reverse Transcriptase – Invitrogen (Paisley, Scotland, UK). Todo o material e reagentes utilizados durante a transcrição reversa eram livres de RNase e a bancada, luvas e pipetas foram tratadas com a solução de descontaminação RNaseZap™ - Sigma (St Louis, Missouri, EUA).

Para este protocolo, utilizou-se 1µg de RNA total (tratado com DNase), 1µL de *random primers* (250ng/µl), 1 µL de dNTP mix 10 mM e água destilada até completar 12µL. A solução foi incubada a 65°C por 5 minutos, para romper a estrutura secundária do RNA e permitir a ligação dos oligonucleotídeos à sequência alvo complementar, e em seguida, rapidamente esfriada em gelo. Em seguida, foram adicionados 4 µL de tampão de transcrição 5x, 1 µL de DTT 0,1M e, por fim, 1 µL da enzima Super-script III (200U/µL) no caso das amostras transcriptase reversa positivas (RT+) e, ao invés da enzima, 1µL de água destilada nas amostras controle negativo (RT-). Em seguida, as amostras foram incubadas a 25°C durante 5 minutos e, então a 50°C por 60 minutos. Por fim, a enzima foi inativada à 70°C durante quinze minutos. Posteriormente 5 µL de cDNA foi então amplificado utilizando-se a PCR convencional para o gene da beta actina para comprovação de resultado. Ao final da transcrição, o cDNA foi mantido em freezer a -80°C até a realização das técnicas propostas.

4.9 PCR em tempo real quantitativa (qPCR)

A técnica de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foi realizada para detecção do rearranjo LINE-1/c-myc e detecção do gene CDKN2A com amostras de gDNA obtidas a partir de tecidos tumorais e também de sangue dos animais hospedeiros. Além disso, esta técnica foi utilizada também para amplificação de DLADQA-1, com amostras de gDNA, e expressão gênica de *DLADQA-1*, com amostras de cDNA obtidas dos tumores (Apêndice B).

4.9.1 Rearranjo LINE-1/c-myc

O diagnóstico do CTVT foi baseado também na presença do rearranjo LINE-1/c-myc específico do CTVT (Figura 2A) (KATZIR et al., 1985; KATZIR et al., 1987; MURGIA et al., 2006; REBBECK et al., 2009). Este procedimento foi realizado com amostras de gDNA extraídas de CTVT antes do tratamento (M1) e também com aquelas coletadas três semanas após o início do tratamento (M2). O mesmo procedimento também foi realizado com amostras de gDNA extraídas do sangue de seus hospedeiros. Utilizou-se a técnica de qPCR com Syber Green Mix - Life Technologies (Carlsbad, California, USA) (Apêndice C). Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do rearranjo LINE-1/c-myc estão apresentados na Tabela 3 e as condições de reação utilizados para tal procedimento no Apêndice C. O método foi adaptado para utilização de 32 amostras a serem testadas em triplicata em placas de 384 poços ao mesmo tempo.

4.9.2 Detecção de CDKN2A

Devido à deleção homozigótica do gene CDKN2A em amostras de CTVT (MURCHISON et al., 2014) (Figura 2B), mas presente em duas cópias no tecido hospedeiro, níveis detectáveis de CDKN2A podem ser atribuídos à presença de células hospedeiras nas amostras tumorais. Assim, a técnica de qPCR foi realizada para estimar o nível de contaminação das amostras de CTVT com as células do hospedeiro em ambas as fases M1 e M2.

CDKN2A é um gene supressor de tumores envolvidos na regulação do ciclo celular (NOBORI et al., 1994). Os oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados para a amplificação de CDKN2A estão apresentados na Tabela 3 e as condições de qPCR foram as mesmas utilizadas para obtenção do diagnóstico molecular do CTVT (Apêndice C).

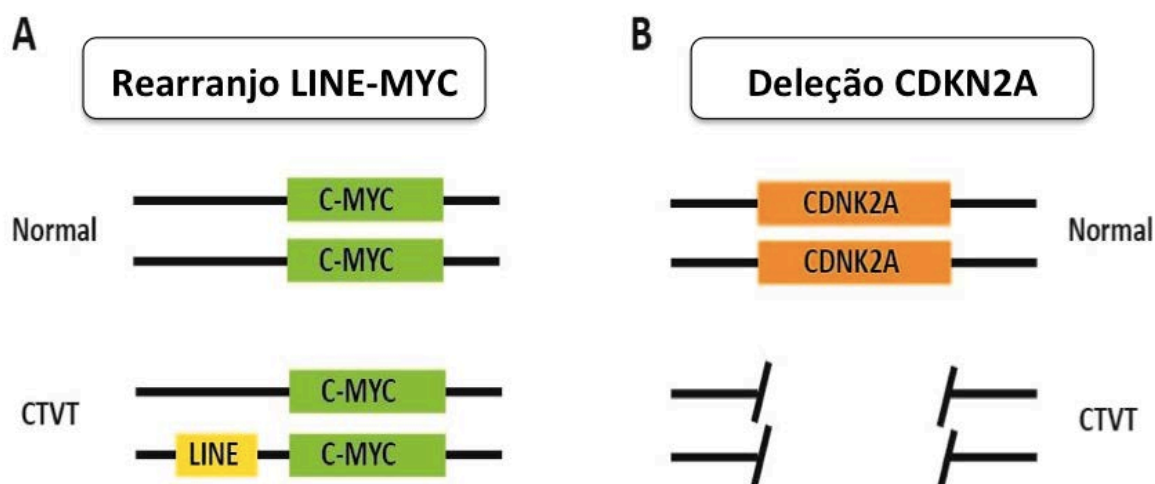


Figura 2. Ilustração esquemática do rearranjo LINE-1/c-myc (2A) e da deleção homozigótica do CDKN2A (2B) no CTVT.

Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na qPCR para LINE-1/c-myc e CDKN2A.

Gene alvo	Oligonucleotídeos	
	Forward	Reverse
LINE-1/c-myc*	5'-AGGGTTTCCCATCCTTTAACATT-3'	5'-AGATAAGAAGCTTTTGCACAGCAA-3'
CDKN2A	5'-CGGCCTTTGGAAGATTTTGTGGCTTGA-3'	5'-CTTCCACCCCTAGAAACCTCCTTCT-3'
Beta Actina	5'-CTCCATCATGAAGTGTGACGTTG-3'	5'-CGATGATCTTGATCTTCATTGTGC-3'

* Adaptado de Rebbeck (2007)

4.9.3 Amplificação e expressão do gene *DLADQA-1* (MHC-II)

Para realizar a amplificação de gDNA e expressão gênica de *DLADQA-1* (cDNA), em M1 e em M2, foram utilizados três pares de oligonucleotídeos: 1) Beta actina para normalização (controle), 2) *DLADQA-1* tumor alelo-específico, os quais alinham-se especificamente ao alelo tumoral e não ao alelo do hospedeiro (Figura 3A), e assim amplificam somente o gDNA tumoral, e 3) *DLADQA-1* não alelo específico que alinham-se com ambos alelos (tumoral e hospedeiro) (Figura 3B), ou seja, amplificam gDNA do tumor e também das células hospedeiras.

A técnica de qPCR com amostras de gDNA foi realizada para estimar a proporção de gDNA tumoral e de gDNA do hospedeiro presente na amostra testada

e, assim, associado aos resultados da expressão gênica, determinou-se com maior precisão se a expressão gênica apresentada foi proveniente das células tumorais ou hospedeiras.

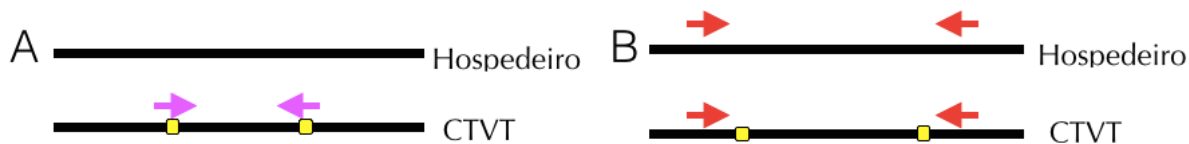


Figura 3. Ilustração esquemática do alinhamento dos oligonucleotídeos. (A) Oligonucleotídeos iniciadores tumor alelo-específicos (setas cor roxa) ligam-se a região de DLADQA-1 no exon 2 que inclui uma variante específica do tumor, ou seja, esses oligonucleotídeos alinham-se especificamente ao alelo tumoral e não ao alelo do hospedeiro. (B) Oligonucleotídeos iniciadores não alelo específicos (setas cor vermelha) ligam-se a região de DLADQA-1 no exon 2 que não inclui qualquer variante, ou seja, esses oligonucleotídeos alinham-se com ambos alelo tumoral e alelo do hospedeiro.

As condições de qPCR estão descritas no Apêndice C e os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação e expressão gênica de *DLADQA-1* estão apresentados na Tabela 4.

A técnica de qPCR com as amostras de cDNA foi realizada com 3 controles: cDNA do tumor transcriptase reversa negativa (RT-); gDNA de amostras de sangue do hospedeiro e gDNA do tumor. O controle RT- demonstrou que havia muito pouco ou nenhum gDNA nas amostras de cDNA antes da qPCR. A utilização de amostras do gDNA do hospedeiro mostrou a eficiência do oligonucleotídeo tumor alelo-específico, o qual não amplificou o DLADQA-1 do hospedeiro. Já a utilização de amostras de gDNA tumoral proporcionou uma base para verificar a presença dos alelos de DLADQA-1 no tumor e no hospedeiro.

Tabela 4. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na qPCR para DLADQA-1 exon 2

Gene alvo	Oligonucleotídeos	
	Forward	Reverse
DLADQA-1 tumor* alelo específico	5'-GAATTTGATGGCGATGAGTT-3'	5'-TCAGGATGTTCAAGTTTTGTTTTAT-3'
DLADQA-1 não alelo específico	5'-ACTACGGCATAAATGTCTACCAGTC-3'	5'-CAAGTTTCTCAGTGCACCCTGT-3'
Beta Actina	5'-CTCCATCATGAAGTGTGACGTTG-3'	5'-CGATGATCTTGATCTTCATTGTGC-3'

* Adaptados de Murgia et al. (2006).

4.9.4 Análise dos resultados

Todas as reações de qPCR foram processadas no instrumento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em placas de 384 poços. O software (Sequence detection system v2.3) foi utilizado para as análises das reações pós amplificação. Cada amostra foi ensaiada em triplicata para cada conjunto de oligonucleotídeos utilizado. A quantificação foi fornecida pelo *software* ao fim da reação, utilizando o Cq e a *baseline* automáticos. Os níveis transcricionais do alvo foram obtidos em relação ao gene de referência (beta actina), de acordo com o Método de Curva Padrão Relativo - *Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR* – Applied Biosystems (Carlsbad, California, USA). A eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores foi verificada em uma reação de PCR convencional antes do seu uso na qPCR.

A curva padrão (Apêndice D – Figura 1D, 2D e 3D), baseada em diluições de gDNA em série, foi construída através da representação gráfica do valor Cq para os três conjuntos de oligonucleotídeos utilizando concentrações conhecidas de uma amostra padrão do laboratório.

A curva de dissociação gerada ao fim de cada reação demonstrou que não houve amplificações inespecíficas, formação de oligonucleotídeos iniciadores ou contaminação das amostras. Conforme Figura 4, as curvas de dissociação apresentaram um pico único em uma única temperatura e o controle negativo da reação, conforme esperado, não amplificou.

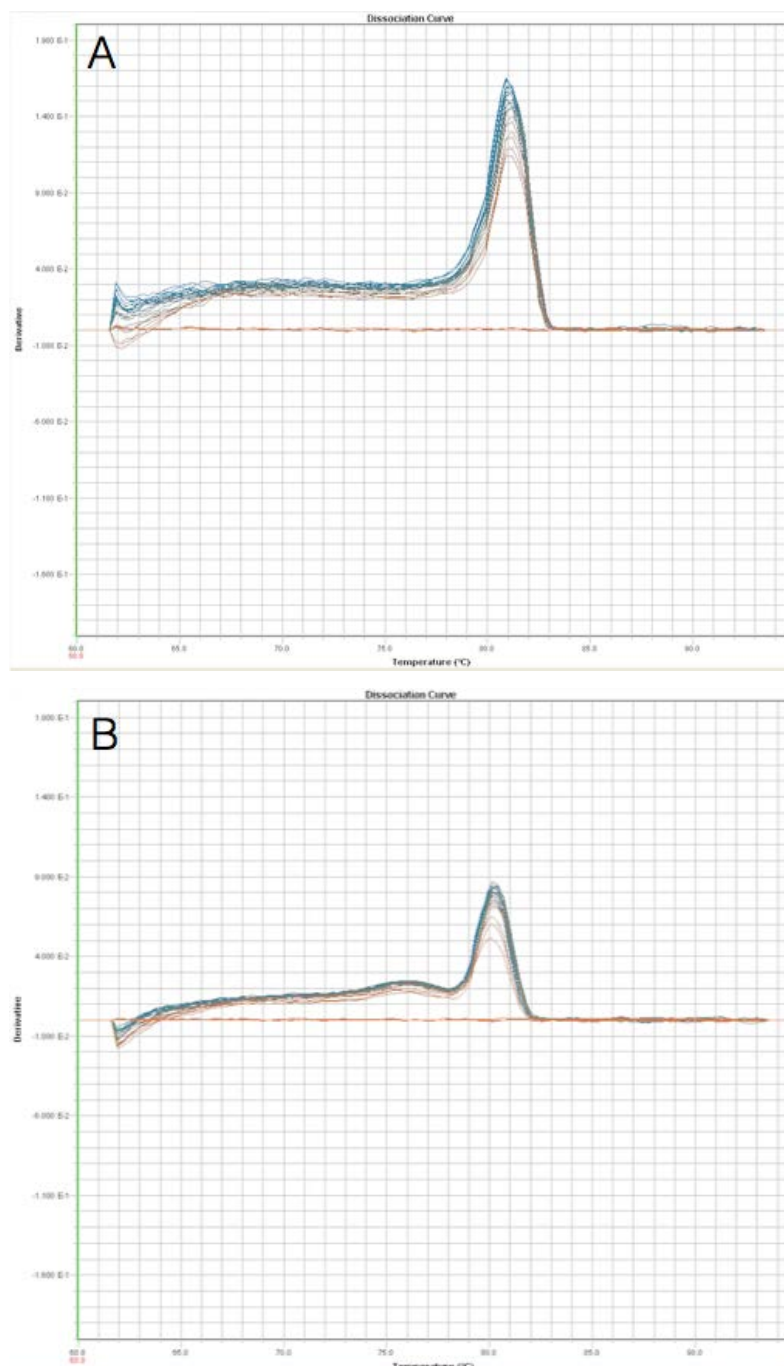


Figura 4. Curvas de dissociação por qPCR para os genes DLADQA-1 exon 2 não alelo-específico (A) e DLADQA-1 exon 2 tumor alelo-específico (B).

4.10 PCR convencional (cPCR) para o gene DLADQA-E2

A amplificação de DLADQA-E2 pela técnica de cPCR com amostras tumorais, sangue do hospedeiro e dos animais controle, foi realizada com One Taq® DNA

Polimerase - New England BioLabs (Hitchin, UK), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de cPCR para amplificação de DLADQA-E2 estão descritas na Tabela 5. As reações foram realizadas em termociclador PTC-225TM (MJ Research) (Apêndice E).

Tabela 5. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de cPCR para amplificação de DLADQA-E2

Gene alvo	Oligonucleotídeos	Amplicon
DLADQA-E2 <i>Forward</i>	5'-GATAGTGGAAAAGCAGAGCGTATTC-3'	750 pb
DLADQA-E2 <i>Reverse</i>	5'-TTGAGGGATTCAAGGAACATGGTAT-3'	750 pb

4.11 Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, foi utilizado para detecção dos produtos amplificados. Para esta etapa foi utilizada solução tampão TBE 1X (100 mL TBE 10x Sigma - St Louis, Missouri, EUA + 900 mL água destilada) e a corrida eletroforética foi realizada a 80 volts em aproximadamente 20 a 40 minutos. Posteriormente, o gel foi visibilizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta no aparelho *High Performance Ultraviolet Transilluminators* – VWR.

4.12 Purificação dos produtos da cPCR

A purificação do produto obtido após amplificação pela técnica de cPCR foi realizada por meio do kit QIAquick PCR Purification kit QIAGEN (Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, os amplicons foram quantificados por espectrofotometria no aparelho NanoDropTM ND-8000 (Thermo Scientific) e, então, submetidas à técnica de sequenciamento por capilaridade.

4.13 Sequenciamento por capilaridade (Método Sanger)

Os amplicons purificados foram submetidos à reação de sequenciamento direto por capilaridade do loco DLADQA-1 (exon 2) pelo Método Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) no Sanger Institute (*Wellcome Trust Genome*

Campus), Hinxton/UK, através do *Sanger Sequencing Service* (Source BioScience). As análises foram feitas no sequenciador automático ABI 3730xl DNA Analyser. Foram sequenciadas 17 amostras tumorais e de seus respectivos hospedeiros (sangue), além de 20 amostras controle (sangue).

Após o sequenciamento dos produtos da cPCR, as sequências geradas foram alinhadas, analisadas e comparadas com aquelas depositadas em bancos de dados como o *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e UCSC *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) utilizando-se os programas *BioEdit* versão 7.2.5 e *Clustal W Multiple Sequence Alignment Program*.

4.14 Análise imuno-histoquímica

Para a análise da expressão proteica de CD3, CD79a, MAC387, Ki67 e MHC-II foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica em cortes de tumores venéreos transmissíveis incluídos em parafina, referentes aos dois grupos testados (M1 e M2), para os respectivos anticorpos.

A técnica de imuno-histoquímica empregada seguiu o protocolo do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Cambridge/UK e foi realizada neste mesmo estabelecimento, utilizando-se os anticorpos apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Anticorpos primários, especificidades e clones utilizados nas reações de imuno-histoquímicas

Anticorpos*	Especificidade	Clone	Diluição
CD3	Camundongo anti-humano	Monoclonal F7.2.38	1:150
CD79a	Camundongo Anti-humano	Monoclonal HM57	1:400
MAC387	Camundongo Anti-humano	Monoclonal MAC387	1:100
Ki67	Camundongo Anti-humano	Monoclonal MIB-1	1:100
MHC-II	Camundongo Anti-humano	Monoclonal TAL.1B5	1:400

* DAKO, Glostrup, Denmark.

Após desparafinização e hidratação em uma sequência de xilóis e álcoois, seguiu-se a recuperação antigênica com solução tampão de citrato 10mM pré-aquecido, pH 6,0 em panela de pressão (Pascal, DAKO), de acordo com a programação de tempo e temperatura pré-estabelecida pelo fabricante (DAKO, Glostrup, Denmark) para todos os anticorpos.

Após a recuperação antigênica, as reações foram realizadas de forma automatizada com o uso do Sistema Autostainer (Dako Autostainer), seguindo as recomendações do fabricante, consistindo em bloqueio da peroxidase endógena, lavagem com solução tampão, incubação com anticorpo primário, lavagem, incubação com anticorpo secundário, nova lavagem com solução tampão, incubação com cromógeno DAB e, por fim, lavagem.

Como controle positivo para as reações de CD3, C79a, MAC387 foram utilizadas amostras de baço de cão e para as reações de Ki67 e MHC-II foram utilizadas amostras de linfonodo canino.

Em todas as baterias das reações de imuno-histoquímica, os controles negativos para as imunomarcações foram realizados substituindo o anticorpo primário por diluente específico (Envision Flex Antibody Diluent - DAKO, Glostrup, Denmark).

A observação da imunomarcação das células foi realizada em microscópio de luz Nikon Eclipse Ci-L acoplado a câmera digital e fotomicrografias foram obtidas de 10 campos em aumento de 40x. A contagem de células imunomarcadas foi realizada por seleção aleatória dos 10 campos fotomicrografados e os mesmos foram escolhidos de uma forma que permitisse a avaliação representativa da amostra tumoral. As contagens foram realizadas de maneira cega, ou seja, sem o conhecimento das amostras que estavam sendo avaliadas.

4.15 *Western Blotting*

4.15.1 Preparação das amostras protéicas

As amostras de CTVT e de tecidos de cães saudáveis (amostras controle - testículo, útero, língua) foram congeladas imediatamente após a coleta e mantidas em freezer a -80°C até o momento da realização do procedimento. As amostras foram preparadas previamente à sua utilização e a proteína total foi extraída por

meio da lise direta, com auxílio de seringa e agulha, de 40 mg de amostra tecidual utilizando 200 μ L de tampão de lise, contendo 1mL de tampão R.I.P.A (50mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 1% Triton x100, 1% deoxicolato de sódio, 0,1% dodecil sulfato de sódio - SDS, 1mM EDTA), 50 μ L EDTA (0,2m pH 7.2) e 10 μ L de solução de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (0,1M). Os tubos contendo as amostras lisadas foram mantidos em gelo por 15 minutos e, em seguida, centrifugados por 14.000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo.

4.15.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Utilizando o equipamento XCell Sure Lock Mini-Cell – Invitrogen (Paisley, Scotland, UK), a eletroforese de proteínas foi realizada em gel (1mm, gradiente de poliacrilamida 4-12%) NuPAGE® Novex Bis-Tris Protein Gel - Life Technologies (Carlsbad, California, USA).

Para permitir o acesso do anticorpo ao epítipo específico, as proteínas do lisado foram desnaturadas utilizando uma diluição de 4:1 com tampão de amostra, ou seja, 30 μ L de amostra (lisado) foram adicionados a 10 μ L de tampão redutor e não redutor (4x). As amostras foram homogeneizadas e aquecidas a 70°C durante 10 minutos. Em seguida, estas foram diluídas em tampão redutor e não redutor (1x) na proporção de 1:5, 1:10, 1:20 e 1:100.

As amostras (15 μ L) foram depositadas em poços de 4-12% Bis-Tris NuPAGE® mini-géis (mini-poços). Um dos poços foi preenchido com 10 μ L de um marcador de peso molecular (Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard - Life Technologies, Carlsbad, California, USA). A câmara interior do XCell Sure Lock Mini-Cell foi preenchida com aproximadamente 400 mL de tampão de corrida - tampão MES 1x (Apêndice F).

A eletroforese foi realizada a 200V à temperatura ambiente durante 50 minutos, ou seja, até que o marcador de peso molecular estivesse a 0,5 cm da borda inferior da placa.

4.15.3 Transferência das bandas protéicas

Após eletroforese, a transferência das bandas protéicas para a membrana de nitrocelulose (Immun-Blot PVDF Membrane – Bio-Rad, Hercules, California, EUA) foi realizada com auxílio do Bio-Rad Mini-Protean II – Bio-Rad (Hercules, California, EUA). Cortou-se a folha de membrana de nitrocelulose (poro de 0,2 μ m, Bio-Rad) de acordo com o tamanho do gel e esta foi umedecida com metanol e, em seguida, com tampão de transferência (Apêndice F). Os papéis de filtro foram também cortados e umedecidos em tampão de transferência. Os papéis de filtro, a membrana de nitrocelulose e o gel foram dispostos em uma cuba de transferência, segundo recomendação do fabricante. A transferência foi realizada com voltagem de 150V/350mA/60w durante 1 hora.

4.15.4 Incubação com anticorpo primário

Após a transferência das bandas protéicas do gel para a membrana de nitrocelulose, esta foi bloqueada em solução PBST (50 mL tampão PBS tween - Apêndice F; 2,5g de leite desnatado em pó), durante no mínimo, 30 minutos em constante movimentação. Posteriormente, esta mesma solução foi diluída com PBS Tween 1:10 e a membrana foi então incubada utilizando-se como anticorpo primário soro de cão portador de CTVT (anti-soro) diluído em PBST 1:10 em uma proporção de 1:100 durante 3 horas à temperatura ambiente em constante movimentação.

O controle negativo foi realizado sem a adição do anticorpo primário e o controle positivo foi realizado com a utilização do anticorpo primário anti-tubulina.

4.15.5 Incubação com anticorpo secundário

Após esta incubação, a membrana foi lavada três vezes, durante 5 minutos, em solução de lavagem (PBST 1:10). Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário: anti-IgG de cão produzido em cabra acoplado à fosfatase alcalina - Sigma (St Louis, Missouri, EUA) e anti-IgG de coelho produzido em camundongo, quando da utilização do anticorpo primário anti-tubulina, durante 1 hora à temperatura ambiente em constante movimentação. Novamente a membrana foi lavada três vezes, durante 10 minutos, em solução TBST (Apêndice F) e, em

seguida, procedeu-se a revelação.

Para detecção da reação imunológica adicionou-se o substrato cromógeno específico para fosfatase alcalina - Novex AP Chromogenic Substrate BCIP/NBT - Life Technologies (Carlsbad, California, USA). A reação foi interrompida lavando-se a membrana exaustivamente com água destilada.

4.16 Coloração com Coomassie Brilliant Blue

Para realização dessa técnica foram utilizadas duas amostras de lisados tumorais (756TF e 768TF), as quais apresentaram bandas proteicas bastante evidentes em ambas posições (39kDa e 45kDa), identificadas por meio da técnica de *Western Blotting* já descrita. Após corrida eletroforética, o gel foi removido do aparato de eletroforese e submerso durante cinco minutos em solução pré-coloração. Em seguida, foi mantido em solução corante de Coomassie brilliant blue a 0,5%, durante 10 minutos, em constante movimentação. Após lavagem do gel em água destilada, foi utilizada solução descolorante (20% de Metanol e 7% de Ácido acético), a qual proporcionou a descoloração lenta do gel até a visibilização das bandas correspondentes às proteínas.

4.17 Espectrometria de massa

Imediatamente após coloração com coomassie brilliant blue, o gel (1D minigel) foi encaminhado para o Laboratório de Proteômica (Cambridge Centre for Proteomics/Cambridge System Biology Centre – University of Cambridge) para realização da técnica de espectrometria de massa. Esta técnica permite a identificação das sequências proteicas a partir da medida da relação massa/carga de seus íons, a fim de investigar a identidade das bandas proteicas visualizadas na posição de peso molecular aproximada de 39kDa e 45kDa.

As bandas de gel 1D foram excisadas e transferidas para uma placa de PCR de 96 poços. As mesmas foram cortadas em pedaços de 1mm², descoradas, reduzidas (ditioltreitól) e alquiladas (iodoacetamida), e então submetidas à digestão enzimática pela tripsina durante oito horas a 37°C. Após a digestão, o sobrenadante foi transferido para um tubo e, então, carregou-se em um amostrador automático para análise automatizada pelo método LC-MS/MS.

Todo experimento LC-MS/MS foi realizado utilizando o sistema nanoAcquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA) e o espectrômetro de massa de alta resolução LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Waltham, MA). A separação dos peptídeos foi realizada por cromatografia em fase reversa utilizando nano coluna de fase reversa (BEH C18, 75 μm i.d x 250 mm, 1,7 μm – tamanho de partícula) a uma taxa de fluxo de 300 nL/min. Os peptídeos foram, inicialmente, carregados em uma pré-coluna (Waters UPLC Trap Symmetry C18, 180 μm i.d x 20 mm, 5 μm – tamanho de partícula) a partir do nanoAcquity com ácido fórmico a 0,1% durante 5 minutos a uma taxa de fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Após este período, a válvula de coluna foi trocada para permitir a eluição de peptídeos da pré-coluna para a coluna analítica. O solvente A foi água + 0,1% de ácido fórmico e o solvente B foi acetonitrilo + 0,1% de ácido fórmico. O gradiente linear utilizado foi 5-40% de B em 60 minutos.

O eluente LC foi borrifado no espectrômetro de massa utilizando um emissor de nanospray (New Objective). Todos os valores m/z dos íons de eluição foram mensurados no analisador de massa Orbitrap Velos, a uma resolução de 30000. Os melhores vinte dados escaneados foram utilizados para isolar e gerar fragmentos iônicos por dissociação induzida por colisão, resultando na geração de espectros de massas MS/MS. Íons com cargas 2+ e acima foram selecionados para fragmentação.

Posteriormente os dados foram processados utilizando Protein Discoverer (versão 1.3, ThermoFisher). Em resumo, todos os dados MS/MS foram convertidos à extensão mgf e então, submetidos ao algoritmo de busca Mascot (Matrix Science, London UK) e comparados com o NCBI ou UniProt Canis Familiaris utilizando uma modificação de carbamidomethyl fixo e modificações variáveis de oxidação (M) e desamidação (NQ). Os peptídeos e a tolerância de massa dos fragmentos foram ajustadas para 25 ppm e 0,8 Da, respectivamente. Um valor limite de significância de $p < 0,05$ e um escore de ponto de corte do peptídeo de 20 foram também utilizados.

4.18 Análise estatística

Para avaliação dos resultados obtidos na amplificação do rearranjo LINE-1/c-myc e detecção de CDKN2A foi realizado o teste de Mann-Whitney.

Para comparação dos resultados obtidos no sequenciamento genético entre os animais do grupo controle versus hospedeiro, o teste Exato de Fisher e Quiquadrado foram utilizados e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Para associação entre os valores da expressão proteica (CD3, CD79a, MAC387, Ki67 e MHC-II) e expressão gênica (*DLADQA-1*) nos grupos amostrais foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$. Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6.

5 RESULTADOS

5.1 Dados epidemiológicos

Os pacientes do presente estudo, provenientes de São José do Rio Preto/SP/Brasil, segundo as coordenadas geográficas: latitude 20° 49' 13" Sul e longitude 49° 22' 47" Oeste, apresentaram faixa etária média de 4,5 anos ($4,5 \pm 1,73$ anos). Com relação à raça, 70% (14/20) eram cães sem raça definida, seguidos pelos Shih Tzu e Border Collie com 10% (2/20); Pit Bull e Poodle com 5% (1/20). Quanto ao gênero, 65% (13/20) eram fêmeas e 35% (7/20) machos. Na avaliação do *status* reprodutivo, 95% não eram castrados e 55% dos animais eram domiciliados. Quanto à localização, 95% apresentaram somente envolvimento genital, sendo 55% (11/20) vaginal, 25% (5/20) peniano, 10% (2/20) vulvar e vaginal, 5% (1/20) com acometimento de prepúcio, pênis e pálpebra e 5% (1/20) com envolvimento exclusivo da cavidade nasal.

5.2 Exame citológico e histopatológico

Os achados citológicos identificados foram células redondas ou ovaladas com bordos citoplasmáticos bem delimitados; núcleo redondo ou oval, frequentemente excêntrico, de tamanho variável com cromatina grosseiramente granular e com um ou

dois nucléolos proeminentes; citoplasma discretamente basofílico com múltiplos vacúolos pequenos e claros (Figura 5A).

As amostras tumorais, em M1 e M2, apresentaram padrão histológico típico de CTVT, caracterizado por células grandes e redondas, ligeiramente ovais ou poliédricas; presença de núcleo grande e arredondado com nucléolo único e proeminente e citoplasma finamente granular, vacuolizado e eosinofílico. A presença de figuras de mitoses foi identificada em graus variáveis (Figura 5B). A contagem de figuras de mitose revelou-se maior em M1 quando comparada ao M2, entretanto, não houve diferença significativa ($p=0,2902$) entre ambas as fases.

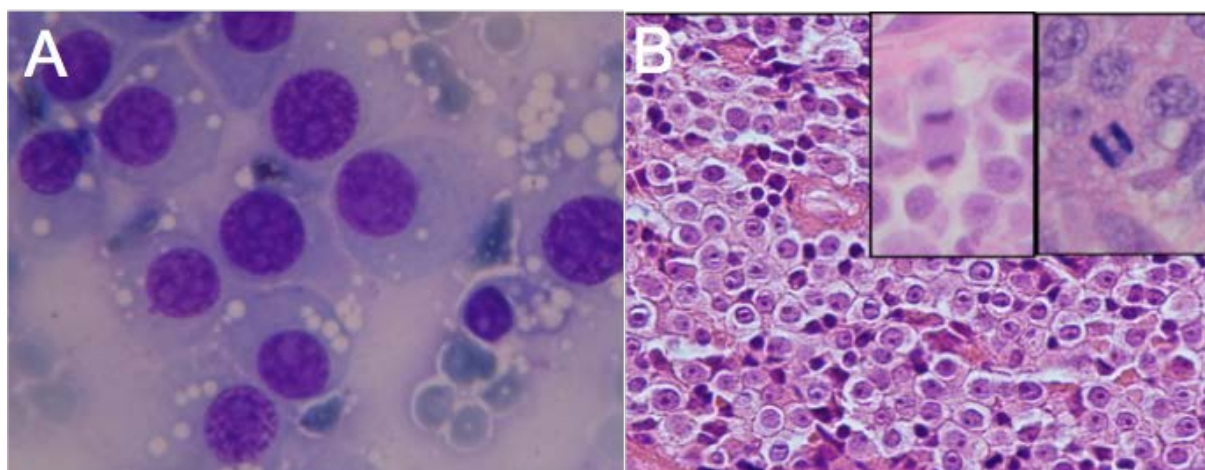


Figura 5. Fotomicrografias de CTVT. Aspecto citológico (5A) e histopatológico (5B), ilustrando figuras de mitose em anáfase (H&E; 40x; 30 μ m).

5.3 Rearranjo LINE-1/c-myc

Para confirmar o diagnóstico de CTVT nas 20 amostras tumorais estudadas provenientes do Brasil, a técnica de qPCR foi conduzida para detecção do rearranjo LINE-1/c-myc, que deve estar presente em todas as amostras de CTVT (KATZIR et al., 1985; AMARIGLIO et al., 1991). Os resultados mostraram que o rearranjo LINE-1/c-myc foi detectado em todas as 20 (20/20) amostras de CTVT em M1 (Figura 6A), em 3 (3/9) amostras de CTVT em M2 (Figura 6B) e não foi detectado em amostras de sangue de seus hospedeiros correspondentes (Figura 6C e 7A). Não houve diferença entre os resultados obtidos em M1 e M2 ($p=0,1579$) (Figura 7B).

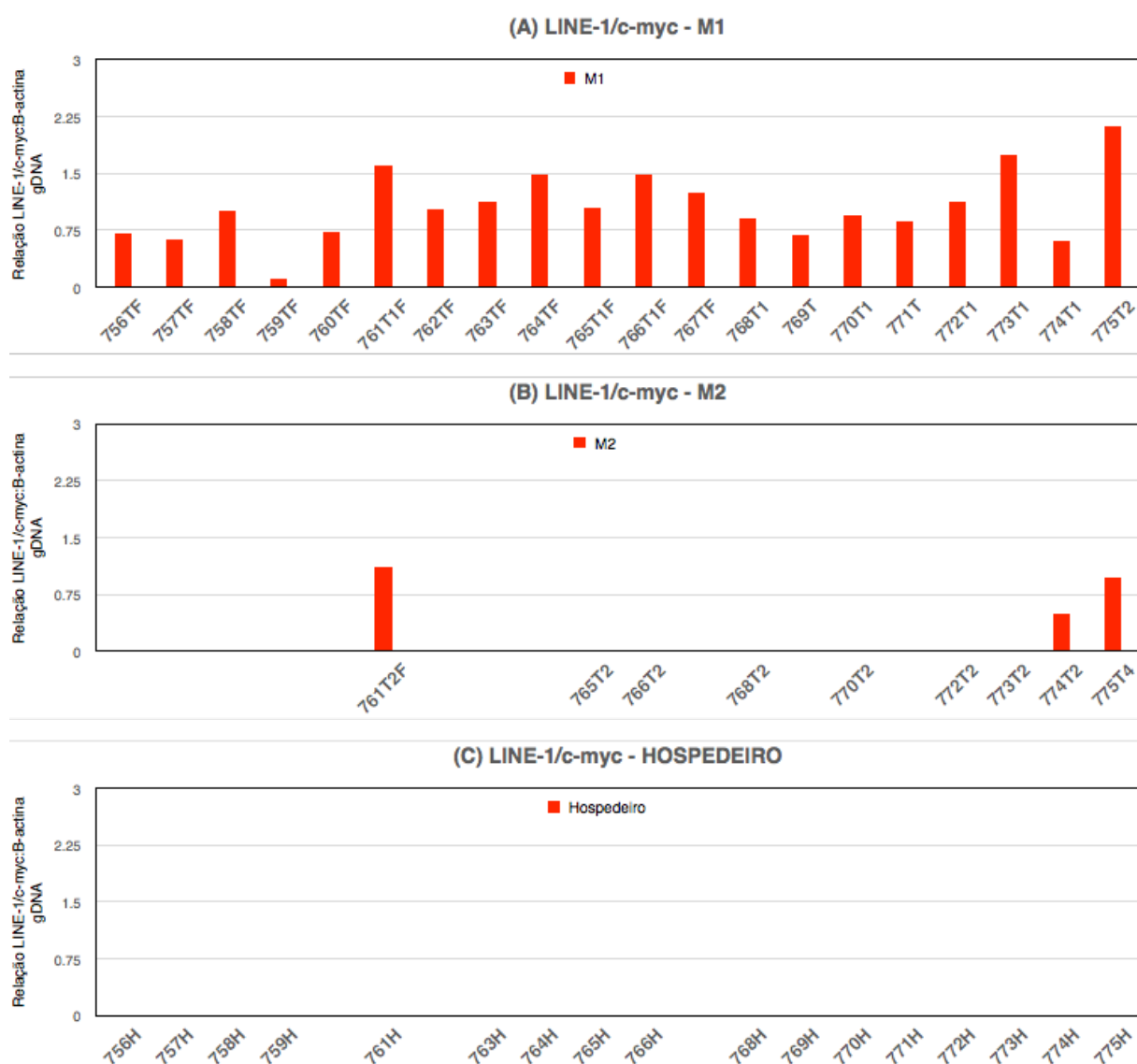


Figura 6. Representação gráfica da detecção do rearranjo LINE-1/c-myc pela técnica de qPCR, a partir de amostras de gDNA. O rearranjo LINE-1/c-myc foi detectado em todas as amostras de CTVT em M1 (6A), em 3 amostras de CTVT em M2 (6B) e ausente em todas as amostras de sangue de seus hospedeiros correspondentes (6C). As amostras tumorais estão descritas pelo número da amostra seguido da letra T ou TF (ex. 765T/767TF) e as amostras do hospedeiro (sangue) finalizadas com a letra H (ex. 765H). A ausência de amostras de alguns tumores em M2 e de alguns hospedeiros, devido à indisponibilidade das mesmas, estão representadas pela ausência de identificação.

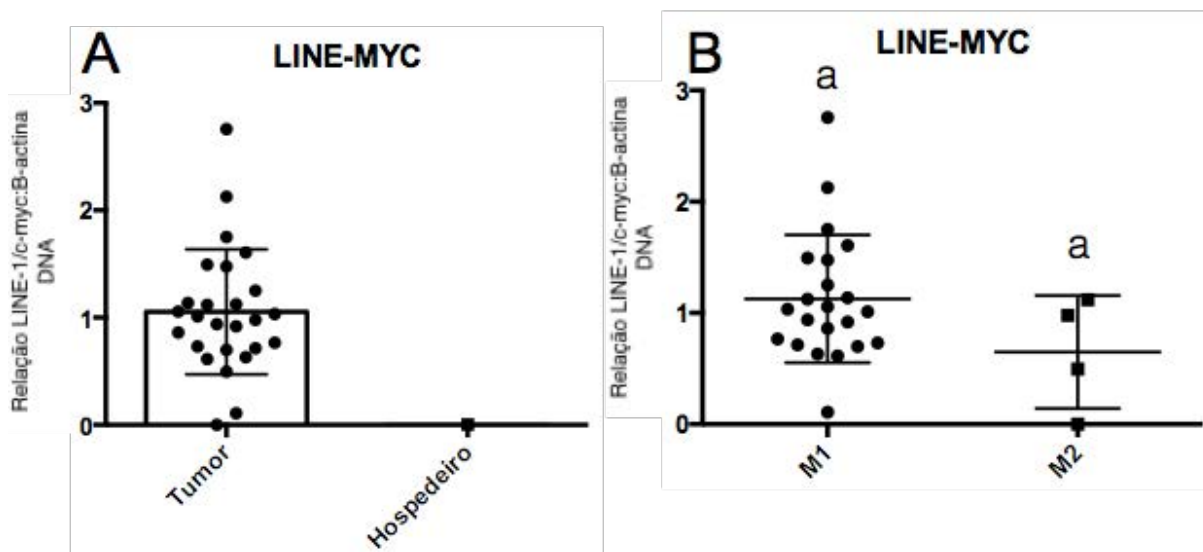


Figura 7. Comparação dos resultados obtidos na detecção do rearranjo LINE-1/c-myc por qPCR, a partir de amostras de gDNA, entre as amostras de tumor e hospedeiro (sangue), e entre ambas fases de progressão. **(A)** O rearranjo LINE-1/c-myc foi detectado nas amostras tumorais e apresentou-se ausente em todas as amostras de sangue dos hospedeiros. **(B)** Não houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos em M1 e M2 ($p=0,1579$). Letras iguais denotam ausência de significância ($p<0,05$) pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

5.4 Detecção do gene CDKN2A

Os resultados demonstraram que CDKN2A foi detectado em todas as amostras de CTVT em ambas as fases (M1 e M2) (Figura 8A e 8B) e, também, nas amostras de sangue de seus hospedeiros (Figura 8C). Os resultados mostraram níveis mais elevados de CDKN2A em amostras de sangue dos hospedeiros em comparação com amostras de tumores em ambas as fases ($p<0,0001$) (Figura 9A), fato já esperado devido à deleção homozigótica deste gene em amostras de CTVT. Detectou-se níveis inferiores de CDKN2A em amostras de tumor em M1 quando comparados com M2 ($p=0,0002$) (Figura 9B).

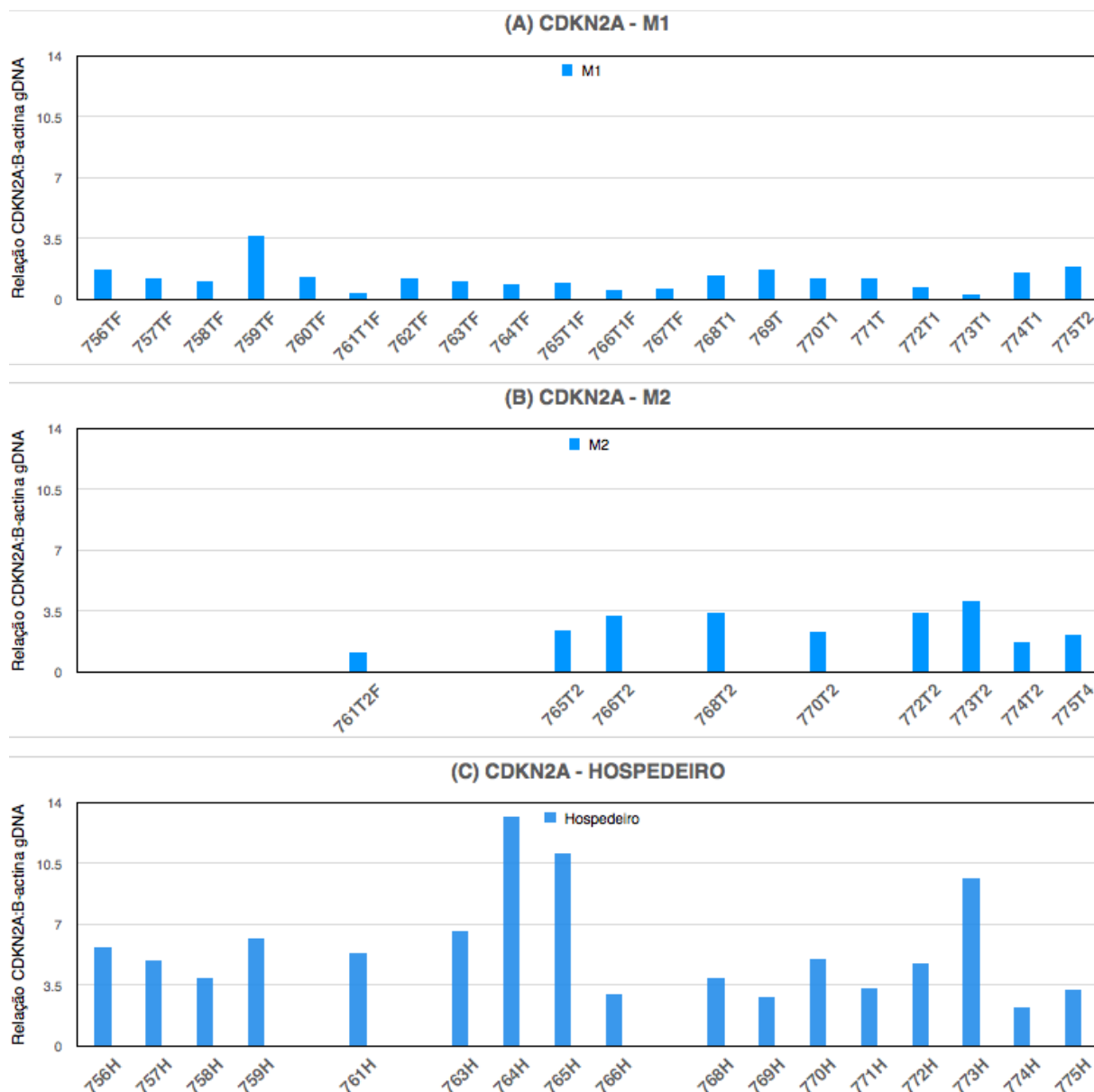


Figura 8. Representação gráfica de CDKN2A por meio da técnica de qPCR a partir de amostras de gDNA. O gene CDKN2A foi detectado em todas as amostras tumorais em ambas fases de desenvolvimento (8A e 8B) e também em seus hospedeiros correspondentes (8C) e, ainda, apresentou-se em níveis mais elevados nas amostras de sangue dos hospedeiros quando comparado às amostras tumorais (8C). As amostras tumorais estão descritas pelo número da amostra seguido da letra T ou TF (ex. 765T/767TF) e as amostras do hospedeiro (sangue) finalizadas com a letra H (ex. 765H). A ausência de amostras de alguns tumores em M2 e de alguns hospedeiros, devido à indisponibilidade das mesmas, estão representadas pela ausência de identificação.

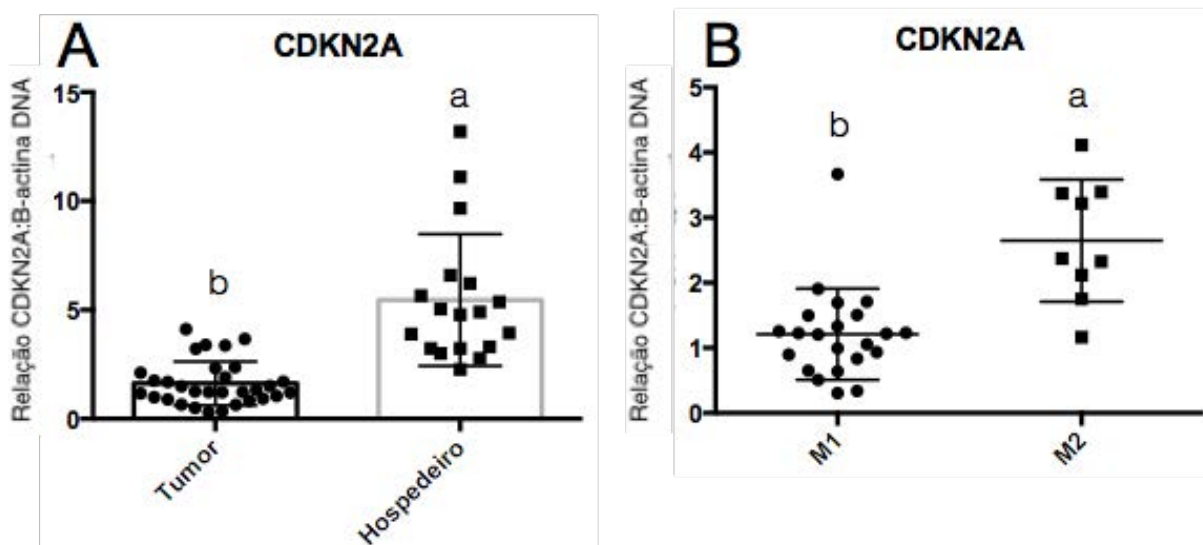


Figura 9. Comparação dos resultados obtidos na detecção do gene CDKN2A por qPCR, a partir de amostras de gDNA, entre as amostras de tumor e hospedeiros, e entre ambas fases de progressão. **(A)** Foi observada diferença estatística significativa dos resultados obtidos entre tumores e hospedeiros, os quais apresentaram-se mais elevados nos hospedeiros quando comparados aos tumores ($p < 0.0001$). **(B)** Foi observada diferença estatística significativa entre os resultados obtidos em M1 e M2 ($p = 0,0002$), os quais apresentaram-se mais elevados em M2 quando comparados à M1. Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

5.5 Amplificação e expressão gênica de DLADQA-1 (MHC-II)

Havia a hipótese de que DLADQA-1 pudesse estar presente em todas as amostras de gDNA das células de CTVT em níveis semelhantes, com ausência ou pouca expressão de DLADQA-1 tumor alelo-específico em amostras de cDNA. Confirmada a hipótese, DLADQA-1 tumor alelo específico foi detectado em todas as 20 (20/20) amostras de CTVT em M1 e em 3 (3/9) amostras de CTVT em M2 (10A), dados semelhantes com aqueles observados na detecção do rearranjo LINE-1/c-myc. DLADQA-1 não alelo específico foi detectado em todas as amostras de CTVT em M1 e M2 (10B). Houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos em M1 e M2, os quais se apresentaram mais elevados em M1 quando comparado a M2, tanto em DLADQA-1 tumor alelo específico ($p = 0,0273$) como de DLADQA-1 não alelo específico ($p = 0,0017$) (Figura 11A e 11B).

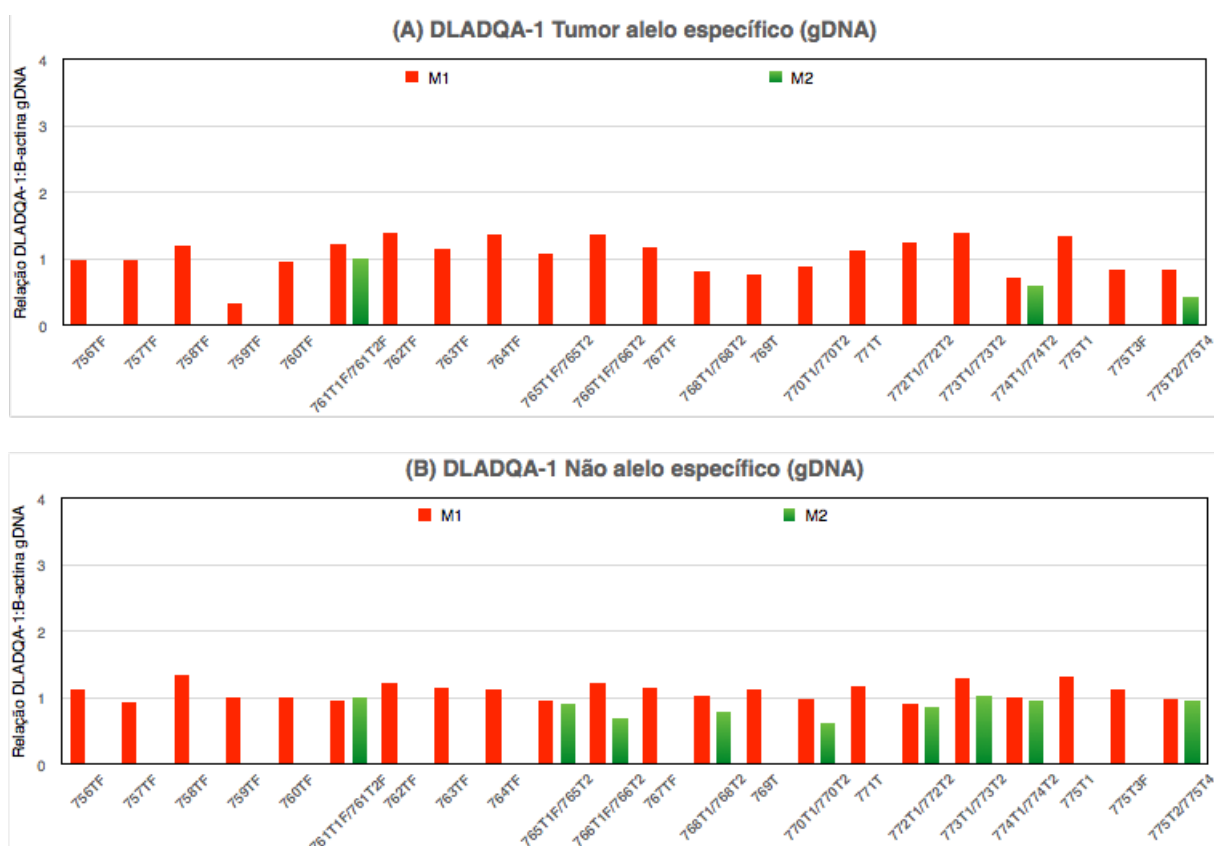


Figura 10. Representação gráfica da detecção de DLADQA-1 por meio da técnica de qPCR a partir de amostras de gDNA. DLADQA-1 tumor alelo específico foi detectado em todas as 20 (20/20) amostras de CTVT em M1 e em 3 (3/9) amostras de CTVT em M2 (10A). DLADQA-1 não alelo específico foi detectado em todas as amostras de CTVT em ambas fases de progressão (10B). As amostras tumorais estão descritas pelo número da amostra seguido da letra T ou TF (ex. 765T/767TF) e as amostras do hospedeiro (sangue) finalizadas com a letra H (ex. 765H). As amostras com numeração única representam as amostras coletadas somente em M1.

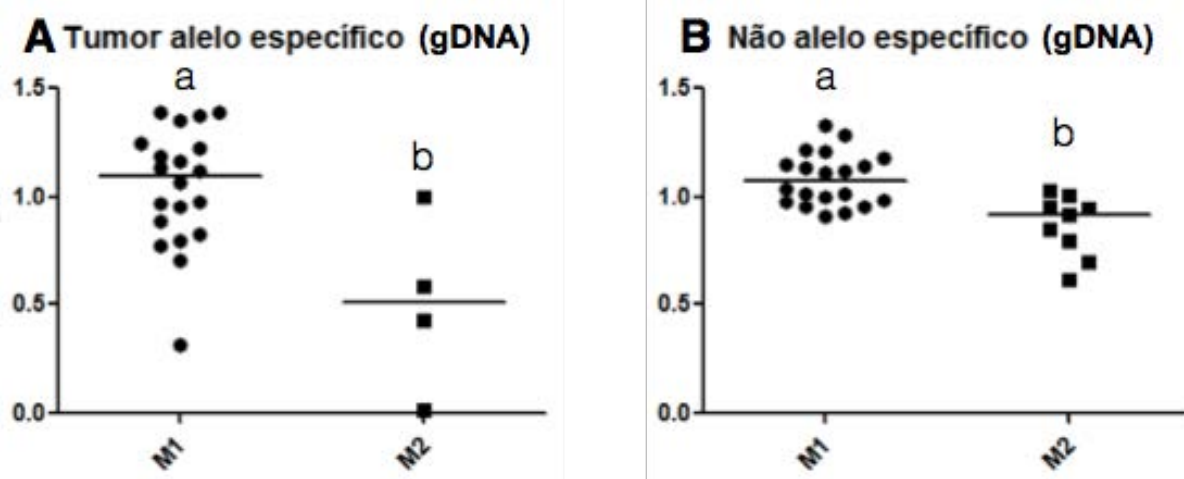


Figura 11. Comparação dos resultados obtidos na amplificação de DLADQA-1 tumor alelo específico (11A) e DLADQA-1 não alelo específico (11B) por qPCR, a partir de amostras de gDNA tumoral, entre os dois momentos. Foi observada diferença estatística significativa entre os resultados obtidos entre M1 e M2, os quais apresentaram-se mais elevados em M1 quando comparados a M2, tanto com a utilização dos oligonucleotídeos DLADQA-1 tumor alelo específico ($p=0,0273$) como de DLADQA-1 não alelo específico ($p=0,0017$). Letras diferentes denotam significância ($p<0,05$) pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Não houve expressão gênica, em amostras de cDNA, de *DLADQA-1* tumor alelo específico em nenhuma amostra de CTVT em M1 e M2 (Figura 12A). Detectou-se expressão gênica de DLADQA-1 não alelo específico em todas as amostras de CTVT em M1 e M2, com maior expressão em M2 (Figura 12B). Essa expressão observada provavelmente refere-se às células hospedeiras, já que não foi detectada a expressão gênica quando da utilização dos oligonucleotídeos específicos ao tumor. Não foi observada diferença estatística significativa dos resultados da expressão gênica de DLADQA-1 tumor alelo específico entre M1 e M2 ($p=0,8571$) (Figura 13A), entretanto, foi observada diferença estatística significativa na expressão gênica de DLADQA-1 não alelo específico entre M1 e M2, os quais se apresentaram mais elevados em M2 ($p=0,0089$) / (Figura 13B).

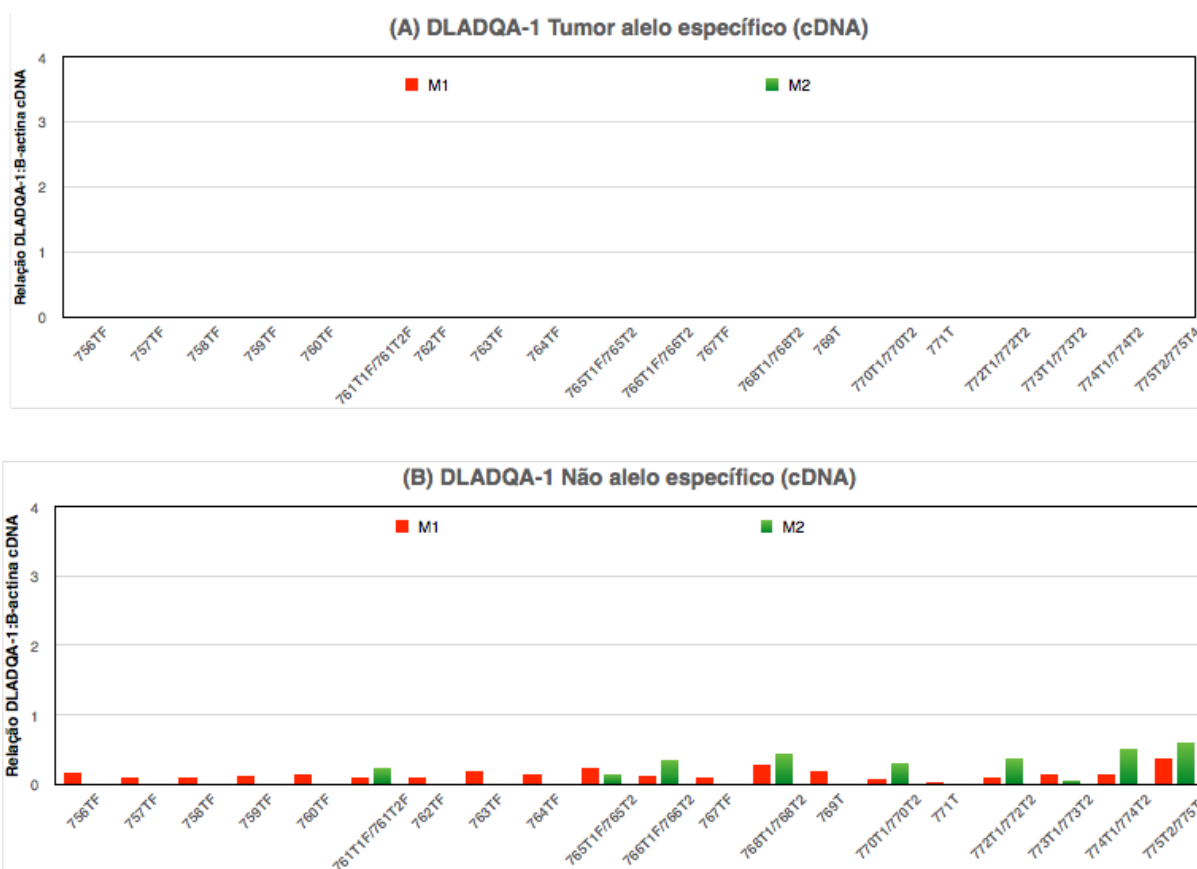


Figura 12. Representação gráfica da expressão gênica de DLADQA-1 por RT-qPCR, a partir de amostras de cDNA. Não foi observada expressão gênica de DLADQA-1 tumor alelo específico em nenhuma amostra de CTVT em ambas fases de progressão (12A). Detectou-se expressão gênica de DLADQA-1 não alelo específico em todas as amostras de CTVT em ambas fases de progressão, com maior expressão em M2 (12B). As amostras tumorais estão descritas pelo número da amostra seguido da letra T ou TF (ex. 765T/767TF) e as amostras do hospedeiro (sangue) finalizadas com a letra H (ex. 765H). As amostras com numeração única representam as amostras coletadas somente em M1.

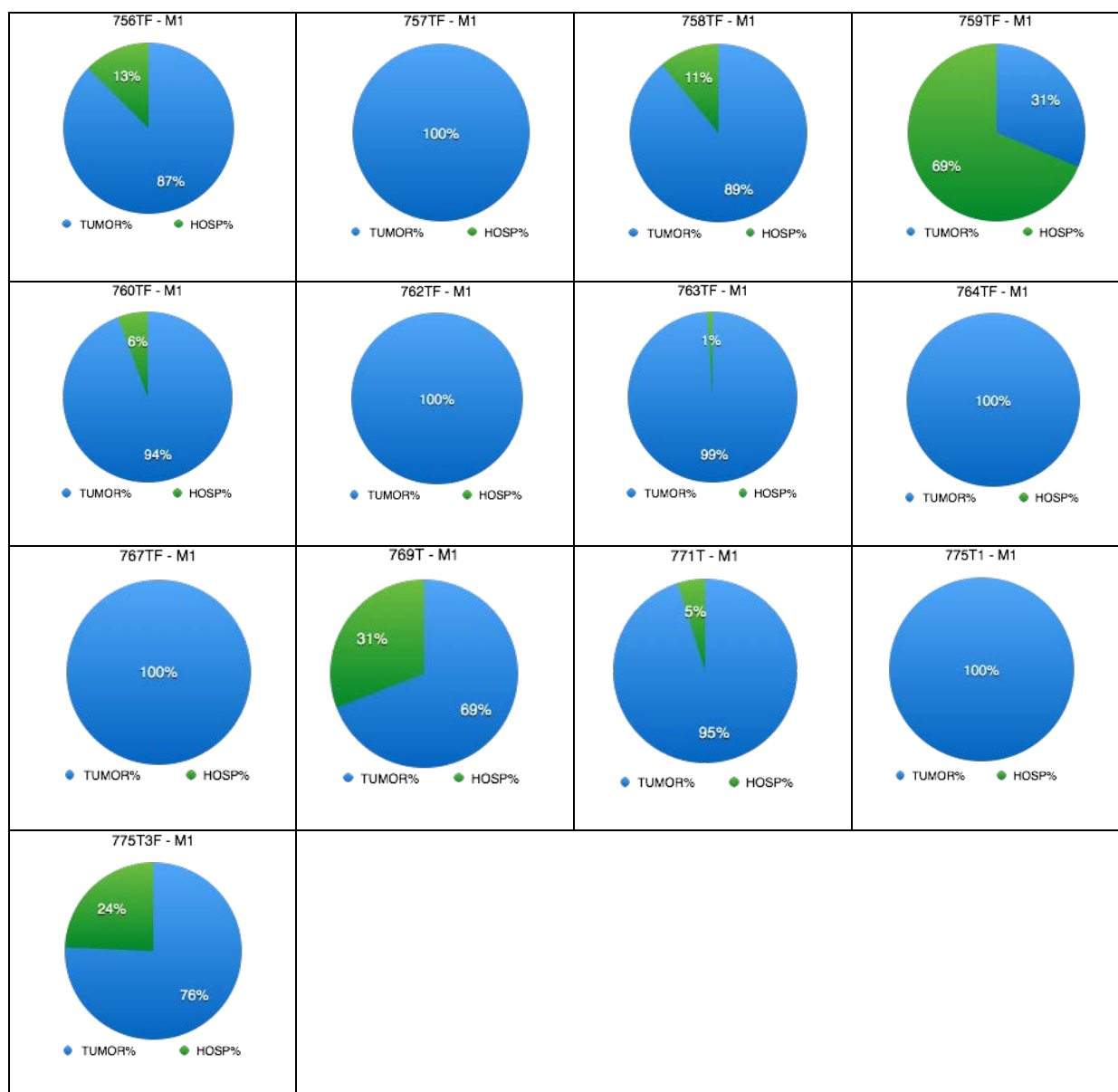


Figura 14. Esquema ilustrativo da proporção de DLADQA-1 de tumor e hospedeiro em amostras de gDNA coletadas somente na fase M1. A porção ilustrada na cor verde representa as cópias de DLADQA-1 em gDNA do hospedeiro. A porção ilustrada em azul representa as cópias tumorais de DLADQA-1 (gDNA).

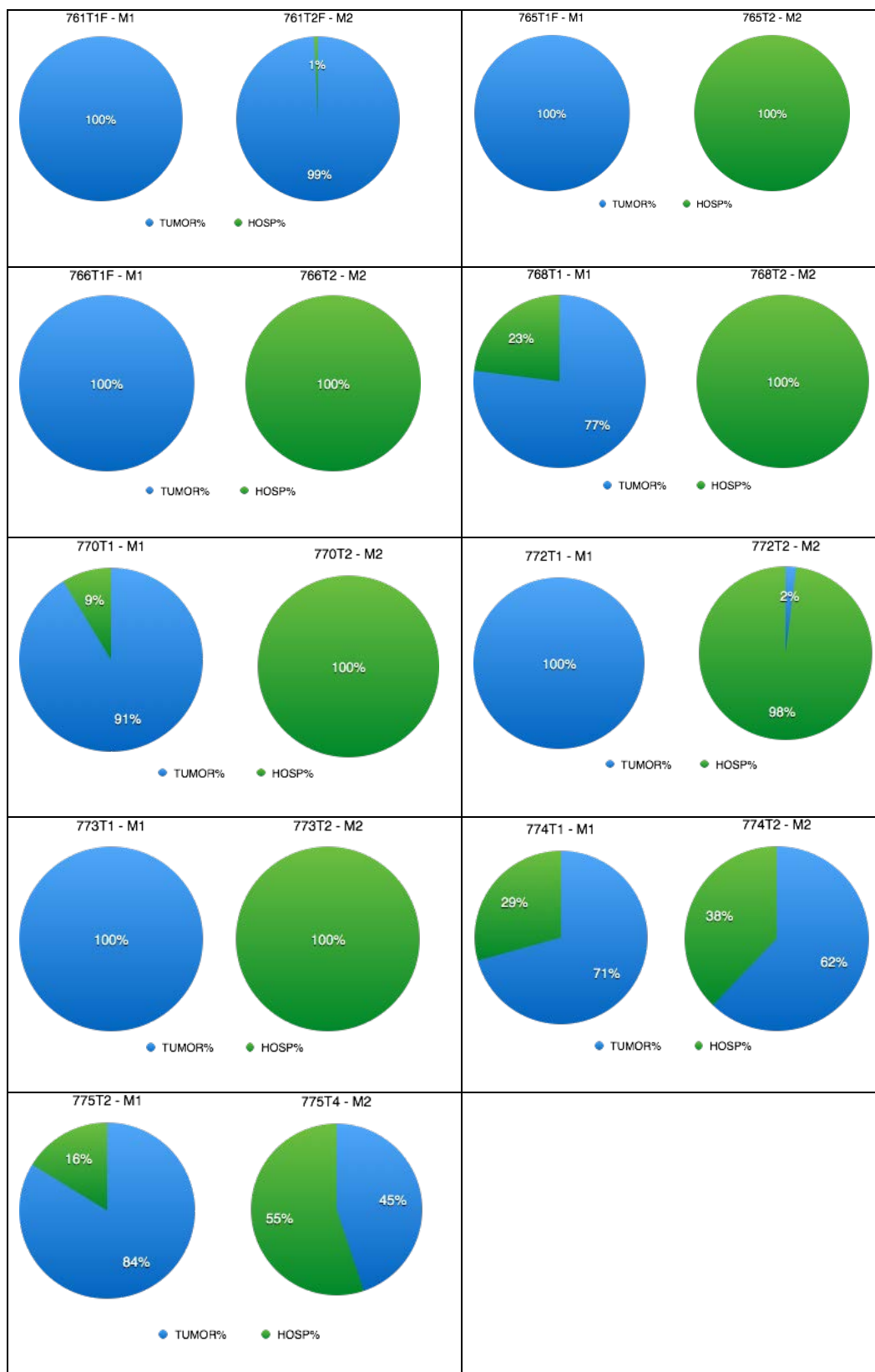


Figura 15. Esquema ilustrativo da proporção de DLADQA-1 de tumor e hospedeiro em amostras de gDNA coletadas em M1 e M2 do mesmo hospedeiro. A porção ilustrada na cor verde representa as cópias de DLADQA-1 (gDNA) do hospedeiro como proporção do total de DLADQA-1 detectado em amostras de gDNA. A porção ilustrada em azul representa as cópias tumorais de DLADQA-1 em amostras de gDNA.

Embora DLADQA-1 tumor alelo-específico tenha sido detectado nas amostras de gDNA, não houve expressão de DLADQA-1 tumor alelo específico em amostras de cDNA (Figura 16 e 17). Isto sugere que DLADQA-1 não é, significativamente, expresso em células de CTVT e que a expressão de DLADQA-1 foi atribuída ao alelo do hospedeiro tanto em M1 como em M2.

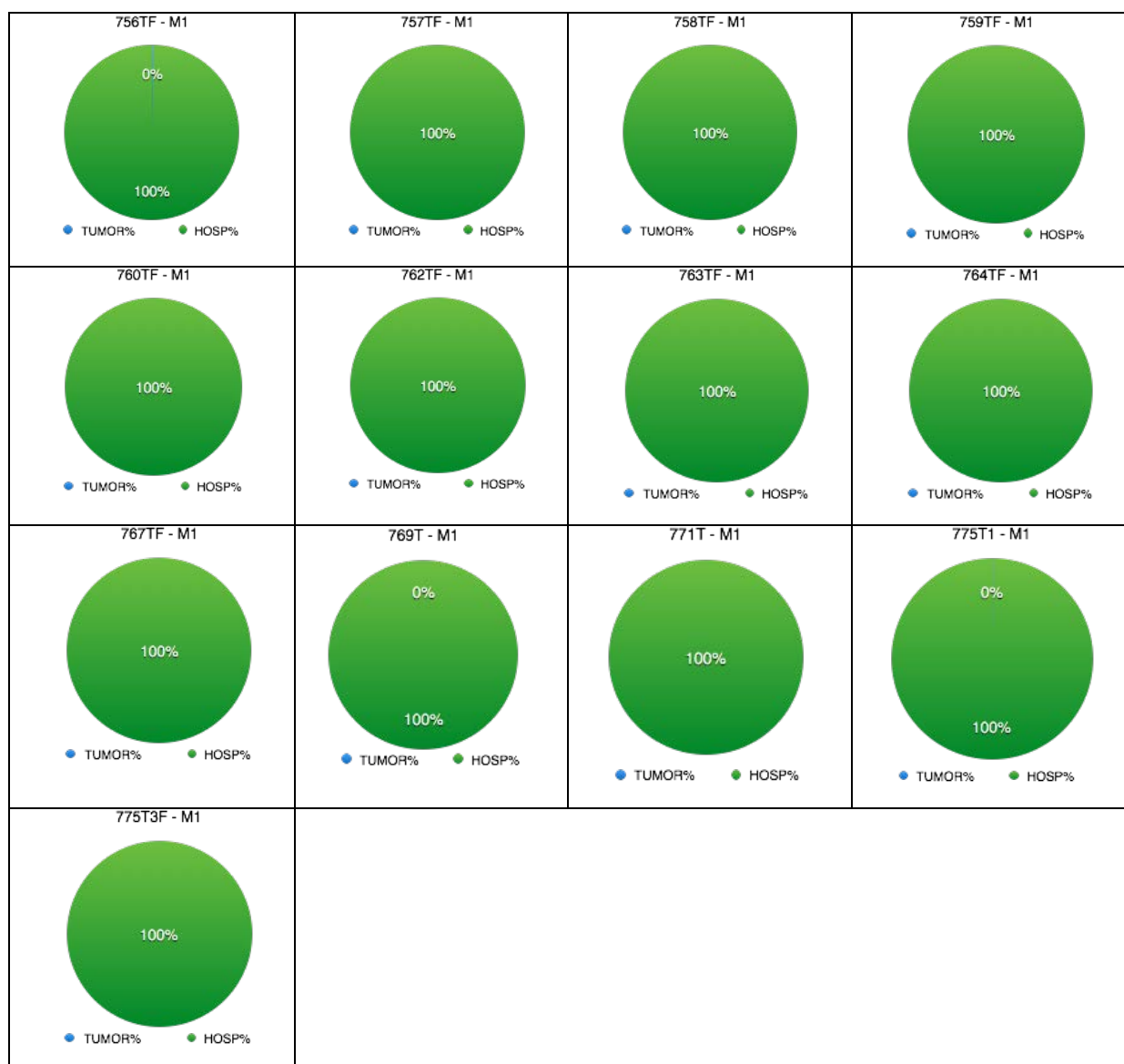


Figura 16. Esquema ilustrativo da proporção de DLADQA-1 de tumor e hospedeiro em amostras de cDNA coletadas somente na fase M1. A porção em cor verde representa a expressão de DLADQA-1 cDNA do hospedeiro como proporção do total de DLADQA-1 detectado.

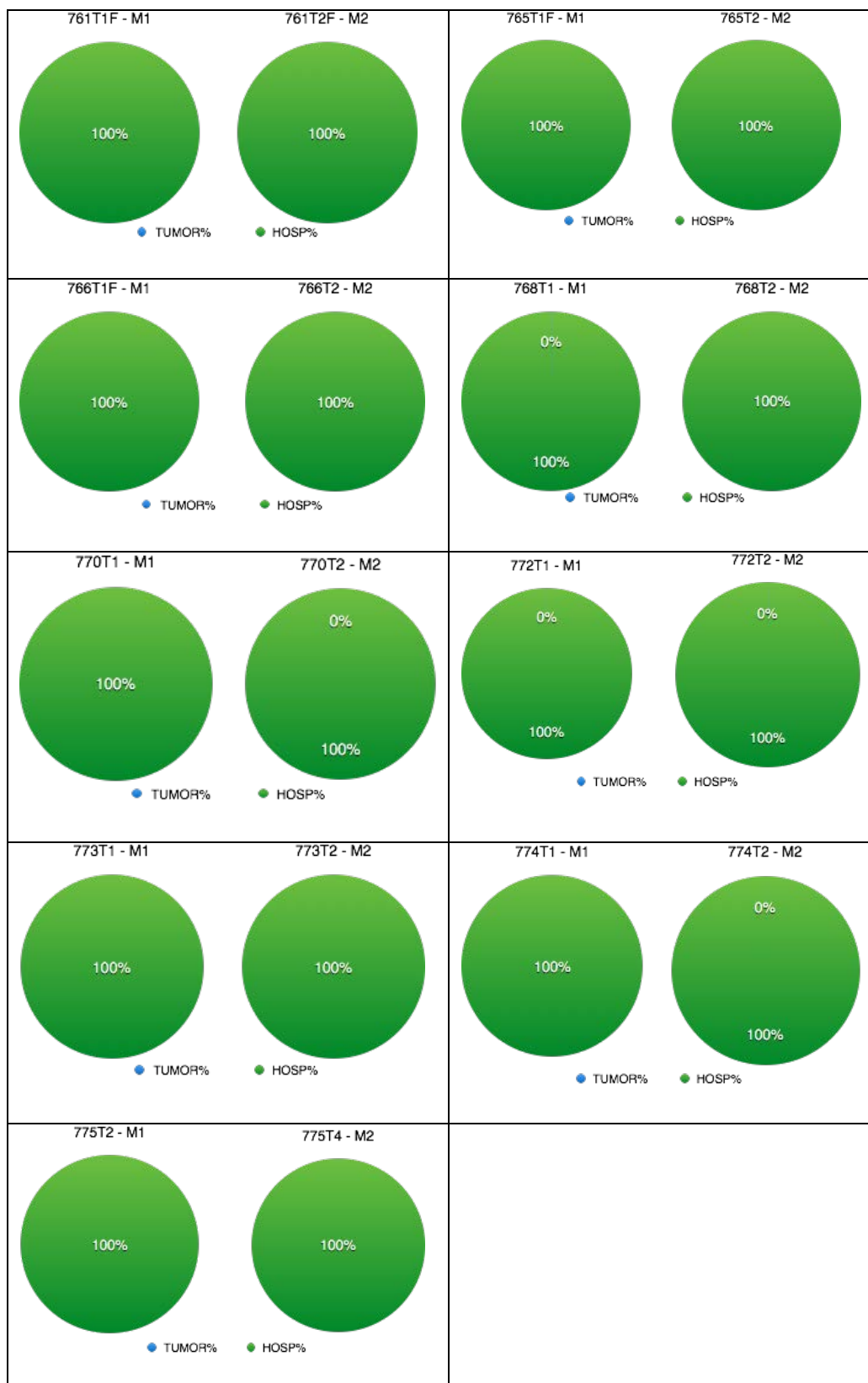


Figura 17. Esquema ilustrativo da proporção de DLADQA-1 de tumor e hospedeiro em amostras de cDNA coletadas nas fase M1 e M2 do mesmo hospedeiro. A porção em cor verde representa a expressão de DLADQA-1 do hospedeiro como proporção do total de DLADQA-1.

5.7 Caracterização genotípica do loco DLADQA-1 (Sequenciamento)

Foi realizado o sequenciamento do loco DLADQA-1 (exon 2) em 17 amostras tumorais e em amostras de sangue de seus hospedeiros correspondentes (Figura 18), e em 20 amostras (sangue) dos animais controle.

A análise genotípica do loco DLADQA-1 foi conduzida pela comparação das sequências obtidas dos 17 tumores e seus respectivos hospedeiros com o genoma do cão referência, de acordo com CanFam3.1 *dog genome assembly - Ensembl*. Dezesesseis posições variantes foram identificadas dentro da região amplificada; dentre elas, oito encontradas nos tumores e doze nos hospedeiros (Figura 18). Posteriormente, a presença ou ausência dessas variantes identificadas no atual estudo foram analisadas e comparadas com genomas de CTVT's previamente sequenciados (MURGIA et al., 2006; MURCHISON et al., 2014).

5.7.1 Genótipo tumoral

Através das sequências analisadas, não houve evidências suficientes para nomear, com precisão, heterozigosidade nos tumores, já que houve presença de contaminação por células hospedeiras e, assim sendo, não foi possível distinguir essas duas variáveis (Figura 18).

No exemplo ilustrado na Figura 19 (A), pode-se nomear heterozigose T/C no hospedeiro (757H), mas não há informação suficiente para nomear o tumor (757TF) como heterozigoto, já que T/C também corresponde ao hospedeiro. O pico duplo T/C presente no tumor pode ser oriundo da contaminação por células do hospedeiro de um genótipo originalmente homozigoto, ou uma heterozigosidade real. Assim, pode-se concluir apenas que o tumor apresenta o mesmo genótipo do hospedeiro. Na Figura 19 (B), como o hospedeiro (759H) é homozigoto (C), foi possível afirmar que a base é exclusiva do tumor e assegurar que não é proveniente do hospedeiro. Dessa forma, o tumor (759TF) foi nomeado como homozigoto T (vermelho), já que a base C (azul), seria proveniente do hospedeiro. Assim, a inspeção mais detalhada do nível de contaminação da amostra 759TF, somados aos resultados de CDKN2A, descritos anteriormente, também apontam para a homozigose T desse tumor, isto devido aos altos níveis de contaminação por células do hospedeiro, o que explicaria o pico C presente na amostra.

Sete das 17 amostras tumorais apresentaram genótipos idênticos e as demais (n=10) amostras tumorais (756TF, 757TF, 759TF, 763TF, 768T1, 769T, 771T, 772T1, 774T1 e 775T2) mostraram uma possível heteroziguidade. Todavia, a presença de genótipo heterozigoto de seus hospedeiros correspondentes impediu a conclusão de forma definitiva. Tais dados foram apresentados na Figura 18 como (H), símbolo utilizado para demonstrar que o genótipo tumoral é o mesmo genótipo apresentado pelo hospedeiro.

O elevado grau de semelhança entre as amostras tumorais apresentadas no presente estudo e ilustradas na Figura 18, condiz com a base clonal de transmissão do CTVT.

De acordo com as coordenadas de CanFam3.1 *dog genome assembly*, as variantes identificadas nas posições 12: 2225056, 12: 2225194, 12: 2225195 e 12: 2225333 apresentaram-se exclusivamente nas 17 amostras tumorais, sendo as mesmas não identificadas em nenhuma amostra dos animais hospedeiros (Figura 18). Reciprocamente, as variantes nas posições 12:2225015, 12: 2225300, 12: 2225320 e 12: 2225338 são compartilhadas entre tumores e hospedeiros (Figura 18). As trocas de bases identificadas no atual estudo foram: C>T, T>C, G>T, A>T e A>C (Figura 18).

5.7.2 Genótipo do hospedeiro

As amostras (sangue) dos hospedeiros 757H e 769H apresentaram genótipos idênticos entre si no loco DLADQA-1 exon 2, assim como 759H e 766H, 761H e 772H e, ainda, 763H e 770H (Figura 18). Essas semelhanças genótípicas parecem se agrupar por região geográfica, visto que as duplas de amostras descritas (757H e 769H; e 763H e 770H), eram oriundas de animais provenientes da mesma cidade. Entretanto, as duplas de amostras 761H e 772H; 759H e 766H eram provenientes de animais residentes em diferentes cidades de origem, embora todas as amostras tenham sido coletadas no mesmo país. De forma geral, foram observados níveis reduzidos de diversidade no loco DLADQA-1, já que do total de 17 amostras dos hospedeiros, oito apresentaram-se idênticas a um outro cão e duas (11,77%) amostras eram homozigotas (Figura 18).

Posição Chr 12	2225015	2225056	2225085	2225122	2225168	2225194	2225195	2225258	2225295	2225297	2225299	2225300	2225320	2225331	2225333	2225338
Referência	T	G	T	T	A	G	A	C	T	T	A	C	A	G	C	A
Variante	T>C	G>T	T>C	T>A	A>T	G>T	A>T	C>G	T>C	T>G	A>G	C>T	A>C	G>T	C>T	A>C
756TF	C	T	T	T	A	T	T	C	T	T	A	C/T (H)	C	G	T	C
757TF	C	T	T	T	A	T	T	C	T	T	A	C/T (H)	A/C (H)	G	C (H)	C
758TF	C	T	T	T	A	T	T	C	T	T	A	T	C	G	T	C
759TF	T (H)	G (H)	T	T	T (H)	T	T	C	T	T	A	T	C	G	C (H)	C
761T1F	C	T	T	T	A	T	T	C	T	T	A	T	C	G	T	C
763TF	C	T	T	T	A	T	T	C	T	T	A	C/T (H)	C	G	T	C
764TF	C	T	T	T	A	T	T	C	T	T	A	T	C	G	T	C
765T1F	C	T	T	T	A	T	T	C	T	T	A	T	C	G	T	C
766T1F	C	T	T	T	A	T	T	C	T	T	A	T	C	G	T	C
768T1	C	T	T	T	A	T	T	C	T	T	A	C/T (H)	C	G	T	C
769T	T/C (H)	T	T	T	A	T	T	C	T	T	A	C/T (H)	A/C (H)	G	C (H)	C
770T1	C	T	T	T	A	T	T	C	T	T	A	T	C	G	T	C
771T	C	T	T	T	A/T (H)	T	T	C	T	T	A	C/T (H)	C	G	T	C
772T1	T (H)	G (H)	T	T	A	G (H)	A (H)	G (H)	T	T	A	T	A/C (H)	G	C (H)	C
773T1	C	T	T	T	A	T	T	C	T	T	A	T	C	G	T	C
774T1	C	T	T/C (H)	T	A	T	T	C	T	T	A	C/T (H)	A/C (H)	G	T	C
775T2	T/C (H)	T	T	T	A	T	T	C/G (H)	T	T	A	T	C	G	C (H)	C
756H	T	G	T	T	A/T	G	A	C/G	T	T	A	C/T	A/C	G	C	A/C
757H	T/C	G	T	T/A	A	G	A	C/G	T/C	T/G	A/G	C/T	A/C	G/T	C	C
758H	T/C	G	T/C	T	A/T	G	A	C/G	T/C	T/G	A/G	C/T	A/C	G/T	C	C
759H	T	G	T	T	T	G	A	C	T	T	A	C	A	G	C	A
761H	T	G	T	T/A	A	G	A	G	T	T	A	T	A/C	G	C	C
763H	T	G	T	T/A	A	G	A	C/G	T	T	A	C/T	A	G	C	A/C
764H	C	G	T/C	T	A	G	A	C	T/C	T/G	A/G	C/T	C	G/T	C	C
765H2	T	G	T	T/A	A/T	G	A	G	T	T	A	T	A	G	C	C
766H	T	G	T	T	T	G	A	C	T	T	A	C	A	G	C	A
768H	T/C	G	T	T	A	G	A	C/G	T	T	A	C/T	A/C	G	C	A/C
769H	T/C	G	T	T/A	A	G	A	C/G	T/C	T/G	A/G	C/T	A/C	G/T	C	C
770H	T	G	T	T/A	A	G	A	C/G	T	T	A	C/T	A	G	C	A/C
771H	T	G	T	T/A	A/T	G	A	C/G	T	T	A	C/T	A	G	C	A/C
772H	T	G	T	T/A	A	G	A	G	T	T	A	T	A/C	G	C	C
773H	C	G	T/C	T	A	G	A	C	C	G	G	C	C	T	C	C
774H	C	G	T/C	T	A	G	A	C	T	T	A/G	C/T	A/C	G	C	C
775H	T/C	G	T/C	T	A	G	A	C/G	T/C	T/G	A/G	C/T	C	G/T	C	C

Figura 18. Resumo das 16 variantes identificadas no loco DLADQA-1 (exon 2) em 17 amostras de TVT (verde) e de seus hospedeiros correspondentes (rosa). Os resultados ilustrados em amarelo indicam a presença de variantes (heterozigose ou homozigose) e em azul ausência de variantes. Amostras tumorais marcadas com o símbolo (H), demonstram que o genótipo tumoral é o mesmo genótipo apresentado pelo hospedeiro.

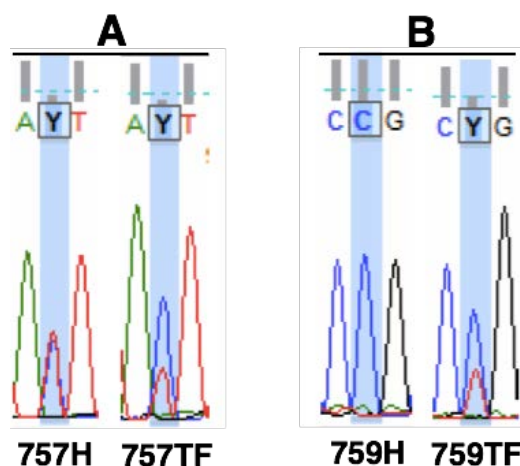


Figura 19. Ilustração esquemática da presença ou ausência de heterozigosidade nos tumores. Pico vermelho: T; pico azul: C; pico vermelho e azul: T/C; pico preto: G; pico verde: A; 757H e 759H: amostras do hospedeiro; 757TF e 759TF: amostras tumorais.

5.7.3 Genótipo dos animais controle

Nas 20 amostras de sangue dos animais controle provenientes do Brasil, coletadas de animais saudáveis e sem prévio contato e histórico de CTVT, foram identificadas, dentro da região amplificada, 12 posições variantes (Figura 20).

Similarmente aos resultados genotípicos obtidos com as amostras de sangue dos hospedeiros, alguns animais controle apresentaram genótipos idênticos entre si no loco DLADQA-1, sendo eles: 915H e 920H; 912H e 778H1; 917H e 922H; 911H e 780H1; 910H, 919H e 776H. Dessa forma, das 20 amostras controle sequenciadas, 11 apresentaram-se idênticas a um outro cão; 4 (20%) eram homozigotos e 16 (80%) heterozigotos (Figura 20).

Posição (Chr 12)	2225015	2225085	2225122	2225168	2225258	2225295	2225297	2225299	2225300	2225320	2225331	2225338
Referência	T	T	T	A	C	T	T	A	C	A	G	A
Variante	T>C	T>C	T>A	A>T	C>G	T>C	T>G	A>G	C>T	A>C	G>T	A>C
909H	T/C	T	T	A	G	T	T	A	T	C	G	C
910H	T	T	A	A	G	T	T	A	T	A	G	C
911H	T/C	T	T	A	C/G	T	T	A	C/T	A/C	G	A/C
912H	C	T/C	T	A	C/G	T/C	T/G	A/G	C/T	C	G/T	C
913H	T/C	T	T/A	A	C/G	T/C	T/G	A/G	C/T	A/C	G/T	C
914H	T/C	T/C	T/A	A	C/G	T	T	A	T	A/C	G	C
915H	T/C	T	T/A	A	C/G	T	T	A	C/T	A	G	A/C
916H	T	T	T	A/T	C/G	T	T	A	C/T	A/C	G	A/C
917H	T/C	T	T/A	A	G	T	T	A	T	A/C	G	C
918H	C	T/C	T	A	C	T	T	A	C/T	A/C	G	A/C
919H	T	T	A	A	G	T	T	A	T	A	G	C
920H	T/C	T	T/A	A	C/G	T	T	A	C/T	A	G	A/C
921H	T	T	T/A	A/T	G	T	T	A	T	A	G	C
922H	T/C	T	T/A	A	G	T	T	A	T	A/C	G	C
923H	C	T	T	A	G	T	T	A	T	C	G	C
776H	T	T	A	A	G	T	T	A	T	A	G	C
777H2	C	T	T	A	C/G	T/C	T/G	A/G	C/T	C	G/T	C
778H1	C	T/C	T	A	C/G	T/C	T/G	A/G	C/T	C	G/T	C
779H1	T/C	T/C	T	A	C/G	T/C	T/G	A/G	C/T	C	G/T	C
780H1	T/C	T	T	A	C/G	T	T	A	C/T	A/C	G	A/C

Figura 20. Resumo das 12 variantes identificadas no loco DLADQA-1 (exon 2) em 20 amostras de animais controle (cinza). Os resultados ilustrados em amarelo indicam presença de variantes (heterozigose ou homozigose) e em azul indicam ausência de variantes.

5.7.4 Comparação entre o genótipo dos hospedeiros do CTVT e dos animais controle

Foi realizada comparação dos nucleotídeos identificados através do sequenciamento do loco DLADQA-1 entre os animais hospedeiros do CTVT e controle para identificação de possíveis características genéticas presentes nos hospedeiros, as quais pudessem sugerir uma maior susceptibilidade genotípica para o desenvolvimento do CTVT. Não houve diferença estatística significativa entre a frequência de aparecimento de cada nucleotídeo nas diferentes posições de variantes identificadas entre os animais hospedeiros de CTVT e os controle, exceto pela posição 12:2225168 ($p < 0,05$) (Figura 21), a qual pode ser considerada uma flutuação amostral.

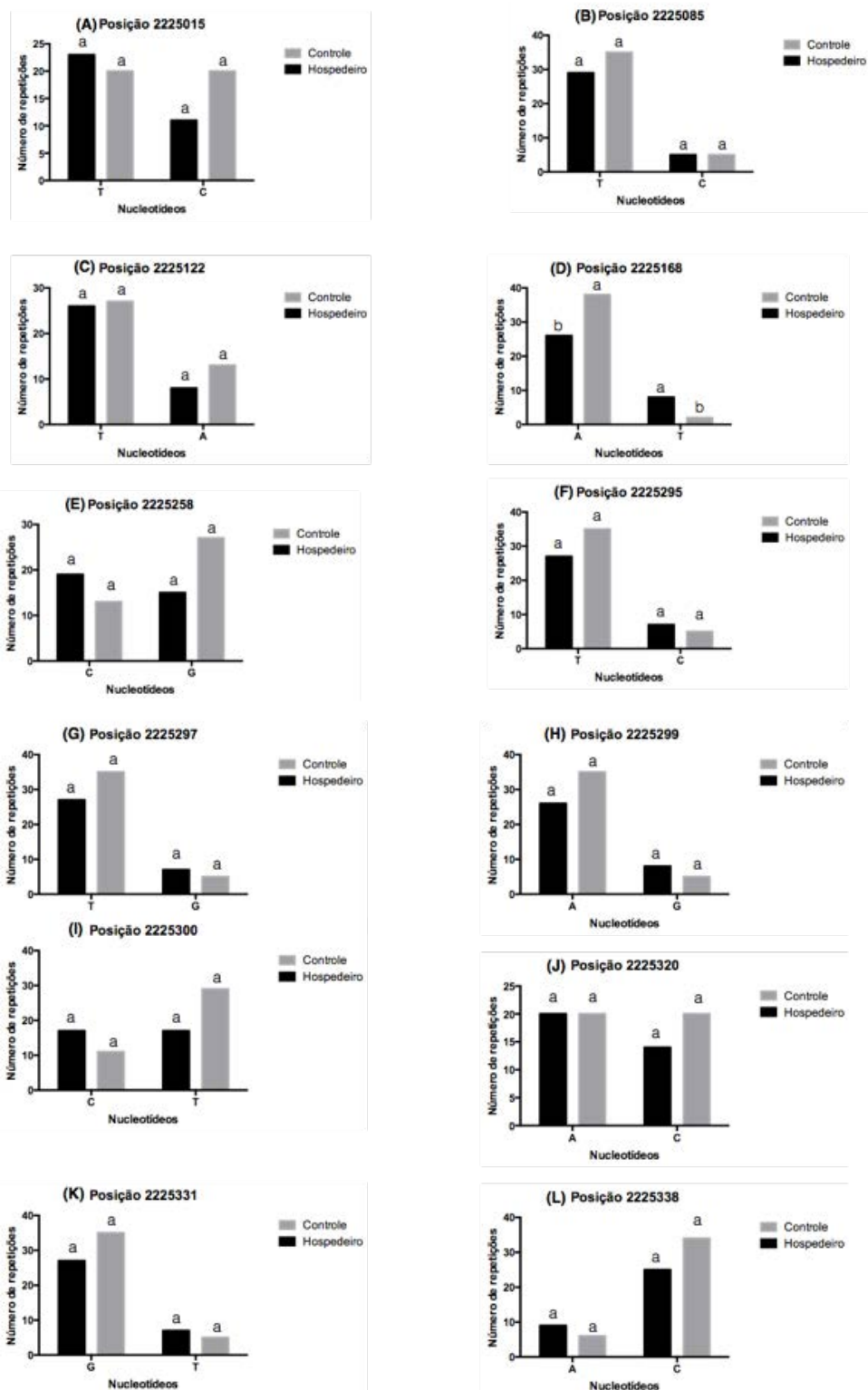


Figura 21. Representação gráfica da comparação da frequência de cada nucleotídeo nas diferentes posições de variantes do loco DLADQA-1 entre os animais hospedeiros de CTVT e controle. Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste Exato de Fisher e Quiquadrado.

5.8 Expressão proteica

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada a fim de comparar a expressão proteica de Ki67, MHC-II, CD3, CD79 e MAC 387 entre M1 e M2. As lâminas de imuno-histoquímica foram avaliadas quanto ao padrão de imunomarcção e número de células positivas (Figura 22B a 22F), os quais foram observados dispersos nas amostras tumorais de forma aleatória e as contagens foram realizadas de maneira cega.

O padrão de imunomarcção para o antígeno de proliferação Ki67 foi nuclear (Figura 22B) e revelou maior proporção de células imunomarcadas em M1 do que em M2, no entanto, não foi observada diferença estatística significativa ($p=0,2902$) entre ambos os momentos (Figura 23A). A imunomarcção para MHC-II foi membranosa (Figura 22F) e observou-se diferença estatística significativa de células imunomarcadas para MHC-II entre M1 e M2 (p -valor 0,0082), detectando-se maior expressão em M2, quando comparada à M1 (Figura 23B). Quanto à imunomarcção para CD3 (padrão citoplasmático) (Figura 22C), foi observada diferença estatística significativa entre M1 e M2 notando-se maior número de células imunomarcadas em M2 do que em M1 (p -valor 0,0080) (Figura 23C). Embora o número absoluto de células imunomarcadas para CD79 e MAC 387 tenha se apresentado mais elevado em M2 quando comparado a M1, não houve diferença significativa entre os dois grupos estudados ($p=0,3129$ e $p=0,2153$, respectivamente) e ambos apresentaram-se com padrão de imunomarcção citoplasmático (Figura 22D, 22E, 23D e 23E).

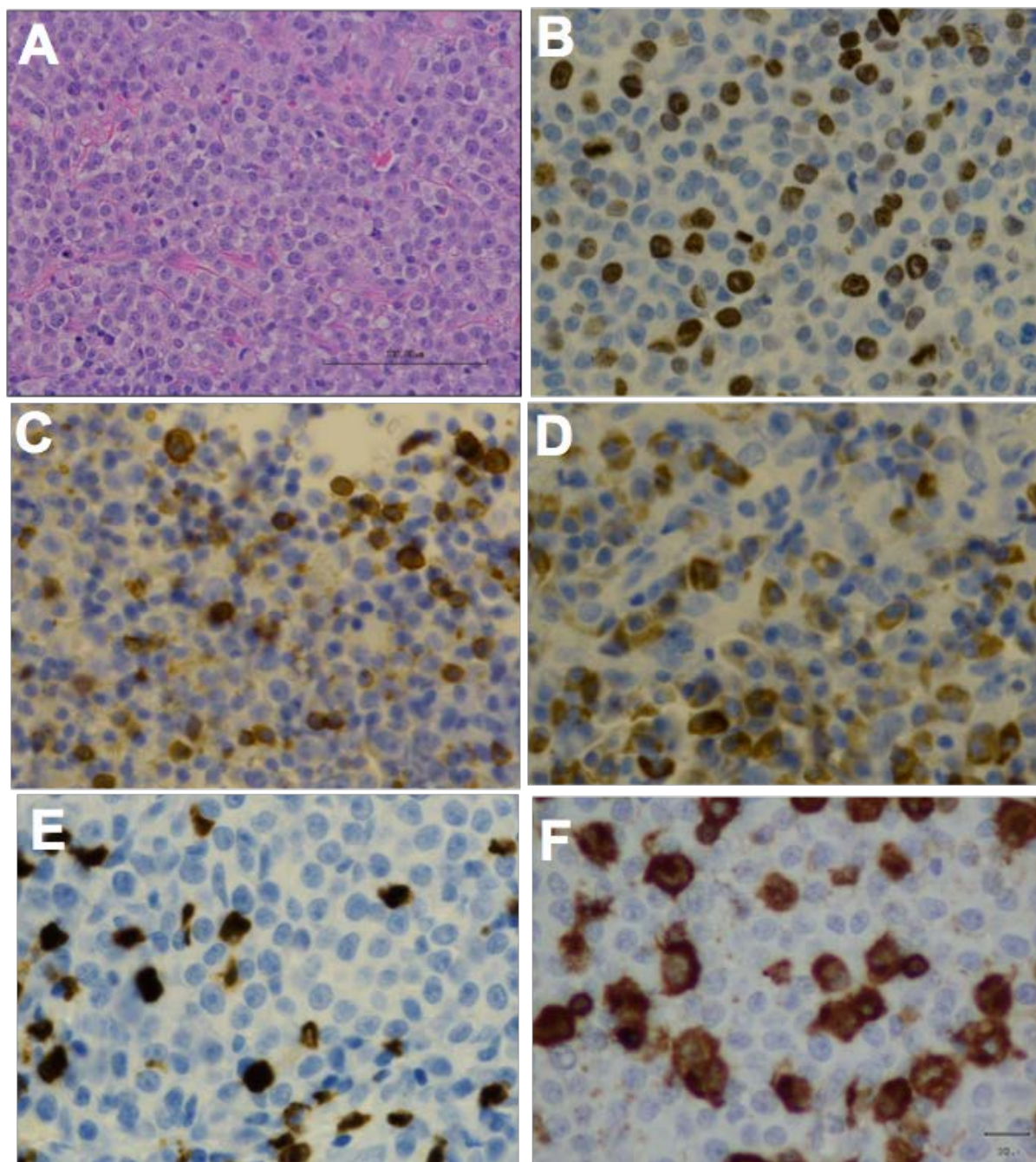


Figura 22. Fotomicrografias de CTVT. **(A)** Aspecto histológico do CTVT (H&E; 40x; 30 μ m). **(B)** Imunomarcaç o para proliferação celular (Ki67; 40x; 30 μ m). **(C)** Imunomarcaç o para linfócitos T (CD3; 40x; 30 μ m). **(D)** Imunomarcaç o para linfócitos B (CD79; 40x; 30 μ m) **(E)** Imunomarcaç o para macrófagos (MAC387; 40x; 30 μ m) e **(F)** células positiva para MHC-II (MHC-II; 40x; 30 μ m). Cambridge, 2014.

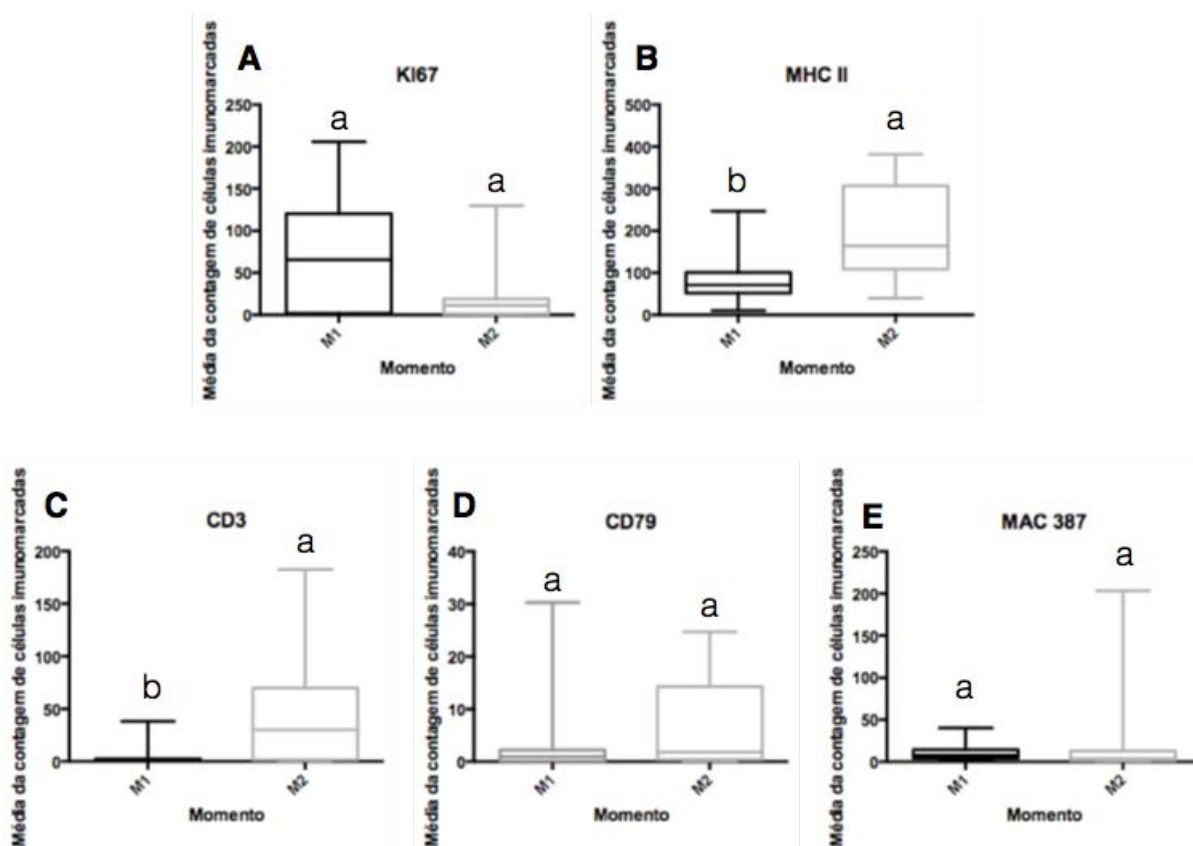


Figura 23. Representação gráfica do número mínimo e máximo de células imunomarcadas expressando Ki67 (A) $p=0,2902$, MHC-II (B) $p=\text{valor } 0,0082$, CD3 (C) $p=\text{valor } 0,0080$, CD79 (D) $p=0,3129$ e MAC 387 $p=0,2153$ (E) em tecido tumoral em M1 e em M2. As caixas representam os intervalos interquartil (percentil 25-percentil 75). As barras representam os valores mínimos e máximos de células imunomarcadas. Letras diferentes denotam significância ($p < 0,05$) pelo teste de Mann-Whitney.

5.9 Antígenos tumorais - *Western Blotting*

A técnica de *Western Blotting* (Western-blot) foi realizada para verificar se anticorpos de animais portadores de CTVT reconhecem antígenos específicos em amostras tumorais e, ainda, se esses anticorpos são capazes de reconhecer esses mesmos antígenos em diferentes amostras de CTVT do Brasil e de diferentes regiões do mundo. Para isso, foram utilizadas amostras de CTVT e de soros de cães oriundos do Brasil, Equador, Índia, Austrália e África do Sul, além das amostras teciduais (testículo e útero – Inglaterra; língua - Equador) e séricas controle oriundas dos mesmos países descritos, e também da Inglaterra. Em todos os ensaios foram realizados controles positivos e negativos, de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7. Controles positivos e negativos realizados nos ensaios da técnica de Western-blot

Controle	Amostra utilizada	Resultado esperado
Controle Positivo (tecido)	Tubulina (anti-beta II tubulina)	Presença de bandas
Controle Negativo (soro)	Soro de cão da Inglaterra	Ausência de bandas
Controle Negativo	Não utilização de soro teste como anticorpo primário	Ausência de bandas

Para padronização da concentração ideal de proteínas de tecido tumoral e controle foram realizados, inicialmente, experimentos pilotos com anticorpo primário anti-tubulina e diversas concentrações de tecidos, a saber: 1:5, 1:10, 1:20, 1:100, 1:500. Houve detecção de bandas proteicas na posição de peso molecular da tubulina (em torno de 50 kDa) em todas as concentrações de tecido tumoral e controle testadas, entretanto apresentou-se em maior intensidade na concentração 1:5, a qual foi padronizada para ser utilizada nos experimentos subsequentes.

O primeiro experimento foi realizado com tecido tumoral (CTVT) do Brasil e controle (testículo) da Inglaterra em uma concentração de 1:5 e três “desafios” como anticorpo primário: 1) soro teste (anti-soro): soro de um cão portador de CTVT do Brasil (cão diferente do cão provedor da amostra de tumor); (2) controle negativo: ausência de soro - apenas o anticorpo secundário; e 3) controle negativo: soro de um cão da Inglaterra, ou seja, sem prévio contato com CTVT. Foi detectada a presença de uma banda proteica específica, de peso molecular aproximado de 39kDa, nas colunas de tecido tumoral quando da utilização do soro teste, a qual foi ausente na coluna de tecido controle (Figura 24).

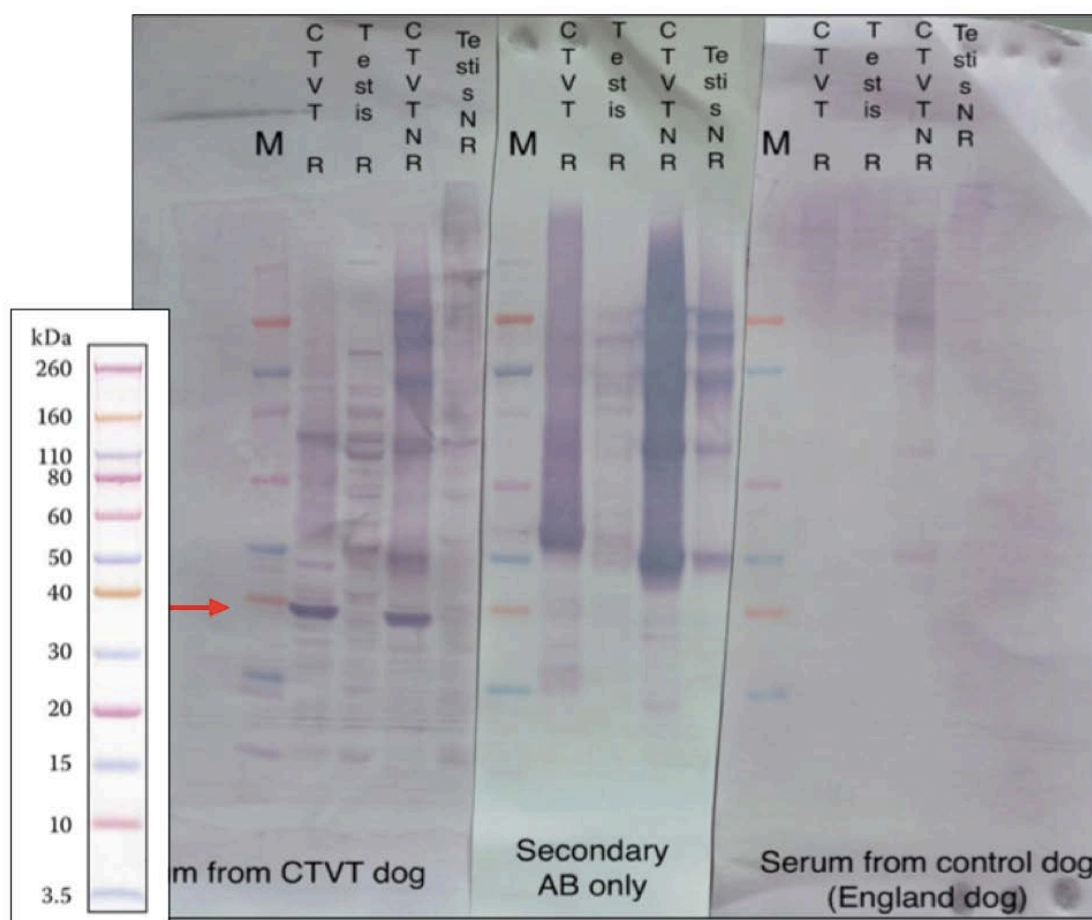


Figura 24. Fotodocumentação de membrana de Western-blot. Presença de banda específica, de aproximadamente 39 kDa, nas colunas de tecido tumoral (seta vermelha). M: marcador; CTVT: tumor venéreo transmissível canino; Testis: testículo. Cambridge, 2014.

Posteriormente, para o ajuste da diluição adequada de soro, foram realizados experimentos com soro de cães portadores de CTVT do Brasil nas seguintes diluições 1:8, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1000 com tecidos tumorais e controle (testículo) na concentração padronizada de 1:5. Os resultados mostraram que em todas as diluições de soro testadas, exceto 1:1000, detectou-se a presença da mesma banda específica nas colunas de tecido tumoral. Dessa forma, padronizou-se a diluição de soro 1:100 a ser utilizada nos experimentos seguintes, a fim de utilizar menor volume de soro por ensaio.

Em seguida, foi realizado ensaio com duas amostras diferentes de CTVT do Brasil e duas amostras distintas de tecido controle (testículos) da Inglaterra. Essas amostras teciduais foram expostas a: 1) soro teste (anti-soro): soro de um cão

portador de CTVT do Brasil (mesmo cão provedor de uma das amostras de tumor testadas); 2) controle negativo: ausência de soro - apenas foi utilizado anticorpo secundário; e 3) controle positivo: anti-beta II tubulina como anticorpo primário. Foram detectadas duas bandas específicas, de peso molecular aproximado de 39kDa e 45kDa, nas duas colunas de CTVT quando da utilização do soro teste, as quais foram ausentes nas colunas de tecido controle (Figura 25). Dessa forma, os anticorpos presentes no soro do cão teste (775) identificaram antígenos específicos tanto na amostra de CTVT do mesmo animal provedor do soro (775) como na amostra de CTVT de um cão distinto (772).

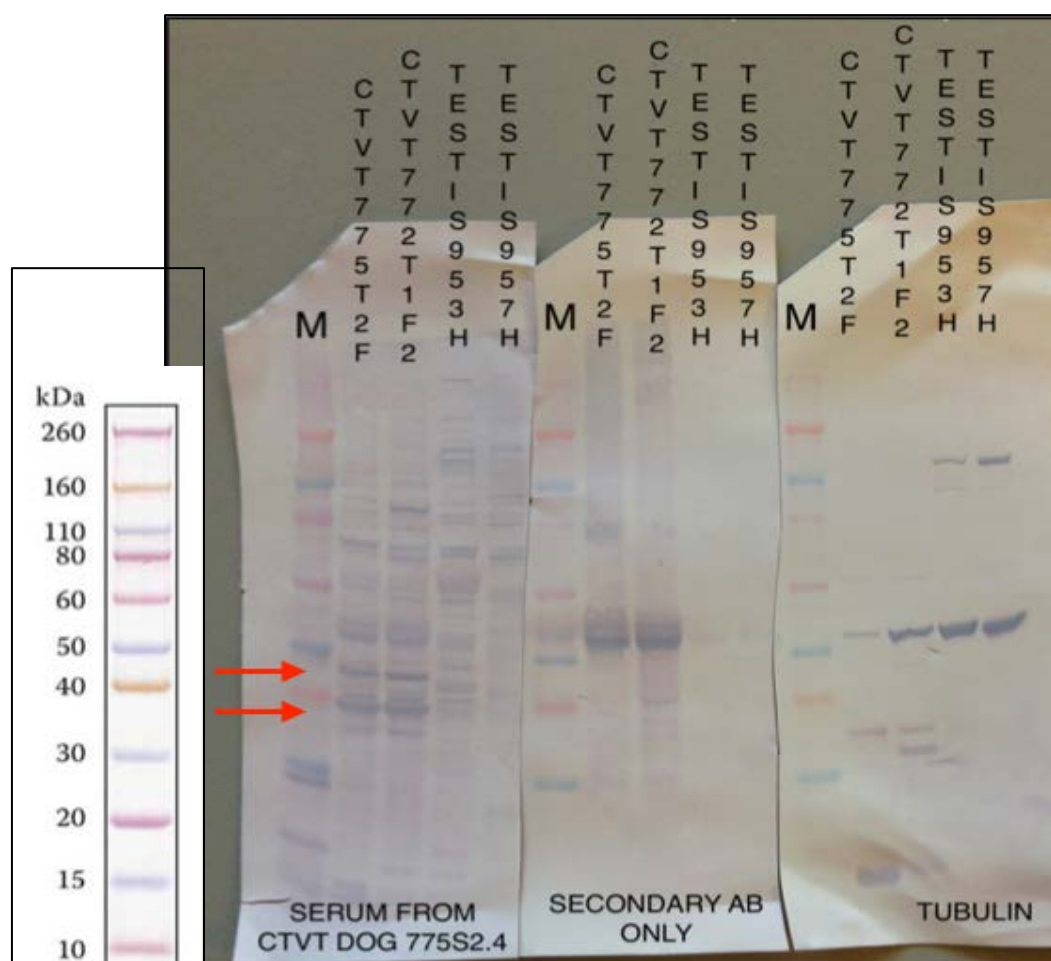


Figura 25. Fotodocumentação de membrana de Western-blot. Presença de duas bandas específicas, de aproximadamente 39kDa e 45kDa, nas colunas de tecido tumoral (seta vermelha). M: marcador; CTVT: tumor venéreo transmissível canino; Testis: testículo. Cambridge, 2014.

As mesmas bandas específicas descritas e ilustradas anteriormente foram detectadas em diversos experimentos subsequentes, utilizando diferentes amostras tumorais do Brasil, tanto amostras coletadas antes do tratamento quimioterápico (M1) (772T1F2, 756TF, 763TF) como amostras coletadas três semanas após início da quimioterapia (M2) (761T2F1) (Figura 26). Houve repetibilidade dos mesmos resultados utilizando amostras tumorais e séricas oriundas da Austrália e África do Sul.

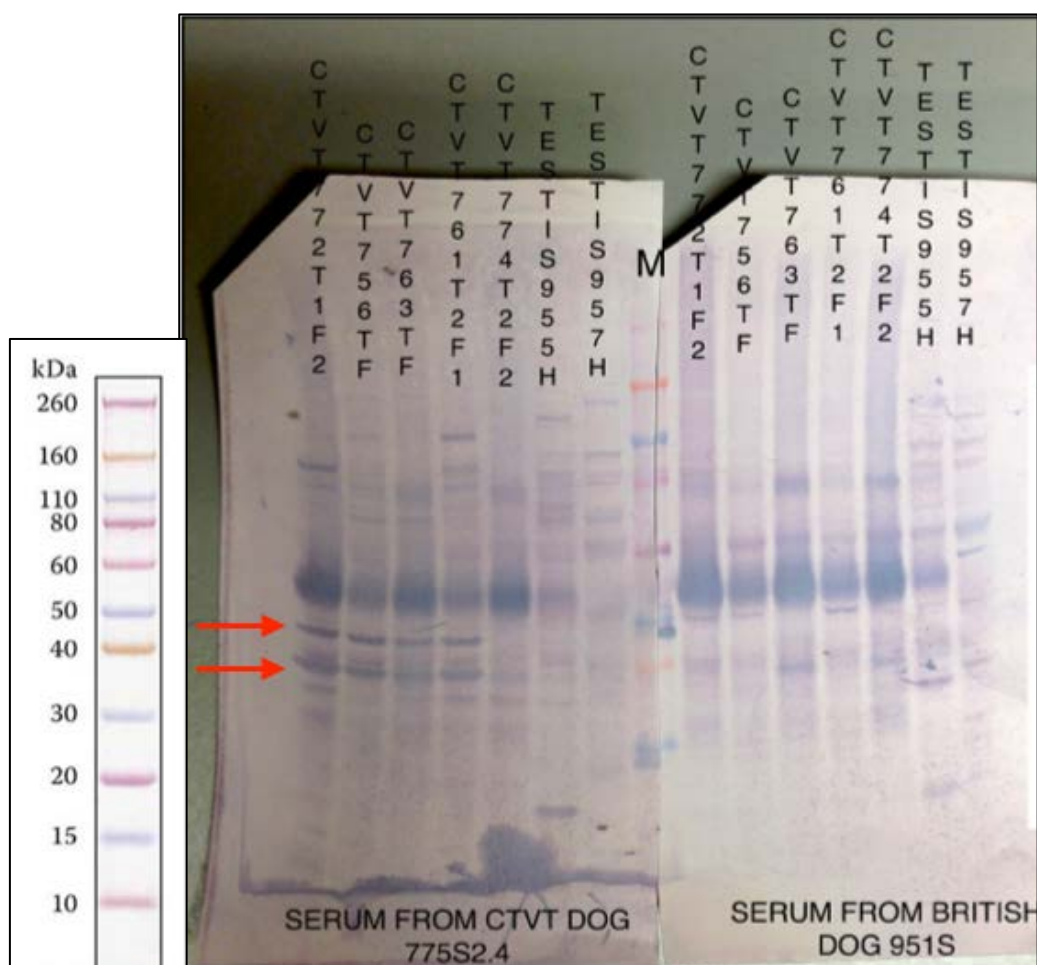


Figura 26. Fotodocumentação de membrana de Western-blot. Presença de duas bandas específicas, de aproximadamente 39kDa e 45 kDa, nas colunas de tecido tumoral (seta vermelha). M: marcador; CTVT: tumor venéreo transmissível canino; Testis: testículo. Cambridge, 2014.

Importante frisar que, além dos anticorpos séricos terem detectado antígenos específicos tanto na amostra de CTVT do mesmo animal provedor do soro como em amostras de CTVT de cães distintos do Brasil, esses mesmos antígenos

foram igualmente detectados antes do tratamento quimioterápico (M1) e durante a regressão tumoral (M2). Adicionalmente, os mesmos resultados foram encontrados em amostras séricas coletadas antes e após o tratamento quimioterápico (Figura 27 e 28) e também em amostras de tumores e soros de diferentes regiões geográficas (Figura 29). Tais bandas encontraram-se ausentes nas amostras de tecido controle (Figura 30).

Data	Amostra de soro	País de origem da amostra	Antes/Após Tratamento (Soro)	Tumor (lisado)		Testículo/Útero (lisado)		Lisado	Número de referência
				39kDa	45kDa	39kDa	45kDa		
								Lisado tumoral: 768T1F (Antes trat) - Congelado (Brasil)	1
05.08.2014	775S2.2+775S2.3	Brasil	Após	+++ (2)	+ (2)	- (C2)	- (C2)	Lisado tumoral: 772T1F1 (Antes trat) - Congelado (Brasil)	2
07.08.2014	775S2.4+775S2.9	Brasil	Após	+++ (2)	- (2)	- (C2)	- (C2)	Lisado tumoral: 772T1F2 (Antes trat) - Congelado (Brasil)	3
08.08.2014	775S2.4	Brasil	Após	+++ (1)	++ (1)	- (C2) - (C4)	- (C2) - (C4)	Lisado tumoral: 756TF (Antes trat) - Congelado (Brasil)	4
08.08.2014	775S2.4	Brasil	Após	+++ (2)	- (2)	- (C2) - (C4)	- (C2) - (C4)	Lisado tumoral: 763TF (Antes trat) - Congelado (Brasil)	5
08.08.2014	775S2.4	Brasil	Após	+++ (12)	+ (12)	- (C2) - (C4)	- (C2) - (C4)	Lisado tumoral: 761T2F1 (Após trat) - Congelado (Brasil)	6
08.08.2014	775S2.4	Brasil	Após	+++ (13)	++ (13)	- (C2) - (C4)	- (C2) - (C4)	Lisado tumoral: 774T2F2 (Após trat) - Congelado (Brasil)	7
12.08.2014	775S2.4	Brasil	Após	+++ (13)	+ (13)	- (C1)	- (C1)	Lisado tumoral: 775T2F +775T3F (Antes trat) - Congelado (Brasil)	8
13.08.2014	775S2.4 (heat)	Brasil	Após	+++ (3)	++ (3)	- (C3)	- (C3)	Lisado tumoral: 775T1+775T2 (Antes trat) - RNA later (Brasil)	9
13.08.2014	775S2.4 (heat)	Brasil	Após	+++ (13)	++ (13)	- (C6)	- (C6)	Lisado tumoral: 1000T (Antes trat) - RNA later (Austrália)	10
13.08.2014	775S2.4 (no heat)	Brasil	Após	+++ (3)	++ (3)	- (C3)	- (C3)	Lisado tumoral: 868T (Antes trat) - RNA later (África do Sul)	11
13.08.2014	775S2.4 (no heat)	Brasil	Após	+++ (13)	++ (13)	- (C6)	- (C6)	Lisado tumoral: 772T1 (Antes trat) - RNA later (Brasil)	12
19.08.2014	775S2.4	Brasil	Após	+++ (1)	+++ (1)	- (C4) - (C6)	- (C4) - (C6)	Lisado tumoral: 775T2F (Antes trat) - Congelado (Brasil)	13
19.08.2014	775S2.4	Brasil	Após	- (14)	- (14)	- (C4) - (C6)	- (C4) - (C6)	Lisado tumoral (xenográfico): 282T	14
29.09.2014	775S2.4	Brasil	Após	+++ (3)	+++ (3)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)	Lisado de testículo: 282T	C1
29.09.2014	775S2.4	Brasil	Após	+++ (4)	+++ (4)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)	Lisado de testículo: 952H	C2
29.09.2014	775S2.4	Brasil	Após	+++ (5)	+++ (5)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)	Lisado de testículo: 953H	C3
29.09.2014	775S2.4	Brasil	Após	+++ (6)	+++ (6)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)	Lisado de útero: 954H	C4
29.09.2014	775S2.4	Brasil	Após	+++ (7)	- (7)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)	Lisado de testículo: 955H	C5
08.10.2014	775S2.4+775S2.9	Brasil	Após	+++ (3)	++ (3)	- (C5)	- (C5)	Lisado de testículo: 957H	C6
16.10.2014	775S2.4+775S2.9	Brasil	Após	++ (8)	++ (8)	++ (C5)	- (C5)		
16.10.2014	775S2.4+775S2.9	Brasil	Após	++ (9)	++ (9)	++ (C5)	- (C5)		
16.10.2014	775S2.4+775S2.9	Brasil	Após	- (10)	- (10)	++ (C5)	- (C5)		
16.10.2014	775S2.4+775S2.9	Brasil	Após	++ (11)	- (11)	++ (C5)	- (C5)		
14.11.2014	775S2.4+775S2.9	Brasil	Após	- (1)	+ (1)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)		
14.11.2014	775S2.4+775S2.9	Brasil	Após	- (4)	+ (4)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)		

Figura 27. Ilustração esquemática dos resultados obtidos através da técnica de *Western Blotting* com amostras séricas provenientes do Brasil colhidas após o completo tratamento quimioterápico. Células na cor amarela referem-se à ausência de bandas e na cor azul presença de bandas positivas em diferentes intensidades: + (intensidade leve), ++ (intensidade moderada) e +++ (intensidade forte).

Data	Amostra de soro	País de origem da amostra	Antes/Após tratamento (Soro)	Tumor (lisado)		Testículo/Útero (lisado)	
				39kDa	45kDa	39kDa	45kDa
08.08.2014	768S2.2	Brasil	Após	++ (1)	++ (1)	- (C2) - (C4)	- (C2) - (C4)
08.08.2014	768S2.2	Brasil	Após	++ (2)	- (2)	- (C2) - (C4)	- (C2) - (C4)
08.08.2014	768S2.2	Brasil	Após	+ (12)	- (12)	- (C2) - (C4)	- (C2) - (C4)
08.08.2014	768S2.2	Brasil	Após	++ (13)	++ (13)	- (C2) - (C4)	- (C2) - (C4)
19.08.2014	768S2.2	Brasil	Após	+++ (1)	+++ (1)	- (C4) - (C6)	- (C4) - (C6)
29.09.2014	768S2.2	Brasil	Após	+ (3)	+++ (3)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)
29.09.2014	768S2.2	Brasil	Após	+ (4)	+++ (4)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)
29.09.2014	768S2.2	Brasil	Após	+ (5)	+++ (5)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)
29.09.2014	768S2.2	Brasil	Após	+ (6)	+++ (6)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)
29.09.2014	768S2.2	Brasil	Após	+ (7)	- (7)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)
08.10.2014	768S2.2	Brasil	Após	- (3)	+++ (3)	- (C5)	- (C5)
08.10.2014	771S1.2	Brasil	Antes	- (3)	++ (3)	++ (C5)	++ (C5)
12.08.2014	772S1.2	Brasil	Antes	+ ? (13)	- (13)	++ (C1)	- (C1)
08.10.2014	772S1.2	Brasil	Antes	+++ (3)	- (3)	++ (C5)	- (C5)
12.08.2014	772S2.2	Brasil	Após	+ (13)	- (13)	++ (C1)	- (C1)
08.10.2014	772S2.2	Brasil	Após	+++ (3)	- (3)	+++ (C5)	- (C5)
08.10.2014	773S1.2	Brasil	Antes	+++ (3)	- (3)	+ (C5)	- (C5)
08.10.2014	774S2.2	Brasil	Após	+++ (3)	+++ (3)	- (C5)	- (C5)
12.08.2014	774S2.2	Brasil	Após	++ (13)	+ (13)	- (C1)	- (C1)
12.08.2014	769S1.2	Brasil	Antes	++ (13)	++ (13)	+ (C1)	- (C1)
08.10.2014	769S1.2	Brasil	Antes	- (3)	+ (3)	- (C5)	- (C5)
08.10.2014	770S1.3	Brasil	Antes	+ (3)	++ (3)	+++ (C5)	- (C5)

Figura 28. Ilustração esquemática dos resultados obtidos através da técnica de *Western Blotting* com amostras séricas provenientes do Brasil colhidas antes ou após o tratamento quimioterápico. Células na cor amarela referem-se à ausência de bandas e na cor azul presença de bandas positivas em diferentes intensidades: + (intensidade leve), ++ (intensidade moderada) e +++ (intensidade forte).

Data	Amostra de soro	País de origem da amostra	Antes/Após tratamento (Soro)	Tumor (lisado)		Testículo/Útero (lisado)	
				39kDa	45kDa	39kDa	45kDa
12.08.2014	704S2	Paquistão	Após	+ (13)	+ (13)	+ (C1)	- (C1)
12.08.2014	705S2	Paquistão	Após	+++ (13)	+ (13)	+++ (C1)	- (C1)
08.10.2014	1000S1	Australia	Antes	+++ (3)	++ (3)	- (C5)	+ (C5)
16.10.2014	1000S1	Australia	Antes	++ (8)	+ (8)	- (C5)	- (C5)
16.10.2014	1000S1	Australia	Antes	++ (9)	+ (9)	- (C5)	- (C5)
16.10.2014	1000S1	Australia	Antes	++ (10)	- (10)	- (C5)	- (C5)
16.10.2014	1000S1	Australia	Antes	++ (11)	- ? (11)	- (C5)	- (C5)
08.10.2014	1001S1	Australia	Antes	++ (3)	++ (3)	- (C5)	- (C5)
16.10.2014	868S1	África do Sul	Antes	- (8)	+ (8)	- (C5)	- (C5)
16.10.2014	868S1	África do Sul	Antes	- (9)	+ (9)	- (C5)	- (C5)
16.10.2014	868S1	África do Sul	Antes	- (10)	- (10)	- (C5)	- (C5)
16.10.2014	868S1	África do Sul	Antes	- (11)	+ (11)	- (C5)	- (C5)

Figura 29. Ilustração esquemática dos resultados obtidos através da técnica de *Western Blotting* com amostras séricas provenientes do Paquistão, Austrália e África do Sul. Células na cor amarela referem-se à ausência de bandas e na cor azul presença de bandas positivas em diferentes intensidades: + (intensidade leve), ++ (intensidade moderada) e +++ (intensidade forte).

Data	Amostra de soro	País de origem da amostra	Antes/Após tratamento (Soro)	Tumor (lisado)		Testículo/Útero (lisado)	
				39kDa	45kDa	39kDa	45kDa
05.08.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	- (2)	- (2)	- (C2)	- (C2)
12.08.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	- (13)	- (13)	- (C1)	- (C1)
19.08.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	- (1)	- (1)	- (C4) +? (C6)	- (C4) - (C6)
19.08.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	- (14)	- (14)	- (C4) +? (C6)	- (C4) - (C6)
29.09.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	- (3)	- (3)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)
29.09.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	- (4)	- (4)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)
29.09.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	+ (5)	- (5)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)
29.09.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	- (6)	- (6)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)
29.09.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	+ (7)	- (7)	- (C5) - (C6)	- (C5) - (C6)
08.10.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	- (3)	- (3)	- (C5)	- (C5)
16.10.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	- (8)	Artefato (8)	- (C5)	Artefato (C5)
16.10.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	- (9)	Artefato (8)	- (C5)	Artefato (C5)
16.10.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	- (10)	Artefato (8)	- (C5)	Artefato (C5)
16.10.2014	951S (British dog)	Inglaterra	Controle	- (11)	Artefato (8)	- (C5)	Artefato (C5)
08.10.2014	British dog 1	Inglaterra	Controle	- (3)	- (3)	- (C5)	- (C5)

Figura 30. Ilustração esquemática dos resultados obtidos através da técnica de *Western Blotting* com amostras séricas controle, ou seja, amostras de soro colhidas de animais provenientes da Inglaterra. Células na cor amarela referem-se à ausência de bandas e na cor azul presença de bandas positivas em diferentes intensidades: + (intensidade leve), ++ (intensidade moderada) e +++ (intensidade forte).

Diante de diversas repetições e após sucessivos resultados similares, foram utilizadas duas amostras tumorais em M1 (756TF e 768TF) oriundas do Brasil para realização de espectrometria de massa na tentativa de identificar possíveis antígenos candidatos. Dessa forma, após coloração com coomassie brilliant blue, o gel foi encaminhado ao Laboratório de Proteômica (Cambridge Centre for Proteomics – University of Cambridge) para espectrometria de massa.

O resultado da espectrometria de massa revelou, além de diversas proteínas constitutivas, algumas proteínas do MHC-I e MHC-II, que podem ser visibilizadas no Apêndice G e Figura 31.

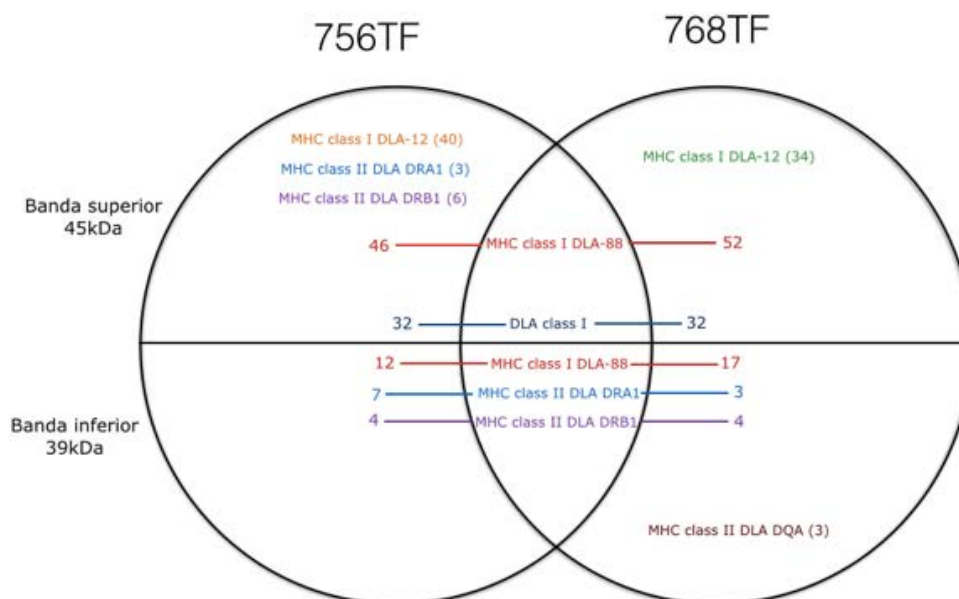


Figura 31. Ilustração esquemática dos resultados obtidos a partir da espectrometria de massa com as amostras tumorais 756TF e 768TF das duas bandas de peso molecular aproximado de 39kDa e 45kDa, identificadas através da técnica de Western-blot.

Em seguida, foram realizados ensaios com amostras de tecido controle (língua) do mesmo animal provedor do tumor a ser testado, o qual não havia sido realizado até o presente momento. Posteriormente, também foi utilizada língua de um cão proveniente da Inglaterra, com intuito de testar uma amostra controle de um cão sem prévio contato com CTVT.

Foram utilizadas duas amostras de CTVT, uma do Brasil e outra do Equador, além de duas amostras controle, língua do Equador e testículo da Inglaterra. Os resultados mostraram repetição das mesmas bandas identificadas e ilustradas anteriormente nas amostras tumorais, identificadas na coluna de CTVT do Brasil, CTVT do Equador e também na coluna de tecido controle (língua) (Figura 32A e 32B). Posteriormente, os resultados se repetiram, com a detecção da mesma banda em língua de cão não portador de CTVT da Inglaterra (1169H) (Figura 32C).

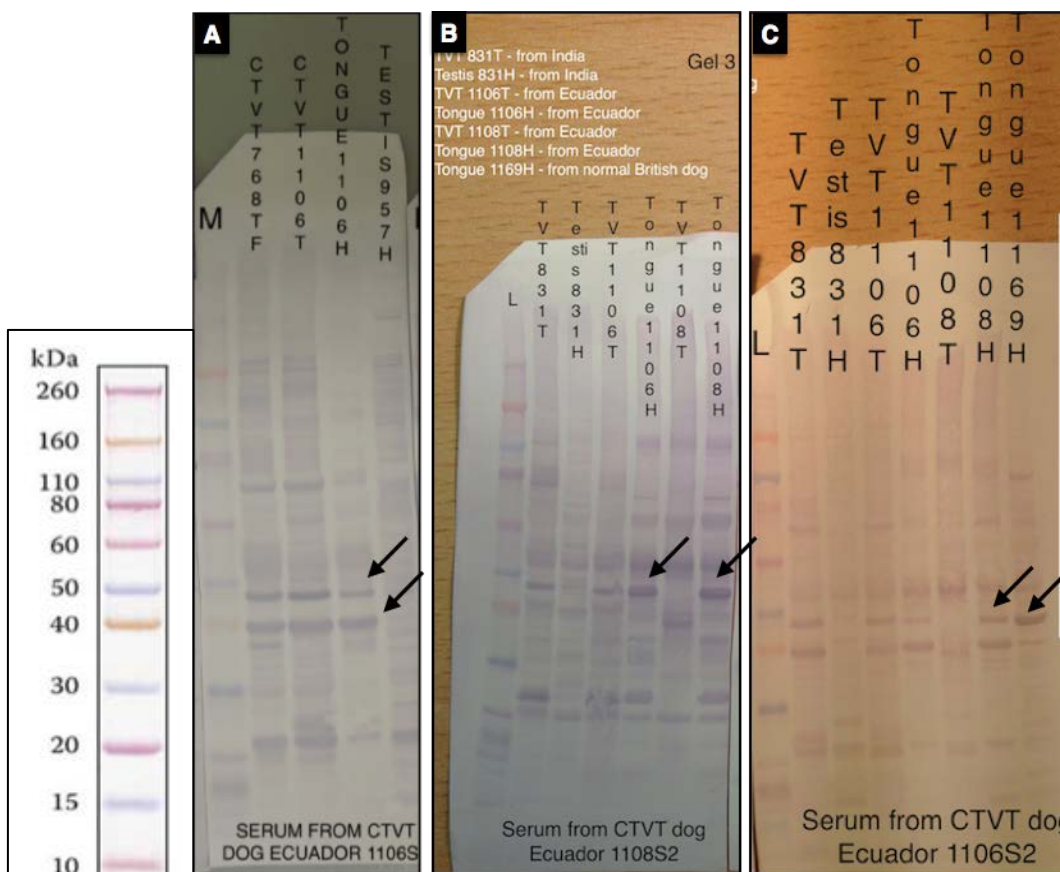


Figura 32. Fotodocumentação de membrana de Western-blot. Presença de duas bandas de aproximadamente 39kDa e 45 kDa, nas colunas de tecido tumoral e controle (seta preta). M: marcador; CTVT: tumor venéreo transmissível canino; Testis: testículo; Tongue: língua. Cambridge, 2014.

6 DISCUSSÃO

Nos animais avaliados no presente estudo, 65% (13/20 casos) eram fêmeas e 35% (7/20 casos) machos, o que demonstra uma predisposição quanto ao gênero. Estudos mostram que as fêmeas parecem ser mais frequentemente acometidas pelo CTVT do que os machos, provavelmente por aceitarem maior número de parceiros durante o cio (COHEN, 1985; DAS; DAS, 2000).

A incidência do CTVT está relacionada à idade de maior atividade sexual (COHEN, 1978) e, dessa forma, acomete principalmente animais adultos (2 a 8 anos de idade) (FONSECA et al., 2012). Os pacientes do presente estudo apresentaram faixa etária média de 4,5 anos ($4,5 \pm 1,7$ anos) e com maior frequência de acometimento entre três e oito anos de idade, corroborando com a faixa etária de maior incidência desta neoplasia e com a fase de maturidade sexual (DAS; DAS, 2000; FONSECA et al., 2012).

Em relação às raças dos pacientes, 70% eram cães sem raça definida (SRD), 10% Border Collie e Shih Tzu e 5% Poodle e Pit Bull. A elevada prevalência do CTVT em animais SRD está de acordo com outros trabalhos, que sugerem que os animais SRD podem ser agrupados dentro de populações caracterizadas como errantes e assim, mais predispostos ao desenvolvimento dessa afecção (LEFEBVRE et al., 2007). Contudo, o CTVT pode-se desenvolver em qualquer raça de cães (COHEN, 1985). Segundo Sorenmo (2003), a predisposição a determinadas raças pode variar de acordo com a região geográfica. Além disso, os cães SRD representam a maior população de cães atendida no Hospital Veterinário em que este estudo foi desenvolvido.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que 95% (19/20 casos) dos animais avaliados não eram castrados. Cães não castrados representam animais incluídos em grupos de alto risco para o desenvolvimento desta neoplasia (GANGULY; DAS; DAS, 2013).

O atual estudo demonstrou números similares entre animais semi-domiciliados (45%) e domiciliados (55%), talvez pelo fato de ter havido acesso a rua dos animais domiciliados avaliados no presente estudo, já que o CTVT é considerado incomum em animais de companhia supervisionados (GANGULY; DAS; DAS, 2013; STRAKOVA; MURCHISON, 2014).

Quanto à localização, 95% apresentaram somente envolvimento genital, sendo 55% vaginal, 25% peniano, 10% vulvar e vaginal, 5% com acometimento de prepúcio, pênis e pálpebra e 5% com exclusivo envolvimento da cavidade nasal. O maior número de cães com acometimento genital, identificado neste estudo, está de acordo com prévios, que sugerem que o CTVT acomete principalmente a genitália externa de animais de ambos os sexos, embora também haja relatos de ocorrência extragenital (COHEN, 1985; STRAKOVA; MURCHISON, 2014). A prevalência de CTVT em cavidade nasal parece ser mais alta em machos devido ao comportamento destes em relação às fêmeas (GANGULY; DAS; DAS, 2013), e o único caso de CTVT com exclusivo envolvimento extragenital (cavidade nasal) apresentado nesse estudo foi representado por um macho.

O diagnóstico molecular do CTVT em todas as amostras tumorais estudadas foi realizado através da detecção do rearranjo LINE-1/c-myc, o qual é considerado específico para o CTVT e não foi identificado em qualquer outro tecido canino (KATZIR et al., 1985; KATZIR et al., 1987; CHOI et al., 1999; CHU et al., 2001; LIAO et al., 2003; VONHOLDT; OSTRANDER, 2006) e que, adicionalmente, foi identificado em CTVTs de diferentes países (AMARIGLIO et al., 1991; MURGIA et al., 2006; REBBECK et al., 2009; FONSECA et al., 2012). No presente estudo, corroborando com essas informações, este rearranjo foi detectado em todas (20/20) as amostras tumorais do Brasil em M1, em três (3/9) amostras tumorais em M2 e não foi detectado em seus hospedeiros correspondentes. A detecção do rearranjo LINE-1/c-myc em somente três amostras em M2 pode ser explicada pelo fato de que em M2, devido ao prévio tratamento quimioterápico e consequente redução neoplásica, não houve ampliação do rearranjo LINE-1/c-myc devido à presença de quantidades insuficientes de DNA tumoral nessas amostras. Sabendo-se que previamente ao tratamento quimioterápico, nessas mesmas amostras (M1) houve detecção do rearranjo, confirmatório do definitivo diagnóstico de CTVT.

A especificidade do rearranjo LINE-1/c-myc fornece ainda mais evidências da origem clonal desta neoplasia e é considerado o marcador molecular do CTVT. Tal fato poderia explicar a manutenção e a propagação do material genético entre hospedeiros em diferentes países por muitos anos (BROOKS et al.,

2003; VONHOLDT; OSTRANDER, 2006; MURGIA et al., 2006; VÁSQUEZ-MOTA et al., 2008).

Uma das mutações sofridas pelos CTVTs e também compartilhadas por outros cânceres em seres humanos, é a deleção homozigótica do loco CDKN2A, encontrando-se ausente em todas as células do CTVT (MURCHISON et al., 2014; STRAKOVA; MURCHISON, 2015). Trata-se de um gene supressor de tumores, que está envolvido na regulação do ciclo celular e as células incapazes de produzi-lo podem estar propensas à transformação neoplásica (NOBORI et al., 1994).

No presente estudo, a mensuração dos níveis de contaminação por células do hospedeiro na amostra tumoral baseou-se na presença de CDKN2A, o qual é deletado homozigoticamente no CTVT (MURCHISON et al., 2014), mas presente em duas cópias no tecido hospedeiro. Assim, níveis detectáveis de CDKN2A foram atribuídos à presença de células estromais do hospedeiro nas amostras tumorais. Os resultados demonstraram que CDKN2A foi detectado em todas as amostras de CTVT em M1 e M2 e, ainda, em níveis inferiores em M1 quando comparados com M2, fato esperado já que imagina-se a presença de menor quantidade de células tumorais e maior infiltração de células hospedeiras em M2 do que em M1. Também obteve-se níveis mais elevados de CDKN2A em amostras do hospedeiro em comparação com amostras de tumores em M1 e em M2, fato este que corrobora com os prévios achados sobre a deleção homozigótica deste gene em amostras de CTVT, de acordo com Murchison et al. (2014).

Embora todos os cânceres, incluindo aqueles que permanecem em um único hospedeiro, adquiram adaptações para se evadir do sistema imunológico (HANAHAN; WEINBERG, 2011), os cânceres transmissíveis são capazes de evadir do sistema imune como um enxerto alogênico (MURCHISON et al., 2014). A maior e mais potente resposta aos enxertos alogênicos é, primariamente, mediada pelo reconhecimento direto por meio das moléculas de MHC através dos linfócitos T do hospedeiro (WAGNER, 2003; BELOV, 2011) e a rejeição de enxertos malignos pode ter sido um fator na evolução do MHC (MURGIA et al., 2006).

Como o MHC desempenha um papel fundamental no reconhecimento e na rejeição de enxertos (KUMANOVICS; TAKADA; LINDAHL, 2003; BELOV, 2011) e o CTVT escapa dessa estrita vigilância imunológica do hospedeiro, estudou-se um

dos dois genes funcionais DQ da região do MHC-II, o gene DLADQA-1 (WAGNER; 2003).

Muitos cânceres em seres humanos modulam a expressão de MHC como um mecanismo de escape à detecção imune (ALGARRA; COLLADO; GARRIDO, 1997), entretanto não há um consenso quanto à expressão de MHC em TVTs em cães.

No atual estudo, utilizou-se dois métodos para investigação de MHC-II, a análise imuno-histoquímica para avaliar expressão proteica e a avaliação molecular para investigar a amplificação (gDNA) e expressão gênica (cDNA).

Quanto à análise molecular, no presente estudo, havia a hipótese de que DLADQA-1 pudesse estar presente em todas amostras de gDNA das células de CTVT em níveis semelhantes, com pouca ou ausência de expressão de DLADQA-1 tumor alelo-específico em amostras de cDNA. Para tal, utilizaram-se dois pares de oligonucleotídeos: 1) tumor alelo-específico, que alinharam-se especificamente ao alelo tumoral e não ao alelo do hospedeiro e 2) não alelo específico, que alinharam-se com ambos alelo tumoral e alelo do hospedeiro.

Como esperado, quando utilizou-se amostras de gDNA, DLADQA-1 tumor alelo-específico foi amplificado em todas as amostras de CTVT em M1 e em três amostras de CTVT em M2, resultados similares aos observados na detecção do rearranjo LINE-1/c-myc. DLADQA-1 não alelo específico foi detectado em todas as amostras de CTVT em M1 e M2. Além disso, houve diferença significativa nos resultados obtidos entre M1 e M2, com ambos os oligonucleotídeos, em que a amplificação mostrou-se mais elevada em M1 quando comparada a M2. Este dado pode ser explicado pela provável redução de células tumorais em M2, quando comparado a M1, devido à quimioterapia.

Em estudo empregando técnica de separação celular para identificar especificamente as células de CTVT na amostra, Cohen, Shalev e Krup (1984), demonstraram que as células tumorais não expressaram β 2-microglobulina, um peptídeo de MHC-I e, assim, a expressão de β 2-microglobulina observada foi proveniente das células do hospedeiro e não das células tumorais.

Por meio de estudo imuno-histoquímico, Perez, Day e Mozos (1998) pesquisaram a imunomarcagem do MHC-II e mostraram um padrão disperso e

aleatório de positividade na amostra tumoral. No entanto, provou-se difícil de comprovar se as células imunomarcadas observadas representaram a expressão de MHC das células do tumor ou as infiltradas do hospedeiro (EPSTEIN; BENNETT, 1974; COHEN; SHALEV; KRUP, 1984; YANG; CHANDLER; DUNNE-ANWAY, 1987; PEREZ; DAY; MOZOS, 1998; HSIAO et al., 2008). Murgia et al. (2006) investigaram, por meio da técnica de RT-qPCR, a expressão de MHC em amostras de CTVT avaliando os genes DLA-88 (MHC-I) e DLA-DRB1 (MHC-II). Demonstraram níveis reduzidos de expressão gênica de DLA-88 e não houve expressão para DLA-DRB1 nos tumores avaliados.

Embora as moléculas de MHC sejam normalmente expressas por todas as células nucleadas, as células do CTVT e as do DFTD, ambos cânceres transmissíveis, perderam a expressão de moléculas do MHC, presumivelmente por meio de um processo de imunoseleção (COHEN; SHALEV; KRUP, 1984; YANG; CHANDLER; DUNNE-ANWAY, 1987; HSIAO et al., 2002; MURGIA et al., 2006; SIDDLE et al., 2013).

Corroborando com os dados descritos, no atual estudo, não houve expressão gênica de DLADQA-1 tumor alelo específico em nenhuma amostra de CTVT em M1 e M2, quando utilizaram-se amostras de cDNA. No entanto, detectou-se expressão gênica de DLADQA-1 não alelo específico em todas as amostras de CTVT tanto em M1 como em M2, com maior expressão em M2. Mais uma vez, a expressão refere-se às células hospedeiras, já que não houve expressão gênica quando utilizaram-se oligonucleotídeos específicos ao tumor. Da mesma forma, muitos cânceres em seres humanos modulam a expressão de moléculas MHC como um mecanismo para escapar da detecção imune (ALGARRA; COLLADO; GARRIDO, 1997).

Hsiao et al. (2004), demonstraram que, durante a fase progressiva do CTVT, a secreção de TGF-beta 1 atua como um potente inibidor local para o sistema imune do hospedeiro e, de acordo com Cohen, Shalev e Krup (1984), Hsiao et al. (2004) e Murgia et al. (2006), nessa fase também há a redução da expressão de DLA-I e DLA-II. Fato que concorda com os achados do presente estudo, em que não houve expressão de DLADQA-1, um gene do MHC-II.

De acordo com os resultados obtidos na amplificação de DLADQA-1 em

amostras de gDNA, a maior parte amplificada em M1 foi procedente das células tumorais e, em M2 em sua maioria foi proveniente das células hospedeiras. Em amostras de cDNA, não houve expressão de DLADQA-1 tumor alelo específico nos dois momentos. Isto sugere que DLADQA-1 não é, significativamente, expresso em células de CTVT e que a expressão de DLADQA-1 foi atribuída ao alelo do hospedeiro. Muitos tumores imunogênicos perdem a expressão das moléculas MHC durante a sua progressão e isso evita a apresentação dos antígenos específicos dos tumores para as moléculas de MHC (SHANKARAN et al., 2001; CHANG; CAMPOLI; FERRONE, 2005). Menos de 5% das células do CTVT expressam MHC-I ou MHC-II durante a fase de progressão, o que contribui para habilidade das células tumorais em evitar a resposta dos linfócitos T (HSIAO et al., 2008). Em contraste, durante a fase de regressão tumoral 30-40% das células do CTVT expressam as moléculas de MHC-I e/ou MHC-II (YANG; CHANDLER; DUNNE-ANWAY, 1987; HSIAO et al., 2002; HSIAO et al., 2008).

Portanto, esses resultados sugerem que as células do CTVT não se deparam com barreiras de imuno-histocompatibilidade naturais. Assim, a evasão do sistema imune do hospedeiro permite a sobrevivência e o crescimento do tumor até que ele possa ser, posteriormente, transmitido (MURGIA et al., 2006).

Levando em consideração que, no presente estudo, avaliou-se somente um único loco gênico de MHC-II, futuros trabalhos fazem-se necessários para verificar se os resultados ora aqui identificados, também serão observados em outros locos gênicos de MHC-II.

Embora no presente trabalho utilizou-se somente um único gene de referência para validação dos resultados de qPCR, sabe-se que a inclusão de vários genes de referência faz-se necessário para obtenção de um resultado fidedigno.

O elevado grau de semelhança genotípica entre as amostras tumorais, diferentemente às de seus hospedeiros correspondentes, apresentadas no presente estudo, condiz com a base clonal de transmissão do CTVT, o que vai ao encontro dos dados obtidos por Murgia et al. (2006) e Rebbeck et al. (2009), em que os padrões de identidade genética detectados em tumores localizados em diferentes

continentes indicam uma única origem clonal para essa doença.

De acordo com Murgia et al. (2006), quanto ao MHC-II, os CTVT's são diplóides para os genes DRA e DRB1, mas alguns tumores são haplóides para DQA e DQB. Dois grupos no loco DLADQA-1 foram identificados; enquanto alguns CTVT's apresentaram-se haplóides, outros permaneceram diplóides. Os locos diplóides são homozigotos com exceção de DRB1 e DLA-88, que apresentam alelos altamente semelhantes. Esses achados contrastam com os resultados obtidos por Murchison et al. (2014), que sugerem que o loco DLADQA-1 foi submetido a uma perda de heterozigose.

A perda de heterozigose (LOH) é, muitas vezes, responsável pela perda de expressão de MHC em tumores (JIMENEZ; CANTON; COLLADO, 1999) e pode ter sido adquirida durante a evolução do CTVT, reduzindo as diferenças de MHC entre tumores e os cães hospedeiros.

De acordo com Murchison et al. (2014), o CTVT originou-se de um cão com reduzida heterozigosidade genômica que pode ter vivido há 11.000 anos. Através das sequências tumorais analisadas no presente estudo, 10 das 17 amostras tumorais mostraram uma possível heterozigosidade. Todavia, a presença de genótipo heterozigoto de seus hospedeiros correspondentes impediu a conclusão de forma definitiva. Não houve evidências suficientes para nomear, com precisão, heterozigosidade nos tumores, já que houve presença de contaminação por células hospedeiras e, assim sendo, não foi possível distinguir essas duas variáveis. A presença de pico duplo identificado no sequenciamento de alguns tumores pode ter sido proveniente da contaminação hospedeira de um genótipo originalmente homozigoto ou uma real heterozigosidade. De acordo com Kennedy et al. (2002), muitas raças de cães tendem a ser homozigotos para os genes DLA-II. O CTVT também apresenta-se homozigoto para esses genes quando são diplóides, como a sub-classe I identificada por Murgia et al. (2006).

No presente estudo, dezesseis posições variantes foram identificadas dentro da região amplificada, dentre elas, oito encontradas nos tumores e doze nos hospedeiros. As variantes identificadas nos tumores poderiam ser variantes da

linhagem germinativa, herdadas do cão de origem e transmitidas através das linhagens do CTVT, ou ainda mutações somáticas. Como o loco DLADQA-1 sofreu LOH em algum momento de sua história evolutiva (MURCHISON et al., 2014), todas as variantes tumorais heterozigotas são, provavelmente, alterações somáticas.

Algumas variantes identificadas no presente estudo apresentaram-se exclusivamente nas 17 amostras tumorais, sendo as mesmas não identificadas em nenhuma amostra dos animais hospedeiros. Estas variantes poderiam ser variantes da linhagem germinativa herdada pelo cão que deu origem ao CTVT e que não compartilham com nenhuma das amostras dos hospedeiros no presente estudo. Ou ainda poderiam ser novas mutações somáticas que surgiram durante a história do CTVT como um clone de células somáticas. Entretanto, algumas variantes são compartilhadas entre tumores e hospedeiros. Possivelmente, são variantes da linhagem germinativa herdadas pelo cão de origem, as quais estão presentes também na população canina (MURCHISON et al., 2014).

Com intuito de pesquisar as assinaturas mutacionais no CTVT e comparar com as assinaturas genéticas mutacionais conhecidas em seres humanos, Murchison et al. (2014), descreveram que estas foram dominadas pelas alterações C>T e quatro assinaturas mutacionais foram identificadas, sendo que uma dessas assinaturas, identificada em 42% das mutações no CTVT, é observada em cânceres de pele e associada a exposição ultra violeta (ALEXANDROV et al., 2013). As trocas de bases identificadas nos tumores no atual estudo foram C>T, o que corrobora com os dados descritos anteriormente, além de T>C, G>T, A>T e A>C.

As semelhanças genóticas identificadas entre os animais hospedeiros parecem se agrupar por região geográfica, visto que algumas duplas de amostras descritas foram oriundas de animais provenientes da mesma cidade. Entretanto, outras foram provenientes de animais residentes em diferentes cidades de origem, embora todas as amostras tenham sido coletadas no mesmo país. Assim, foram observados níveis reduzidos de diversidade no loco DLADQA-1, já que do total de 17 amostras dos hospedeiros, oito apresentaram-se idênticas a um outro cão e duas amostras eram homozigotas. Similarmente aos resultados genóticos obtidos com as amostras de sangue dos hospedeiros, alguns animais do grupo controle

apresentaram genótipos idênticos entre si no loco DLADQA-1. Esses achados são surpreendentes levando em consideração a alta variabilidade alélica de MHC em qualquer população (NISKANEN et al., 2013).

Apesar da presença generalizada de casos de CTVT em todo o mundo, de acordo com Strakova e Murchison (2014), a prevalência raramente ultrapassa 10%. Isto contrasta com os padrões epidemiológicos observados no DFTD, outro tumor transmissível, que geralmente ultrapassa 50% nas populações acometidas e que tem provocado um rápido declínio dessa espécie (MURCHISON, 2009). Levando em consideração que a forma de transmissão do CTVT na população canina promova exposição generalizada para a doença (PAL, 2011), sugere-se que talvez parte da população canina possa ser susceptível ao CTVT e, possivelmente, existam cães naturalmente refratários à essa doença. Associado ao fato da expressão de MHC ser subregulada em muitos tumores (KHONG; RESTIFO, 2002), não está claro por que o CTVT, não surgem com maior frequência dentro da população canina.

Dessa forma, na tentativa de identificar possíveis características genóticas presentes nos hospedeiros, as quais pudessem sugerir uma maior susceptibilidade genotípica para o desenvolvimento do CTVT, realizou-se a comparação dos resultados obtidos no sequenciamento do loco DLADQA-1 entre os animais hospedeiros de CTVT e animais do grupo controle. Não houve diferença significativa entre a frequência dos nucleotídeos identificados nas diferentes posições de variantes entre os animais hospedeiros do CTVT e controle. Portanto, esse fato pode ter ocorrido por uma real ausência de susceptibilidade genotípica nos animais hospedeiros, ou devido ao número amostral reduzido, o qual não teve impacto estatístico na avaliação de tal característica. Estudos futuros sobre a exposição e susceptibilidade do CTVT em grandes populações de cães errantes poderá revelar mais informações sobre a base biológica de refratariedade e susceptibilidade dessa doença.

Embora infiltrados linfocíticos sejam considerados uma manifestação da resposta imune contra o câncer, há controvérsias se os linfócitos T tem um papel central na imunidade antitumoral (GAJEWSKI, 2006). Como a regressão espontânea de CTVTs de ocorrência natural e experimentalmente transplantados está associada à uma intensa infiltração local de linfócitos (YANG, 1988; MIZUNO et al., 1989), esta

neoplasia tem sido utilizada como um modelo de estudo dos mecanismos da resposta imunológica envolvidos na regressão do tumor. Entretanto, Silveira et al. (2009) obtiveram a mesma proporção de expressão de CD3⁺ nas fases progressivas e regressivas de CTVTs transplantados experimentalmente, dados que divergem daqueles descritos por Mizuno et al. (1989). De acordo com Yang (1988) e Perez, Day e Mozos (1998), CTVTs de ocorrência espontânea apresentaram maior expressão de linfócitos T CD3⁺ durante a fase de regressão, quando comparados à fase de progressão. Tais dados corroboram com os obtidos no presente estudo quanto à imunomarcção para linfócitos T CD3⁺. Foi observada diferença estatística significativa entre a expressão de CD3⁺ em amostras tumorais em M1 e M2, notando-se maior número de células imunomarcadas em M2 do que em M1.

Adicionalmente, os linfócitos T podem induzir de forma mais acentuada a lise das células tumorais via IgG mediada por citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em CTVTs em fase inicial de regressão, quando comparados a tumores em fase tardia de regressão (TRAIL; YANG, 1985). Portanto, os linfócitos T são considerados de importância primordial na regressão do CTVT (MIZUNO et al., 1989).

De acordo com Perez, Day e Mozos (1998) e Silveira et al. (2009), estudando CTVTs de ocorrência espontânea e transplantados experimentalmente, respectivamente, os linfócitos B apresentaram-se mais expressos em fase regressiva do que em fase progressiva, o que sugere que a resposta imune tumoral local possa ter um papel importante na regressão dessa neoplasia.

De forma similar, a infiltração local de macrófagos no tumor está associada com a fase regressiva do CTVT, de acordo com Yang; Chandler; Dunne-anway (1987) e Perez, Day e Mozos (1998). Entretanto Chandler; Yang (1981), verificaram a presença de um número reduzido de macrófagos no infiltrado leucocitário associado ao CTVT e os mesmos autores descreveram que os macrófagos não parecem ter grande importância, como os linfócitos T, na resposta contra o CTVT.

Contudo, estudos demonstraram que os macrófagos ativados peri-tumorais expressam níveis elevados de óxido nítrico, os quais foram essenciais para a regressão de tumores em ratos tratados com IL-12 (TSUNG et al., 1997). Dessa

forma, sugere-se que o papel dos macrófagos na modulação dessa neoplasia deve ser melhor investigado. Embora o número absoluto de células imunomarcadas para linfócitos B (CD79) e macrófagos (MAC 387) tenha se apresentado mais elevado em M2 quando comparado a M1, não houve diferença significativa entre os dois grupos estudados.

De acordo com Perez; Day; Mozos (1998), mesmo na fase progressiva do CTVT há infiltração tumoral por linfócitos T CD3+, linfócitos B CD79 e macrófagos. Ainda é pouco esclarecido o que desencadeia o influxo de células imunes associadas à progressão e regressão do CTVT (SIDDLÉ; KAUFMAN, 2013).

As citocinas também desempenham um papel importante. De acordo com Hsiao et al. (2008), concentrações mais elevadas de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IFN-gama, são detectadas em culturas *ex vivo* de linfócitos infiltradores de tumores (TILs) em tumores regressivos em comparação com tumores progressivos e a presença destas citocinas aumenta a citotoxicidade das células NK em CTVT *in vitro*.

De acordo com Hsiao et al. (2002), por meio de estudo imunohistoquímico em CTVTs experimentalmente transplantados, demonstraram que a expressão de MHC-I e MHC-II na fase progressiva foi baixa e, gradativamente, foi elevando-se com a fase de regressão tumoral. Resultados semelhantes foram identificados por Perez, Day e Mozos (1998) em CTVTs de ocorrência espontânea em que houve aumento significativo da expressão de MHC-II em tumores do grupo I (tumores estáveis ou em fase de regressão), quando comparado ao grupo II (tumores em fase de progressão). Tais informações corroboram com as obtidas no presente estudo em que houve diferença estatística significativa de células imunomarcadas para MHC-II entre M1 e M2, detectando-se maior expressão em M2, quando comparada à M1. Dessa forma, a expressão de MHC-II pelas células neoplásicas está associada com uma resposta imune efetiva e com a regressão do CTVT (PEREZ; DAY; MOZOS, 1998).

De acordo com Yang, Chandler e Dunne-anway (1987); Perez, Day e Mozos (1998); Hsiao et al. (2002), a expressão de moléculas do MHC pelas células tumorais é importante para a evolução do tumor e células do CTVT evoluem de um

imunofenótipo MHC negativo durante o crescimento tumoral para MHC positivo durante regressão tumoral.

A contagem de figuras de mitose (metáfase, anáfase e telófase) é o método, tradicionalmente, utilizado para estimar a atividade proliferativa de células neoplásicas. Entretanto, como a mitose representa apenas a menor fração do ciclo celular, as células que estiverem nas fases G1, S ou G2 não são contabilizadas, levando a uma sub-estimativa do processo (QUINN; WRIGHT, 1990). Prévios estudos demonstraram que a fração de Ki67 determinada por imuno-histoquímica é considerada um marcador de proliferação celular e têm sido amplamente utilizada em avaliar a proliferação de células tumorais (JALAVA et al., 2006; INWALD et al., 2013). Pelo fato da proteína Ki-67 estar presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) e ausente em células em repouso (G0), faz com que seja um marcador para a determinação da proliferação de células cancerígenas (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

De acordo com Ozalp et al. (2012), o sulfato de vincristina modula a expressão de Ki67 por reduzir a taxa de proliferação celular após cada sessão quimioterápica em CTVTs de ocorrência natural. No presente estudo, embora o padrão de imunomarcção para o antígeno de proliferação Ki67 tenha revelado maior proporção de células imunomarcadas em M1 do que em M2, não houve diferença estatística significativa entre ambas.

Perez, Day e Mozos (1998), demonstraram que o índice mitótico foi estatisticamente menor em tumores em fase de regressão do que na fase progressiva em CTVTs de ocorrência espontânea. Da mesma forma, no presente estudo, a contagem de figuras de mitose revelou-se maior em M1 quando comparada a M2, entretanto, não houve diferença estatística entre os dois momentos. Resultados semelhantes foram obtidos em CTVTs transplantados experimentalmente, contudo, os tumores em fase de regressão não apresentaram atividade mitótica (HILL et al., 1984), o que poderia sugerir um estágio muito tardio de regressão tumoral.

A identificação de antígenos associados a tumores (TAA) indutores de resposta humoral têm contribuído para a compreensão de aspectos biológicos da

carcinogênese e interações entre células cancerígenas e o sistema imunológico do hospedeiro (CIOCCA; CALDERWOOD, 2005).

Diferentes estratégias estão atualmente disponíveis para a identificação de TAA e centenas foram descritos em tumores humanos. A detecção de anticorpos contra TAAs em pacientes com câncer tem sido uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce do câncer, prognóstico e imunoterapia em diversos tipos de cânceres (JAGER; JAGER, KNUTH, 2001; REUSCHENBACH; VON KNEBEL DOEBERITZ; WENTZENSEN, 2009; BUONAGURO et al., 2011). TAAs também têm contribuído para a compreensão do processo de tumorigênese e biologia do câncer (BORTNER et al., 2009; CIOCCA; CALDERWOOD, 2005).

O presente experimento realizado por meio da técnica de *Western Blotting* objetivou investigar e identificar os antígenos tumorais específicos em CTVTs de ocorrência natural e assim, ampliar conhecimentos sobre a resposta humoral nesses pacientes. Verificar se anticorpos de animais portadores de CTVT reconheceriam antígenos específicos em amostras tumorais e, ainda, se esses anticorpos seriam capazes de reconhecer esses mesmos antígenos em diferentes amostras de CTVT do Brasil e de diferentes regiões do mundo.

Anticorpos direcionados contra os antígenos tumorais do CTVT já foram detectados em soros de animais portadores (POWERS, 1968; COHEN, 1972; EPSTEIN; BENNETT, 1974) e, além disso, esses anticorpos já foram detectados circulando em complexo com os antígenos tumorais solúveis, assim como no revestimento da superfície das células tumorais do CTVT (COHEN, 1972; EPSTEIN; BENNETT, 1974; PALKER; YANG, 1985).

Apesar da importância dos anticorpos em controlar o curso do CTVT, os seus alvos (antígenos tumorais) ainda não foram identificados em CTVT de ocorrência espontânea.

A razão para resposta humoral espontânea em câncer não é conhecida, mas pode-se incluir novos epítopos em proteínas expressas, alterações pós-translacionais com relevância imunológica, padrões de expressão específica de tecido alterados ou excesso de abundância de antígenos (FONSECA; DRANOFF, 2008, VESELY et al., 2011).

Inicialmente, utilizou-se testículo e útero como amostras controle oriundas da Inglaterra e, como resultado, além dos anticorpos séricos terem detectado antígenos específicos tanto na amostra de CTVT do mesmo animal provedor do soro como em amostras de CTVT de diferentes cães do Brasil, e ausente nas amostras de tecido controle, esses mesmos antígenos foram igualmente detectados antes e após tratamento quimioterápico. Adicionalmente, os mesmos resultados foram encontrados quando amostras de tumores e soros de diferentes regiões geográficas e também amostras séricas coletadas antes e após o tratamento quimioterápico foram utilizadas. Diante desses resultados, pressupõe-se que tais proteínas pudessem ser específicas do CTVT, já que em seres humanos a presença de anticorpos contra antígenos tumorais específicos no soro de pacientes com câncer é bem estabelecida (REUSCHENBACH; VON KNEBEL DOEBERITZ; WENTZENSEN, 2009).

De acordo com Tan et al. (2009), embora parte da resposta imune nesses pacientes seja o reconhecimento de antígenos que são encontrados apenas em tumores, a maioria dos anticorpos são dirigidos contra antígenos próprios. Isto ocorre porque a maioria dos antígenos do câncer são derivados de proteínas próprias mutadas ou modificadas. Estas proteínas são o produto do acúmulo de várias modificações genéticas nas células somáticas, que por sua vez, fornecem às células cancerígenas vantagem sobre o crescimento e expansão clonal durante o processo de tumorigênese (PARDOLL; 2003, VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

Em uma segunda etapa do presente trabalho, amostras do Equador foram empregadas para os experimentos subsequentes. Foram empregadas amostras controle (língua) do mesmo animal provedor do tumor a ser testado, procedimento ainda não testado no laboratório. Além dessas amostras, foi utilizada língua de um cão da Inglaterra com o objetivo de testar amostra controle de um animal sem prévio contato com o CTVT.

De forma inusitada e surpreendente, houve detecção das bandas nomeadas anteriormente “específicas”, ou seja, presentes somente nas amostras tumorais e ausentes nas amostras controle, também nas amostras de tecido controle (língua), como também a mesma banda se revelou presente na amostra de língua de cão não portador de CTVT da Inglaterra.

Diante de tal fato, alguns questionamentos foram levantados: 1) As bandas detectadas na amostra de língua poderiam ser um produto de degradação de IgG?; 2) As bandas detectadas poderiam ser decorrentes de um antígeno exógeno presente no CTVT e também na língua? E ainda presente em tumores de diferentes países?; 3) As bandas detectadas poderiam ser o resultado da ação de anticorpos tumorais contra algumas próprias proteínas?

Todavia, é improvável que a banda detectada na amostra de língua seja um produto da degradação de IgG, já que no mesmo ensaio não houve detecção de bandas, quando utilizou-se soro de cão britânico, como controle negativo.

Há a possibilidade de tratar-se de um antígeno compartilhado com baixa especificidade antigênica, presente na língua e também no tecido tumoral e, portanto, definido como reação cruzada. Entretanto, é remota a possibilidade de que esse antígeno seja compartilhado entre tumores de diferentes países. Ou ainda, de o CTVT induzir em seu hospedeiro a produção de anticorpos contra algumas proteínas próprias.

Contudo, há a possibilidade de que as bandas de peso molecular semelhantes identificadas no tecido tumoral e na língua não sejam, necessariamente, a mesma proteína. Assim, faz-se necessário o sequenciamento proteico das bandas observadas na língua para a afirmação de que estas possam ser idênticas àquelas identificadas no tecido tumoral.

Quanto aos resultados obtidos por meio da espectrometria de massa, não há dados suficientes para afirmar que as proteínas do MHC-I e MHC-II identificadas, sejam realmente oriundas do tumor. Essas também poderiam ser provenientes das células hospedeiras entremeadas nas células tumorais.

Embora apenas preliminar, esses resultados destacam a possibilidade da utilização de uma abordagem imunoproteômica para a detecção de TAA em CTVTs utilizando soro de cães portadores desta neoplasia.

A caracterização desses antígenos tem o potencial de abrir novas áreas de pesquisa para ampliar o conhecimento sobre a biologia das células cancerígenas do CTVT. Também pode proporcionar oportunidades para o desenvolvimento de modelos de estudo para outros cânceres e, ainda, fornecer informações sobre a resposta imune e mecanismos de evasão em diferentes áreas da pesquisa.

7 CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos no presente estudo e nas condições em que foi conduzido, permite-se concluir que:

- ✓ Não houve expressão gênica de *DLADQA-1* em CTVTs antes do tratamento quimioterápico (M1) e em três semanas após o início da quimioterapia (M2)
- ✓ Detectou-se maior expressão proteica de MHC-II em M2 quando comparada a M1 e, provavelmente, essa expressão deve-se às células estromais do hospedeiro infiltradas na amostra tumoral.
- ✓ Em amostras de gDNA, constatou-se que a maior amplificação de *DLADQA-1* em M1 foi procedente das células tumorais e, em M2 em sua maioria foi proveniente das células hospedeiras.
- ✓ Em amostras de cDNA, não houve expressão de *DLADQA-1* tumor alelo específico em M1 e em M2. Isto sugere que *DLADQA-1* não é, significativamente, expresso em células de CTVT e que a expressão de *DLADQA-1* foi atribuída somente ao alelo do hospedeiro.
- ✓ Constatou-se semelhança genotípica do loco *DLADQA-1* (exon 2) entre as amostras tumorais, as quais diferem de seus hospedeiros correspondentes.
- ✓ Não houve predisposição genotípica para o desenvolvimento do CTVT nos cães hospedeiros.
- ✓ Observou-se maior número de células imunomarcadas para CD3+ em M2 do que em M1.
- ✓ Não foi possível a identificação de antígenos tumorais específicos do CTVT.

8 PERSPECTIVAS

O estudo de MHC em CTVT fornece uma visão fascinante sobre a biologia da persistência do enxerto e evasão do sistema imune de células cancerígenas. Este projeto proporcionou uma investigação preliminar sobre um dos locos do MHC-II e sua expressão no CTVT, o qual representa a evolução de uma célula cancerígena para um parasita bem sucedido.

Em trabalhos futuros, pretende-se aprofundar os estudos sobre o MHC na transmissão e progressão do CTVT e também estudar outros locos de MHC-I e MHC-II. Experimentos envolvendo locos gênicos de MHC-I poderão trazer informações promissoras sobre este tema, já que esta classe de proteínas é expressa em todas as células somáticas.

Futuros projetos poderiam avaliar uma população maior e mais diversa de cães com intuito de comparação dos genótipos MHC de cães com CTVT e cães que, sabidamente, nunca tiveram contato com CTVT, por exemplo cães originalmente britânicos. Com a baixa variabilidade genotípica das amostras dos hospedeiros, é possível que haja grupos genotípicos específicos identificados em cães com CTVT que poderiam explicar sua susceptibilidade nesses pacientes. Outra possibilidade seria comparar cães em diferentes fases da doença e em diferentes momentos após a administração do sulfato de vincristina, o qual ainda continua sendo o principal quimioterápico utilizado no tratamento do CTVT.

Embora a imunidade celular e MHC sejam implicados na progressão tumoral, sabe-se que a resposta humoral é relevante no CTVT. Prévios estudos relataram que a resposta imune com anticorpos é organizada contra o CTVT (EPSTEIN; BENNETT, 1974), especificamente com aumento de IgG (FENTON; YANG, 1988; PEREZ; DAY; MOZOS, 1998). Estudos moleculares da resposta humoral poderão proporcionar um maior contexto para a compreensão das interações entre o CTVT e seu hospedeiro.

Ainda, estudos futuros da β 2-microglobulina e das células inflamatórias no microambiente tumoral, bem como trabalhos envolvendo cultura de células primárias e interleucinas, poderão fornecer informações adicionais pelo qual esse câncer é capaz de escapar à detecção imunológica como um parasita bem-sucedido.

Adicionalmente, uma investigação mais precisa dos antígenos tumorais, incluindo a utilização de língua e diversas outras amostras de tecido controle seria fundamental para desvendar os resultados obtidos no presente estudo. A identidade destes antígenos poderá fornecer informações adicionais sobre os mecanismos pelos quais o CTVT se evade do sistema imune como um enxerto alogênico, fornecendo caminho não só para a compreensão das estratégias de evasão imune desta doença infecciosa intrigante, mas, possivelmente, também no sentido de elucidação dos mecanismos biológicos que podem ser explorados para prevenir a rejeição de enxertos em pacientes transplantados.

9 REFERÊNCIAS*

ALGARRA, I.; COLLADO, A.; GARRIDO, F. Altered MHC class I antigens in tumors. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v. 27, p. 95-102, 1997.

ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, p. 415-421, 2013.

AMARIGLIO, E. N.; HAKIM, I.; BROK-SIMONI, F.; GROSSMAN, Z.; KATZIR, N.; HARMELIN, A.; RAMOT, B.; RECHAVI, G. Identity of rearranged LINE/c-MYC junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 8136-8139, 1991.

BANFIELD, W. G.; WOKE, P. A.; MACKAY, C. M.; COOPER, H. L. Mosquito transmission of a reticulum cell sarcoma of hamsters. **Science**, v. 148, p. 1239-1240, 1965.

BARSKI, G.; CORNEFERT-JENSEN, F. Cytogenetic study of Sticker venereal sarcoma in European dogs. **J Natl Cancer Inst**, v. 37, p. 787-797, 1966.

BELOV, K. The role of the major histocompatibility complex in the spread of contagious cancers. **Mammalian Genome**, v. 22, p. 83-90, 2011.

BELOV, K. Contagious cancer: Lessons from the devil and the dog. **Bioessays**, v. 34, p. 285-292, 2012.

BENNETT, B. T.; DEBELAK-FEHIR, K. M.; EPSTEIN, R. B. Tumor-blocking and inhibitory serum factors in the clinical course of canine venereal tumor. **Cancer Research**, v. 35, p. 2942-2947, 1975.

BESCHORNER, W. E.; HESS, A. D.; NERENBERG, S. T.; EPSTEIN, R. B. Isolation and characterization of canine venereal tumor-associated inhibitory and blocking factors. **Cancer Research**, v. 39, p. 3920-3927, 1979.

BIRKELAND, S. A.; STORM, H. H. Risk for tumor and other disease transmission by transplantation: a population-based study of unrecognized malignancies and other diseases in organ donors. **Transplantation**, v. 74, p. 1409-1413, 2002.

BLAINE, D. P. A domestic treatise on the diseases of horses and dogs (T. Boosey, London), p. 161-162, 1810.

BORTNER, J. D.; JR.; DAS, A.; UMSTEAD, T. M.; FREEMAN, W. M.; SOMIARI, R.; ALIAGA, C. et al. Down-regulation of 14-3-3 isoforms and annexin A5 proteins in lung adenocarcinoma induced by the tobacco-specific nitrosamine NNK in the A/J mouse revealed by proteomic analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 4050-4061, 2009.

BRADLEY, B. A. The role of HLA matching in transplantation. **Immunology Letters**, v. 29, p. 55- 59, 1991.

BRANDÃO, C.V.S. et al. Tumor venéreo transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, v.5, p.25-31, 2002.

BRINDLEY, D. C.; BANFIELD, W. G. A contagious tumor of the hamster. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 26, p. 949-957, 1961.

BROOKS, M. B.; GU, W.; BARNAS, J. L.; RAY, J.; RAY, K. A Line 1 insertion in the factor IX gene segregates with mild hemophilia B in dogs. **Mammalian Genome**, n. 14, p. 788-795, 2003.

BROWN, G. K.; KREISS, A.; LYONS, A. B.; WOODS, G. M. Natural killer cell mediated cytotoxic responses in the Tasmanian devil. **PLoS One**, v. 6, n. 9, 2011.

BRUNSTEIN, C. G.; HIRSCH, B. A.; HAMMERSCHMIDT, D.; MCGLENNEN, R. C.; NGUYEN, P. L.; VERFAILLIE, C. M. Leukemia in donor cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. **Bone Marrow Transplantation**, v. 29, p. 999-1003, 2002.

BUELL, J. F.; BEEBE, T. M.; TROFE, J.; GROSS, T. G.; ALLOWAY, R. R.; HANAWAY, M. J et al. Donor transmitted malignancies. **Annals of Transplantation**, v. 9, p. 53-56, 2004.

BUONAGURO, L.; PETRIZZO, A. TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, F. M. Translating tumor antigens into cancer vaccines. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p. 23-34, 2001.

BURNETT, R. C.; DEROSE, S. A.; WAGNER, J. L.; STORB, R. Molecular analysis of six dog leukocyte antigen class I sequences including three complete genes, two truncated genes and one full-length processed gene. **Tissue Antigens**, v. 49, p. 484-495, 1997.

BURNETT, R. C.; GERAGHTY, D. E. Structure and expression of a divergent canine class I gene. **J Immunol**, v. 155, p. 4278-4285, 1995.

CHANG, C. C.; CAMPOLI, M.; FERRONE, S. Classical and nonclassical HLA class I antigen and NK cell-activating ligand changes in malignant cells: current challenges and future directions. **Advances in Cancer Research**, v. 93, p. 189–234, 2005.

CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. **Immunity**, v. 39, n. 25, p. 1-10, 2013.

CHOI, Y.; KIM, C.J. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 gene in canine transmissible venereal tumor. **Journal of Veterinary Science**, n. 3, p. 285-292, 2002.

CHOI, Y.; ISHIGURO, N.; SHINAGAWA, M.; KIM, C. J.; OKAMOTO, Y.; MINAMI, S.; OGIHARA, K. Molecular structure of canine LINE-1 elements in canine transmissible venereal tumor. **Animal Genetics**, n. 30, p. 51-53, 1999.

CHU, R. M.; LIN, C. Y.; LIU, C. C.; YANG, S. Y.; HSIAO, Y. W.; HUNG, S. W.; PAO, H. N.; LIAO, K. W. Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. **Anticancer Research**, v. 21, p. 4017-4024, 2001.

CIOCCA, D. R.; CALDERWOOD, S. K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. **Cell Stress Chaperones**, v. 10, p. 86-103, 2005.

COHEN, D. Detection of humoral antibody to the transmissible venereal tumour of the dog. **Int J Cancer**, v. 10, p. 207-212, 1972.

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

COHEN, D. The transmissible venereal tumor of the dog- a naturally occurring allograft? A Review. In: WEISS, D. W. (Ed.). **Immunological parameters of host-tumor relationships**, New York: Academic, v. 5, p. 14-19, 1978

COHEN, D.; SHALEV, A.; KRUP, M. Lack of beta 2-microglobulin on the surface of canine transmissible venereal tumor cells. **J Natl Cancer Inst**, v. 72, p. 395-401, 1984.

COHEN, D. The canine transmissible venereal tumour: a unique result of tumour progression. **Advances in cancer research**, n. 43, p. 75-112, 1985.

COOPER, H. L.; MACKAY, C. M.; BANFIELD, W. G. Chromosome studies of a contagious reticulum cell sarcoma of the Syrian hamster. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 33, p. 691-706, 1964.

DAS, U.; DAS, A. K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Veterinary Research Communications**, v. 24, n. 8, p. 545-556, 2000.

DEAKIN, J. E. et al. Genomic restructuring in the Tasmania Devil Facial Tumour: chromosome painting and gene mapping provide clues to evolution of a transmissible tumour. **Plos genetics**, v. 8, n. 2, p. 1-16, 2012.

DEBENHAM, S. L.; HART, E. A.; ASHURST, J. L.; HOWE, K. L.; QUAIL, M. A.; OLLIER, W. E.; and BINNS, M. M. Genomic sequence of the class II region of the canine MHC: comparison with the MHC of other mammalian species. **Genomics**, v. 85, p. 48-59, 2005.

DOXIADIS, G.; REBMANN, V.; DOXIADIS, I.; KRUMBACHER, K.; VRIENSDORP H. M.; GROSSE-WILDE, H. Polymorphism of the fourth complement component in the dog. **Immunobiology**, v. 169, p. 563–569, 1986.

DUTRA, A. S.; MIGNOT, E.; PUCK, J. M. Gene localization and syntenic mapping by FISH in the dog. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 74, p. 113–117, 1996.

EPSTEIN, R.; BENNETT, B. Histocompatibility typing and course of canine venereal tumors transplanted into unmodified random dogs. **Cancer Research**, v. 34, p. 788-793, 1974.

FENG, S.; BUELL, J. F.; CHARI, R. S.; DIMAIO, J. M.; HANTO, D. W. Tumors and transplantation: The 2003 Third Annual ASTS State-of-the-Art Winter Symposium. **American Journal of Transplantation**, v. 3, p. 1481-1487, 2003.

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

FONSECA, C.; DRANOFF, G. Capitalizing on the immunogenicity of dying tumor cells. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 1603-1608, 2008.

FONSECA, L. S.; MOTA, L. S. L. S.; COLODEL, M. M.; FERREIRA, I.; BRANDÃO, C. V. S.; ROCHA, N. S. Spontaneous canine transmissible venereal tumor: association between different phenotypes and the insertion LINE-1/c-myc. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 25, p. 402-408, 2012.

FRANK, S. A.; NOWAK, M. A. Problems of somatic mutation and cancer. **BioEssays**, v. 26, p. 292-299, 2004.

GAJEWSKI, T. F. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 213, p.131-145, 2006.

GANDHI, M. J.; STRONG, D. M. Donor derived malignancy following transplantation: a review. **Cell and Tissue Banking**, v. 8, n.4, p. 267-286, 2007.

GANGULY, B.; DAS, U.; DAS, A. K. Canine transmissible venereal tumour: a review. **Veterinary and Comparative Oncology**, 2013. Disponível em:<http://dx.doi.org/10.1111/vco.12060>.

GARCIA-PEREZ, J. L. et al. LINE-1 retrotransposition in human embryonic stem cells. **Human Molecular Genetics**, v.16, n.13, p. 1569-1577, 2007.

GARTNER, H. V. et al. Genetic analysis of a sarcoma accidentally transplanted from a patient to a surgeon. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, p. 1494-1496, 1996.

GINEL, P. J.; MOLLEDA, J. M.; NOVALES, M.; MARTIN, E.; MARGARITO J. M.; LOPEZ, R. Primary transmissible venereal tumor in the nasal cavity of a dog. **Veterinary Record**, v. 136, p. 222-223, 1995.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 4, p. 646-674, 2011.

HAWKINS, C. E.; BAARS, C.; HESTERMAN, H.; HOCKING, G. J.; JONES, M. E.; LAZENBY, B. et al. Emerging disease and population decline of an island endemic, the Tasmanian devil *Sarcophilus harrisii*. **Biological Conservation**, v. 131, p. 307-324, 2006.

HESS, A.; CUNNINGHAM, B.; TAYLOR BENNETT, B.; EPSTEIN, R. In vitro correlates of the in vivo course of the canine transmissible venereal tumor studied by mixed lymphocyte-tumor cultures. **Transplantation Proceedings**, v. 7, p. 507-511, 1975.

HILL, D. L.; YANG, T. J.; WACHTEL, A. Canine transmissible venereal sarcoma: Tumor cell and infiltrating leukocyte ultrastructure at different growth stages. **Vet. Pathol**, v. 21, p. 39-45, 1984.

HSIAO, Y. W.; LIAO, K. W.; HUNG, S. W.; CHU, R. M. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, p. 19-27, 2002.

HSIAO, Y. W.; LIAO, K. W.; HUNG, S. W.; CHU, R. M. Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF-beta 1 and restores the lymphokine-activated killing activity. **Journal of Immunology**, n. 172, p. 1508-1514, 2004.

HSIAO, Y. W.; LIAO, K. W.; CHUNG, T. F.; LIU, C. H.; HSU, C. D.; CHU, R. M. Interactions of host IL-6 and IFN-gamma and cancer-derived TGF-beta1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 57, p. 1091-1104, 2008.

IDOWU, A. The chromosomes of the transmissible venereal tumour of dogs in Ibadan, Nigeria. **Res Vet Sci**, v. 22, p. 271-273, 1977.

INWALD, E. C.; KLINKHAMMER-SCHALKE, M.; HOFSTADTER, F.; ZEMAN, F.; KOLLER, M.; GERSTENHAUER, M.; ORTMANN, O. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 139, p. 539-552, 2013.

JAGER, D.; JAGER, E.; KNUTH, A. Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 669-674, 2001.

JALAVA, P.; KUOPIO, T.; JUNTTI-PATINEN, L.; KOTKANSALO, T.; KRONQVIST, P.; COLLAN, Y. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardised mitotic index. **Histopathology**, v. 48, p. 674-682, 2006.

KAKPAKOVA, E. S.; POGOSIANTS, E. E.; VI, P. K. (1968). Characteristics of the karyotype of cells of transmissible dog sarcoma. **Vopr Onkol**, v. 14, p. 43-50, 1968.

KATZIR, N.; RECHAVI, G.; COHEN, J. B.; UNGER, T.; SIMONI, F.; SEGAL, S.; COHEN, D.; GIVOL, D. "Retroposon" insertion into the cellular oncogene c-myc in canine transmissible venereal tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 1054-1058, 1985.

KATZIR, N.; ARMAN, E.; COHEN, D.; GIVOL, D.; RECHAVI, G. Common origin of transmissible venereal tumors (TVT) in dogs. **Oncogene**, v. 1, p. 445-448, 1987.

KENNEDY, L. J.; ALTET, L.; ANGLES, J. M.; BARNES, A.; CARTER, S. D.; FRANCINO, O.; GERLACH, J. A.; HAPP, G. M.; OLLIER, W. E.; POLVI, A. Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA), 1998: first report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. **Animal Genetics**, v. 31, p. 52-61, 2000.

KENNEDY, L. J.; BARNES, A.; HAPP, G. M.; QUINNELL, R. J.; BENNETT, D.; ANGLES, J. M.; DAY, M. J.; CARMICHAEL, N.; INNES, J. F.; ISHERWOOD, D.; et al. Extensive interbreed, but minimal intrabreed, variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs. **Tissue Antigens**, v. 59, p. 194-204, 2002.

KHONG, H. T.; RESTIFO, N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. **Nat Immunol**, v. 3, n. 11, p. 999-1005, 2002.

KUMANOVICS, A.; TAKADA, T.; LINDAHL, K. F. Genomic organization of the mammalian MHC. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 629-657, 2003.

LEFEBVRE, G. N. F.; BONAMIN, L. V.; OLIVIERA, C. M. Tratamento de tumor venéreo transmissível (tvt) canino utilizando Viscum álbum em associação à quimioterapia. **Clinica Veterinária**, v.70, p.78-86, 2007.

LIAO, K. W.; LIN, Z. Y.; PAO, H. N.; KAM, S. Y.; WANG, F. I.; CHU, R.M. Identification of canine transmissible venereal tumor cells using in situ polymerase chain reaction and the stable sequence of the long interspersed nuclear element. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 15, n. 5, p. 399-406, 2003.

LORIMIER, L. P. D; FAN, T. M. Canine transmissible venereal tumor. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small animal clinical oncology**. 4 ed. Philadelphia: Saunders, cap 32, p. 799-804, 2007.

LIU, C. C.; WANG, Y. S.; LIN, C. Y.; CHUANG, T. F.; LIAO, K. W.; CHI KH et al. Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an in vivo canine model of transmissible venereal tumor. **Cancer Immunology Immunotherapy**, n. 57, p. 479-491, 2008.

MAKINO, S. Some epidemiological aspects of venereal tumours of dogs as revealed by chromosome and DNA studies. **Ann NY Acad Sci**, v. 108, p. 1106-1122, 1963.

MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; KAPLANSKI, C.; RIGAL, D.; MAGNOL, J. P. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 57, p. 1-11, 1997.

METZGER, M. J.; REINISCH, C.; SHERRY, J.; GOFF, S. P. Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in soft-shell clams. **Cell**, v. 161, n. 9, p. 1-9, 2015.

MIZUNO, S.; FUJINAGA, T.; TAJIMA, M.; OTOMO, K.; KOIKE, T. Role of lymphocytes in dogs experimentally re-challenged with canine transmissible sarcoma. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v.51, p. 86-95, 1989.

MOZOS, E.; MENDEZ, A.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; MARTIN DE LAS MULAS, J.; PEREZ, J. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 257-263, 1996.

MUKARATIRWA, S.; GRUYS, E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. **Veterinary Quartely**, v. 3, n. 25, p. 101-111, 2003.

MUEHLENBACHS et al. Malignant Transformation of *Hymenolepis nana* in a Human Host. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 1845-1852, 2015

MURCHISON, E. P. Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmania devils. **Oncogene**, v. 27, p. 19-30, 2009.

MURCHISON, E. P. et al. Genome sequencing and analysis of the Tasmanian Devil and its transmissible cancer. **Cell**, v. 148, n. 17, p. 780-791, 2012.

MURCHISON, E. P.; WEDGE, D. C.; ALEXANDROV, L. B.; FU, B.; MARTINCORENA I.; NING, Z.; TUBIO, J. M. C.; WERNER, E. I.; ALLEN, J.; DE NARDI, A. B.; DONELAN, E. M.; MARINO, G.; FASSATI, A.; CAMPBELL, P. J.; YANG, F.; BURT, A.; WEISS, R. A.; STRATTON, M. R. Transmissible dog cancer genome reveals the origin and history an ancient cell lineage. **Science**, v. 343, n. 24, p. 437-440, 2014.

MURGIA, C.; PRITCHARD, J. K.; KIM, S. Y.; FASSATI, A.; WEISS, R. A. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. **Cell**, v. 126, n. 11, p. 477-487, 2006.

MURRAY, M.; JAMES, Z. H.; MARTIN, W. B. A study of the cytology and karyotype of the canine transmissible venereal tumour. **Res Vet Sci**, v. 10, p. 565-568, 1969.

NISKANEN, A. K.; HAGSTROM, E.; LOHI, H.; RUOKONEN, M.; ESPARZA-SALAS, R.; ASPI, J.; SAVOLAINEN, P. MHC variability supports dog domestication from a large number of wolves: high diversity in Asia. **Heredity**, v. 110, p. 80-85, 2013.

NOBORI, T.; MIURA, K.; WU, D. J.; LOIS, A.; TAKABAYASHI, K.; CARSON, D. A. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. **Nature**, San Diego, v. 368, p. 753-756, 1994.

NOVELLINO, L.; CASTELLI, C.; PARMIANI, G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. **Cancer Immunology Immunotherapy**, n. 54, p. 187-207, 2005.

OZALP, G. R. et al. Vincristine modulates the expression of Ki67 and apoptosis in naturally occurring canine transmissible venereal tumor (TVT). **Biotechnic & Histochemistry**, v. 87, n. 5, p. 325-330, 2012.

PAL, S. K. Mating System of Free-Ranging Dogs (*Canis familiaris*). **International Journal of Zoology**, 2011.

PALKER, T. J.; YANG, T. J. Detection of immune complexes in sera of dogs with canine transmissible venereal sarcoma (CTVS) by a conglutinin-binding assay. **Journal of Comparative Pathology**, v. 95, p. 247-258, 1985.

PARDOLL, D. Does the immune system see tumors as foreign or self? **Annual Review of Immunology**, n. 21, p. 807-839, 2003.

PEARSE, A. M.; SWIFT, K. Allograft theory: transmission of devil facial tumour disease. **Nature**, v. 439, p. 549, 2006.

PEREZ, J.; DAY, M. J.; MOZOS, E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, p. 133-147, 1998.

PINHEIRO, L. E. L.; LAUS, J. L.; ALMEIDA JÚNIOR, I. L.; DALECK, C. R. Demonstração direta dos cromossomos do tumor venéreo canino utilizando a vincristina. *Ars Vet.*, Jaboticabal, v. 2, n. 1, p. 41-44, 1986.

POWERS, R.; D. Immunologic properties of canine transmissible venereal sarcoma. **Am J Vet Res**, v. 29, p. 1637-1645, 1968.

PYECROFT, S. B. et al. Towards a case definition for devil facial tumour disease: What is it?. **EcoHealth**, v. 4, p. 346-351, 2007.

QUINN, C. M.; WRIGHT, N. A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and application as prognostic variables. **Journal of Pathology**, Chinchester, v.160, p.93-102, 1990.

REBBECK, C. A. **Canine transmissible cancer: evolution of a selfish cell lineage**. 2007. Doctoral thesis. Imperial College London, London, England, 2007.

REBBECK, C. A.; THOMAS, R.; BREEN, M.; LEROI, A. M.; BURT, A. Origins and evolution of a transmissible cancer. **Evolution**, v. 63, n. 9, p. 1-10, 2009.

REUSCHENBACH, M.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; WENTZENSEN, N. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. **Cancer Immunology Immunotherapy**, n. 58, p. 1535-1544, 2009.

RICHARDSON, V. B.; SAPP, W. J.; ADAMS, E. W. The distribution of C-bands in canine transmissible venereal tumor cells. **Cornell Vet**, v. 77, p. 161-167, 1987.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SARMIENTO, U. M; STORB, R. F. Nucleotide sequence of a dog class I cDNA clone. **Immunogenetics**, v. 31, p. 400-404, 1990.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, p. 1565-1570, 2011.

SHANKARAN, V.; IKEDA, H.; Bruce, A. T.; WHITE, J. M.; SWANSON, P. E.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, p. 1107–1111, 2001.

SIDDLE, H. V.; KREISS, A.; TOVAR, C.; YUEN, C. K.; CHENG, Y.; BELOV, K.; SWIFT, K.; PEARSE, A. M.; HAMEDE, R.; JONES, M. E. et al. Reversible epigenetic down-regulation of MHC molecules by devil facial tumour disease illustrates immune escape by a contagious cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 110, p. 5103-5108, 2013.

SIDDLE, H. V.; KAUFMAN, J. A tale of two tumours: comparison of the immune escape strategies of contagious cancers. *Mol Immunol*, v. 55, n. 2, p. 190-193, 2013

SILVA, M. C. V. et al. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica to tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no Hospital Veterinário da UFERSA. **Acta Veterinaria Brasília**, v. 1, n. 1, p. 28-32, 2007.

SILVEIRA, A. C. T.; GERARDI, D.; MOURO, J. V.; TINUCCI-COSTA, M.; ALESSI, A. C. Immunohistochemical expression of B and T-lymphocytes and TGF- β in experimentally transplanted canine venereal tumor. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1148-1154, 2009.

STRAKOVA, A.; MURCHISON, E. P. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 168, p. 1-10, 2014.

STRAKOVA, A.; MURCHISON, E. P. The cancer which survived: insights from the genome an 11000 year-old cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 30, p. 49-55, 2015.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, n. 9, p. 719-724, 2009.

STRAUSS, D. C.; THOMAS, J. M. Transmission of donor melanoma by organ transplantation. **The Lancet Oncology**, v. 11, p. 790-796, 2010.

TAKAYAMA, S.; MAKINO, S. A study of chromosomes in venereal tumors of the dog. **Z Krebsforsch**, v. 64, p. 253-261, 1961.

TAN, H. T.; LOW, J.; LIM, S. G.; CHUNG, M. C. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. **FEBS Journal**, v. 276, p. 6880-6904, 2009

TINUCCI COSTA, M. Utilização do fator de transferência dializável (TFD) e RNA imune na imunoterapia de cães portadores de tumor venéreo transmissível canino. 1994. 97f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1994.

TINUCCI-COSTA, M. Tumor venéreo transmissível canino. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. 1.ed. São Paulo: Roca, cap. 34, p.539-555, 2008.

THIAGALINGAM, S.; LAKEN, S.; WILLSON, J. K.; et al. Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 5, p. 2698-2702, 2001.

TOLAR, J.; NEGLIA, J. P. Transplacental and other routes of câncer transmission between individuals. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 25, p. 430-434, 2003.

TRAIL, P. A.; YANG, T. J. Canine transmissible venereal sarcoma: Quantitation of lymphocyte-T subpopulations during progressive growth and spontaneous tumor regression. **J. Natl. Cancer Inst**, v. 74, p. 461-467, 1985.

TSUNG, K.; MEKO, J. B.; PEPLINSKI, G. R.; TSUNG, Y. L.; NORTON, J. A. IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. **J. Immunol**, v. 158, p. 3359-3365, 1997.

VALADÃO, M. L.; SCARPELLI, K. C.; METZE, K. Clinical utility of a life quality score in dogs with canine transmissible venereal tumor treated by vincristine chemotherapy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1086-1093, 2010.

VÁSQUEZ-MOTA, N.; SIMÓN-MARTÍNEZ, J.; CÓRDOVA-ALARCON, E.; LAGUNES, L.; FAJARDO, R. The T963C mutation of TP53 gene does not participate in the clonal origin of canine TVT. **Vet Res Commun**, n. 32, p. 187-191, 2008.

VESELY, M. D.; KERSHAW, M. H.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annual Review of Immunology**, n. 29, p. 235-271, 2011.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v. 10, p. 789-799, 2004.

VONHOLDT, B. M.; OSTRANDER, E. A. The singular history of a Canine Transmissible Tumor. **Cell**, n. 126, p. 445-57, 2006.

WAGNER, J. L.; DEROSE, S. A.; BURNETT, R. C.; STORB, R. Nucleotide sequence and polymorphism analysis of canine DRA cDNA clones. **Tissue Antigens**, v. 45, p. 284-287, 1995.

WAGNER, J. L.; BURNETT, R. C.; DEROSE, S. A.; STORB, R. Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQA gene. **Tissue Antigens**, v. 48, p. 199-204, 1996a.

WAGNER, J. L.; BURNETT, R. C.; STORB, R. Molecular analysis of the DLA-DR region. **Tissue Antigens**, v. 48, p. 549-553, 1996b.

WAGNER, J. L.; HAYES-LATTIN, B.; WORKS, J. D.; STORB, R. Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQB genes. **Tissue Antigens**, v. 52, p. 242–250, 1998.

WAGNER, J. L.; BURNETT, R. C.; STORB, R. Organization of the canine major histocompatibility complex: Current Perspectives. **Journal of Heredity**, v. 90, n. 1, p. 35-38, 1999.

WAGNER, J. L. Molecular organization of the canine major histocompatibility complex. **Journal of Heredity**, v. 94, n.1, p. 23-26, 2003.

WANG, E.; HUTCHINSON, C. B.; HUANG, Q.; LU, C. M.; CROW, J.; WANG, F. F. et al. Donor cell-derived leukemias/myelodysplastic neoplasms in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a clinicopathologic study of 10 cases and a comprehensive review of the literature. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 135, p. 525-540, 2011.

WEBER, W. T.; NOWELL, P. C.; HARE, W. C. Chromosome studies of a transplanted and a primary canine venereal sarcoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 35, p. 537-547, 1965.

WELSH, J. S. Contagious cancer. **The Oncologist**, v. 16, p. 1-4, 2011.

WIJNHOVEN, S. W.; KOOL, H. J.; VAN TEIJLINGEN, C. M.; VAN ZEELAND, A. A.; VRIELING, H. Loss of heterozygosity in somatic cells of the mouse. An important step in cancer initiation?. **Mutation Research**, v. 473, p. 23-36, 2001.

ZUCKER, K.; LU, P.; FULLER, L.; ASTHANA, D.; ESQUENAZI, V.; MILLER, J. Cloning and expression of the cDNA for canine tumor necrosis factor- alpha in E. coli. **Lymphokine Cytokine Res**, v. 13, p. 191–196, 1994.

ZUR HAUSEN, H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. **Virology**, v. 392, p. 1-10, 2009.

YANG, T. J.; JONES, J. B. Canine transmissible venereal sarcoma: transplantation studies in neonatal and adult dogs. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, p. 1915-1918, 1973.

YANG, T. J.; CHANDLER, J. P.; DUNNE-ANWAY, S. Growth stage dependent expression of MHC antigens on the canine transmissible venereal sarcoma. **British Journal of Cancer**, v. 55, p. 131-134, 1987.

YANG, T. J. Immunobiology of a spontaneously regressive tumor, the canine transmissible venereal sarcoma (review). **Anticancer Research**, v. 8, p. 93–95, 1988.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Questionário e termo de consentimento livre esclarecido respondido e assinado pelos proprietários dos animais incluídos no presente estudo

PROJETO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL

Nome: _____ RGHV: _____ Sexo: <input type="checkbox"/> macho Raça: _____ <input type="checkbox"/> fêmea Peso: _____ Idade: _____ Cor: _____	Proprietário: _____ Endereço: _____ _____ Telefone: _____ Cidade: _____
--	---

Vive em : <input type="checkbox"/> zona urbana <input type="checkbox"/> zona rural Adquiriu o cão: <input type="checkbox"/> filhote _____ meses <input type="checkbox"/> adulto _____ anos Onde foi adquirido? _____ Vacinação: <input type="checkbox"/> somente qdo filhote <input type="checkbox"/> V8 / V10 <input type="checkbox"/> Raiva <input type="checkbox"/> Outras _____ <input type="checkbox"/> adulto – anual <input type="checkbox"/> V8 / V10 <input type="checkbox"/> Raiva <input type="checkbox"/> Outras _____ <input type="checkbox"/> não sabe Vermifugação: <input type="checkbox"/> SIM. Quando? _____ Nome/dose: _____ <input type="checkbox"/> NÃO Alimentação: <input type="checkbox"/> Ração <input type="checkbox"/> Ração e comida caseira <input type="checkbox"/> Somente Comida Caseira (Qual?) _____ Há contactantes? <input type="checkbox"/> SIM. Quantos/Assintomático ou sintomático? _____ <input type="checkbox"/> NÃO Qual motivo consulta? _____ Local? _____ Tempo de início: _____ Secreção <input type="checkbox"/> SIM. Aspecto/Coloração _____ <input type="checkbox"/> NÃO Tipo evolução? _____ Metástase? <input type="checkbox"/> SIM. Local? _____ <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> INDETERMINADA Recidiva? <input type="checkbox"/> Sim. Quando/Quantas vezes? _____ <input type="checkbox"/> NÃO Está sendo tratado com alguma medicação? <input type="checkbox"/> SIM (qual?) _____ (tempo?) _____ <input type="checkbox"/> NÃO Foi tratado com alguma medicação nos últimos 60 dias? <input type="checkbox"/> SIM (qual?) _____ (tempo?) _____ <input type="checkbox"/> NÃO Doenças anteriores: <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> SIM (qual?) _____ Castrado (a)? <input type="checkbox"/> SIM. Com qual idade? _____ <input type="checkbox"/> NÃO Ciclo estral? <input type="checkbox"/> 6/6meses <input type="checkbox"/> menos 6 meses <input type="checkbox"/> maior 6 meses <input type="checkbox"/> não é observado. Duração (dias) _____ Tem acesso a rua? <input type="checkbox"/> SIM. Com qual frequência? _____ <input type="checkbox"/> NÃO Já cruzou? <input type="checkbox"/> SIM. Gestação (nº partos/Tipo)? _____ <input type="checkbox"/> NÃO Já apresentou pseudosciese? <input type="checkbox"/> SIM. Frequência? _____ <input type="checkbox"/> NÃO Uso de contraceptivos? <input type="checkbox"/> SIM. Quantas vezes/Intervalo/Nome _____ <input type="checkbox"/> NÃO Alteração comportamental após a observação do tumor? <input type="checkbox"/> Sim. Qual? _____ <input type="checkbox"/> NÃO

Achados clínicos: <input type="checkbox"/> sangramento vaginal/peniano <input type="checkbox"/> anorexia <input type="checkbox"/> apatia/ prostração <input type="checkbox"/> melena <input type="checkbox"/> vômito <input type="checkbox"/> diarreia <input type="checkbox"/> emagrecimento <input type="checkbox"/> hematociteza <input type="checkbox"/> hiporexia <input type="checkbox"/> PU/PD

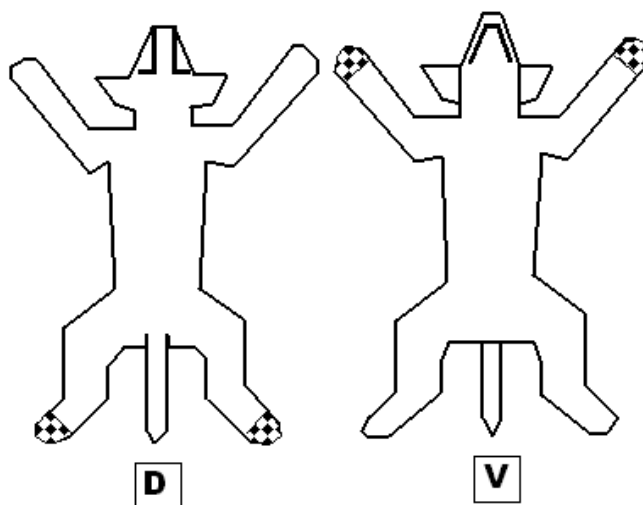
Exame Físico: T°: _____ FC: _____ bpm FR: _____ mpm TPC: _____ seg

Hidratação: normal desidratação leve desidratação moderada desidratação severa

Linfonodos: normais aumentados (quais) _____

Mucosas: normais hipocoradas pálidas ictéricas congestas cianóticas

Palpação abdominal: ndn alterada _____



Veterinário : _____ Data: ____ / ____ / ____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Eu, _____, autorizo a participação de meu(s) animal(is) nesta pesquisa, ciente que esta tem como finalidade o estudo aprofundado deste tumor (TVT) para contribuir com o conhecimento científico.

Tendo em vista os itens acima apresentados e o que foi me informado verbalmente, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar desta pesquisa.

Nome do proprietário (CPF/RG)

Assinatura do proprietário

APÊNDICE B – Resumo dos procedimentos realizados com as amostras biológicas colhidas no presente estudo.

Grupo experimental	Amostra biológica	Extração	Técnicas realizadas
Animais portadores de CTVT	Tumor	gDNA	- Rearranjo LINE-1/c-myc (qPCR) - Detecção gene CDKN2A (qPCR) - Amplificação DLADQA-1 (qPCR) - Sequenciamento genético loco DLADQA-1
		cDNA	- Expressão gênica DLADQA-1 (RT-qPCR)
		Tumor	- Exame citológico - Exame histopatológico - Exame imuno-histoquímico - <i>Western blotting</i>
	Sangue dos cães hospedeiro do CTVT	gDNA	- Rearranjo LINE-1/c-myc (qPCR) - Detecção gene CDKN2A (qPCR) - Sequenciamento genético loco DLADQA-1
	Soro dos cães hospedeiros do CTVT	Soro	- <i>Western blotting</i>
	Animais controle	Sangue dos cães controle	gDNA
Soro dos cães controle		Soro	- <i>Western blotting</i>

APÊNDICE C - Protocolos utilizados para a realização da técnica de qPCR

Tabela 1C. Reagentes utilizados para realização da técnica de qPCR para os genes LINE-1/c-myc e CDKN2A com amostras de gDNA, e também para DLADQA-1 exon 2 com amostras de gDNA e cDNA

Componente	Volume
SYBR Green Mix	10uL
Primers (5µM/primer)	2,4uL
DNA (20ng/uL)	0,5uL
Água destilada	7,1uL
Volume total	20uL

Tabela 2C. Condições de amplificação pela técnica de qPCR para os genes LINE-1/c-myc e CDKN2A com amostras de gDNA, e também para DLADQA-1 exon 2 com amostras de gDNA e cDNA

Estágio de amplificação	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	95	10 minutos
40 ciclos	95	15 segundos
	60	60 segundos
Curva de dissociação	60	15 segundos
	95	15 segundos

APÊNDICE D – Curvas padrões construídas com os valores controles obtidos pela técnica de qPCR

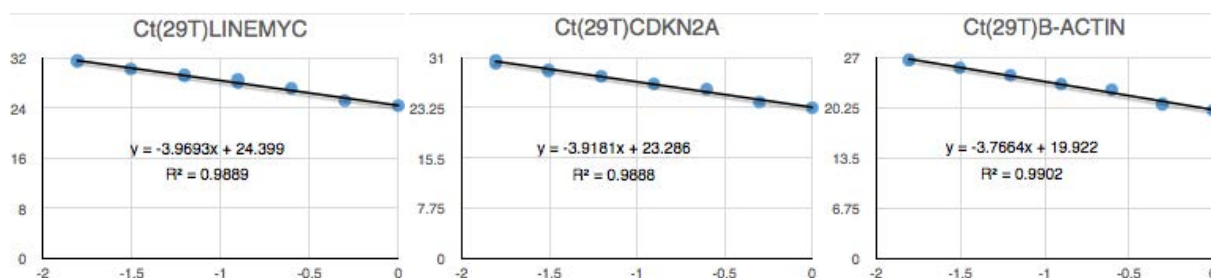


Figura 1D. Curva padrão de LINE-1/c-myc, CDKN2A e beta actina da técnica de qPCR. Os valores no eixo x são o log (concentração de gDNA) da amostra 29T, o qual foi utilizada para construção dessas curvas padrão. No eixo y apresentam-se os valores Cq a cada uma dessas concentrações de gDNA conhecidas.

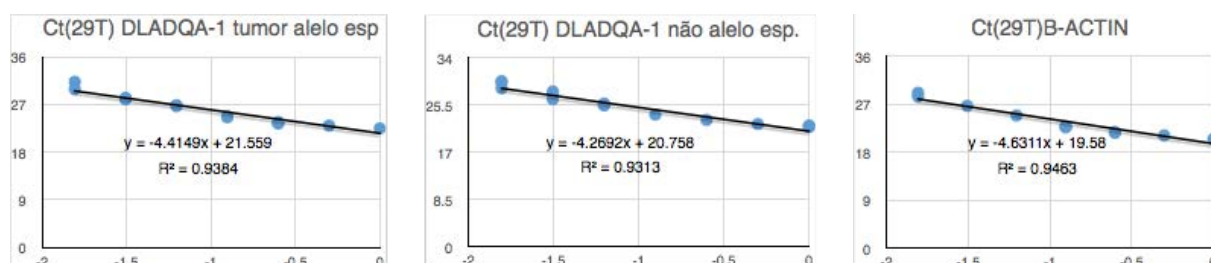


Figura 2D. Curva padrão de DLADQA-1 tumor alelo específico, DLADQA-1 não alelo específico e Beta Actina da técnica de qPCR. Os valores no eixo x são o log (concentração de gDNA) da amostra 29T, o qual foi utilizada para construção dessas curvas padrão. No eixo y apresentam-se os valores Cq a cada uma dessas concentrações de gDNA conhecidas.

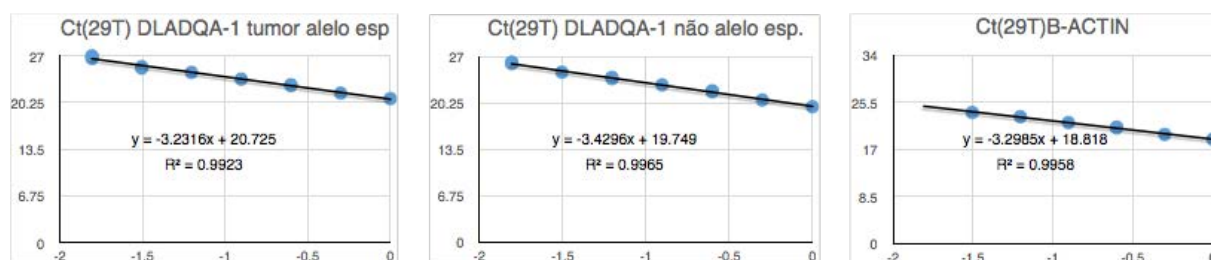


Figura 3D. Curva padrão de DLADQA-1 tumor alelo específico, DLADQA-1 não alelo específico e Beta Actina da técnica de RT-qPCR. Os valores no eixo x são o log (concentração de cDNA) da amostra 29T, o qual foi utilizada para construção dessas curvas padrão. No eixo y apresentam-se os valores Cq a cada uma dessas concentrações de cDNA conhecidas.

APÊNDICE E – Protocolos utilizados para a realização da técnica de cPCR

Tabela 1E. Reagentes utilizados para realização da técnica de cPCR para o gene DLADQA-1 com amostras de gDNA

Componente	Volume
10X Tampão	5 µL
10mM dNTPs	0,5 µL
Primer <i>Forward</i> 10µM	0,5 µL
Primer <i>Reverse</i> 10µM	0,5 µL
Amostra de DNA	5 µL
Taq DNA Polimerase*	0,125 µL
Água destilada	13,375 µL

* One taq DNA polymerase New England BioLabs.

Tabela 2E. Condições de amplificação pela técnica de cPCR para o gene DLADQA-1 com amostras de gDNA

Fase	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94°C	30 segundos
30 ciclos Desnaturação	94°C	30 segundos
Hibridização	60°C	30 segundos
Extensão	68°C	40 segundos
Extensão final	68°C	5 minutos

APÊNDICE F – Tampões utilizados na técnica de *Western blotting*

Tabela 1F. Tampão de corrida (MES 1x)

Componente	Volume
Tampão MES 10x*	200 mL
Água milli-Q	1800 mL
Volume total	2000 mL

*Tampão MES 10x: 97,6g MES; 60,6g Tris Base; 3g EDTA; 10g SDS; 1000 mL água milli-Q

Tabela 2F. Tampão de transferência

Componente	Volume
Glicina	14,4 g
Tris Base	3 g
Metanol	200 mL
Água milli-Q	800 mL
Volume total	1000 mL

Tabela 3F. Tampão PBS 1x

Componente	Volume
PBS	1 pastilha PBS**
Água destilada	1000 mL
Volume total	1000 mL

**Sigma (St Louis, Missouri, EUA)

Tabela 4F. Tampão PBS 10x

Componente	Volume
PBS	10 pastilhas PBS**
Água destilada	1000 mL
Volume total	1000 mL

**Sigma (St Louis, Missouri, EUA)

Tabela 5F. Tampão PBS tween

Componente	Volume
PBS 10x	200 mL
Água milli-Q	1800 mL
Tween 20	1 mL
Volume total	2000 mL

Tabela 6F. Tampão TBST

Componente	Volume
TBS 10x***	200 mL
Água milli-Q	1800 mL
Tween 20	1 mL
Volume total	2000 mL

*** Tampão TBS 10x: 62,5g Tris HCL; 12,4g Tris Base; 64,56g NaCl; 1000 mL água milli-Q

APÊNDICE G – Sequenciamento de proteínas obtido pela espectrometria de massa

Amostra 756TF			
Bandas	Descrição proteína	Número peptídeos	Sequenciamento proteína
45kDa	MHC class I DLA-88 OS=Canis familiaris PE=3 SV=1	46	MEVVMPRALLVLLSAALAVTLTRAGSHSLRYFYTSVSRPGR GDPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAATGRMEPRAPWMEQEG PEYWDRETRTVKETAQRYRVLDLTLRGYYNQSEAGSHTR QTMYGCDLGPGRLLRGYSQDAYDGADYIALNEDLRSWT AADTAAQITRRKWEAAGTAEHDRNYLETTCEVWLRRYLE MGKETLLRAEPPSTRVTRHPISDHEVTLRCWALGFYPAEIT LTWQRDGEDQTQDTEVVDTRPAGDGTFOKWAAVVPSG QEQRYTCHVQHEGLAEPVTRRWEPSPSTIVIVSIAALVLL VVGVI GAVIWRKQORSGGKPGYSHAARDDSAQGS DVS LTAPRV
	MHC class I DLA-12 OS=Canis familiaris PE=3 SV=1	40	MVPGTLALLSGALAVTLTRAGSHSLRYFYTSVSRPGRGDP RFIAVGYVDDTQFVRFSDAATGRMEPRAPWVEQEGPEY WDPQTRTIKETARTFRVDLTLRGYYNQSEAGSHTFQWM FGCDLGPGRLLRGYSQDAYDGADYIALNEDLRSWTAAD AAAQITRRKREAAGDAGHLRNYLETTCEVWLRRYLEMGKE TLLRAEPPSTRVTRHPVSDHEVTLRCWALGFYPAEITLTWQ RDGEDQTQDTEVVDTRPAGDGTFOKWAAVVPSGQEQR YTCHVQHEGLVEPVTRRWEPSPSTIVIVSIAALVLLVAG VIGAVIWRKQORSGGKPGYSHAARDDSAQGS DVS LTAPRV
	DLA class I histocompa tibility antigen, A9/A9 alpha chain OS=Canis familiaris PE=2 SV=1	32	MEVVMPRALLVLLSAALALTPTRAGSHSLRYFYTSVSRPGA GDPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAATGRMEPRAPWVEQEG PEYWDROTRTIKETARTFRVDLTLRGYYNQSEAGSHTRQ TMYGCDLGPDRLLRGYSQDAYDGADYIALNEDLRSWTA ADTAAQITQRKWEAAGVAELQWRNYLETTCEVWLRRYLE MGKETLLRADPPSTRVTHHPVSDHEVTLRCWALGFYPAEI TLTWQRDGEDQTQDTEVVDTRPAGDGTFOKWAAVVPS GQEQRYTCHVQHEGLPEPITRRWEPSPSTIVIVSIAALVLL VVAGVI GAVIWRKQORSGGKPGYSHAARDDSAQGS DVS LTAPRV
	MHC class II DR beta 1 OS=Canis familiaris GN=DLA- DRB1 PE=4 SV=1	6	MVCLCFLGGSWMTALMLILMVLNPPAWARDTPPHFLEMV KFECHFTNGTERVRYLARDIYNREEILRFSDVGEYRAVTE LGRPIAESWNROKEILEORRAAVDTYCRHNYGVIESFAVQ RRVEPTVTVYPTKTQTLQHHNLLVCSVNGFYPGHIEVRWL RNGQEEEAGVVSTGLIRNGDWTFOILVMLEIVPOSGEVYT CQVEHPSLTSPVTVEWRAQSDSAQSKMLSGIGGFVLGLLF LAVGLFIYFRNQKGHSGLOPTGLLS
	MHC class II antigen DR alpha OS=Canis familiaris GN=DLA- DRA1 PE=3 SV=1	3	MTISGVPVLGFFIMAFMGPQESWAVKEEHVIIQAEFYLT DPSGFMFDFDGDIEIFHVDMEKKETVWRLEEFGRFASFEA QGALANIAVDKANLDTMIKRSNHTPNTNEVTVLSNTPVEL GEPNIIICFIDKFSPVINVTWLRNGNPVTTGVSETIFLPRE DHLFRKFHYLPFLPSAEDVYDCKVEHWGLDEPLKHWFEF PPTPLPETTENVVCALGLIVGLVGIITGTIFIKGMRKVKAGE RRGPL
39kDa	MHC class I DLA-88 OS=Canis familiaris	12	MEVVMPRALLVLLSAALAVTLTRAGSHSLRYFYTSVSRPGR GDPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAATGRMEPRAPWMEQEG PEYWDRETRTVKETAQRYRVLDLTLRGYYNQSEAGSHTR QTMYGCDLGPGRLLRGYSQDAYDGADYIALNEDLRSWT

	PE=3 SV=1		AADTAAQITRRKWEAAGTAEHDRNYLETTTCVEWLRRYLE MGKETLLRAEPPSTRVTRHPISDHEVTLRCWALGFYPAEIT LTWQRDGEDQTQDTEVVDTRPAGDGTFOKWA AVVPSG QEQRYTCHVQHEGLAEPVTRRWEPSPLSTIVIVSIAALVLL VVSGVIGAVIWRKQORSGGKPGYSHAARDDSAQGS DVS LTAPRV
	MHC class II antigen DR alpha OS=Canis familiaris GN=DLA-DRA1 PE=3 SV=1	7	MTISGVPVLGFFIMAFLMGPOESWAVKEEHVIIQAEFYLT DPSGEFMDFDFGDEIFHVDMEKKETVWRLEEFGRFASFEA QGALANIAVDKANLDTMIKRSNHTPNTNEVTVLSNTPVEL GEPNIIICFIDKFSPVINVTWLRNGNPVTTGVSETIFLPRE DHLFRKFHYLPFLPSAEDVYDCKVEHWGLDEPLLKHWEFE PPTPLPETTENVCALGLIVGLVGIITGTIFI IKGMRKVKAGE RRGPL
	MHC class II DR beta 1 OS=Canis familiaris GN=DLA-DRB1 PE=4 SV=1	4	MVCLCFLGGSWMTALMLILMVLNPP LAWARTPPHFLEMV KFECHFTNGTERVRYLARDIYNREEILRFDS DVG EYRAVTE LGRPIAESWNROQKEILEORRAAVDTYCRHNYGVIESFAVO RRVEPTVTVYPTKTOTLQHHNLLVCSVNGFYPGHIEVRWL RNGQEEEEAGVVSTGLIRNGDWTFOILVMLEIVPOSGEVYT CQVEHPSLTSPVTVEWRAQSDSAQSKMLSGIGGFVLG LLL LAVGLFIYFRNQKGHSGLOPTGLLS

Amostra 768TF			
Bandas	Descrição proteína	Número peptídeos	Sequenciamento proteína
45kDa	MHC class I DLA-88 OS=Canis familiaris PE=3 SV=1	52	MEVVMPRALLVLLSAALAVTLTRAGSHSLRYFYTSVSRPGR GDPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAATGRMEPRAPWMEQEG PEYWDRETRTVKETAQORYRVDLDTLRGYNOSEAGSHTR QTMYGCDLPGGRLLRGYSODAYDGADYIALNEDLRSWT AADTAAQITRRKWEAAGTAEHDRNYLETTTCVEWLRRYLE MGKETLLRAEPPSTRVTRHPISDHEVTLRCWALGFYPAEIT LTWQRDGEDQTQDTEVVDTRPAGDGTFOKWA AVVPSG QEQRYTCHVQHEGLAEPVTRRWEPSPLSTIVIVSIAALVLL VVSGVIGAVIWRKQORSGGKPGYSHAARDDSAQGS DVS LTAPRV
	DLA class I histocompatibility antigen, A9/A9 alpha chain OS=Canis familiaris PE=2 SV=1	32	MEVVMPRALLVLLSAALALTPTRAGSHSLRYFYTSVSRPGA GDPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAATGRMEPRAPWVEQEG PEYWDROTRTIKETARTFRVDLDTLRGYNOSEAGSHTRQ TMYGCDLPGDGRLLRGYSODAYDGADYIALNEDLRSWTA ADTAAQITQRKWEAAGVAELQWRNYLETTTCVEWLRRYLE MGKETLLRADPPSTRVTHHPVSDHEVTLRCWALGFYPAEI TLTWQRDGEDQTQDTEVVDTRPAGDGTFOKWA AVVPS GQEQRYTCHVQHEGLPEPITRRWEPSPLSTIVIVSIAALVLL VVAGVIGAVIWRKQORSGGKPGYSHAARDDSAQGS DVS LTAPRV
	DLA-12 OS=Canis familiaris PE=3 SV=1	34	MEVVMPRALLVLLSAALAVTLTWAGSHSLRYFYTSVSRPG RGDPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAATGRMEPRAPWVEQE GPEYWDPOTRTIKETAQORYRVSLDTLRGYNOSEAGSHTR QTMYGCDLPGGRLLRGYROEAYDGADYIALNEDLRSWT AADAAAQITRRKWEAAGTAEHEKNYLEMTCVEWLRRYLE MGKETLLRAEPPSTRVTRHPFSDREVT LRCWALGFYPAEIT LTWQRDGEDQTQDTEVVDTRPAGDGTFOKWA AVVPSG

			QEQRYTCHVQHEGLAEPVTRRWEPSPSTIVIVSIAALVLL VVAGVIGAVIWRKQSRGGKPGYSHAARDDSAQGS DVS LTAPRV
39kDa	MHC class I DLA-88 OS=Canis familiaris PE=3 SV=1	17	MEVVMPRALLVLLSAALAVTLTRAGSHSLRYFYTSVSRPGR GDPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAATGRMEPRAPWMEQEG PEYWDRETRTVKETAQORYRVDLDTLRGYNOSEAGSHTR QTMYGCDLPGGRLLRGYSODAYDGADYIALNEDLR SWT AADTAAQITRRKWEAAGTAEHDRNYLETTCEVWLRRYLE MGKETLLRAEPPSTRVTRHPISDHEVTLRCWALGFYPAEIT LTWQRDGEDQTDTEVVDTRPAGDGTFOKWA AVVPSG QEQRYTCHVQHEGLAEPVTRRWEPSPSTIVIVSIAALVLL VVGAVIGAVIWRKQSRGGKPGYSHAARDDSAQGS DVS LTAPRV
	MHC class II antigen DR alpha OS=Canis familiaris GN=DLA- DRA1 PE=3 SV=1	3	MTISGVPVLGFFIMAFMGPOESWAVKEEHVIIQAEFYLT DPSGEFMDFDGDGEIFHVDMEKKETVWRLEEFGRFASFEA Q GALANIAVDKANLDTMIKRSNHTPNTNEVTLSNTPVEL GEPNIIICFIDKFSPPVINVTWLRNGNPVTTGVSETIFLPRE DHLFRKFHYLPFLPSAEDVYDCKVEHWGLDEPLLKHWEFE PPTPLPETTENVV CALGLIVGLVGIIITGTIFI IKGMRKVKAGE RRGPL
	MHC class II DR beta 1 OS=Canis familiaris GN=DLA- DRB1 PE=4 SV=1	4	MVCLCFLGGSWMTALMLILMVLNPP LAWARTPPHFLEMV KFECHFTNGTERVRYLARDIYNREEILRFSDVGEYRAVTE LGRPIAESWNROKEILEORRAAVDTYCRHNYGVIESFAVO RRVEPTVTVYPTKTOTLQHHNLLVCSVNGFYPGHIEVRWL RNGQEEEAGVVSTGLIRNGDWTFOILVMLEIVPOSGEVYT CQVEHPSLTSPVTVEWRAQSDSAQSKMLSGIGGFVLGLLF LAVGLFIYFRNQKGHSGLOPTGLLS
	MHC class II DLA DQalpha chain OS=Canis familiaris GN=DLA DQA PE=2 SV=1	3	MILNRVLILGTLILTMMSPSGGEEIVADHVANYGINVYQS YGPSTGQYTHEFDGDEEFYVDLEKKETVWRLPVFSTFRSFD PQALRNLAIIKQNLNIMTKRSNQTAATNEVPEVTVFSKSP VMLGQPNTLICLVDNIFPPVINVTWLNKRSVTEGVSETSF FAKGDHSFSKISYLTFLPSAEDIYDCKVEHWGLDEPLLKH WEPEVPTPMSLETETVVCALGLAVGLVGMGTVFIIQGLR SGGTSRHQGPL