

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Vanessa Bridi Centenaro

**MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO E3 EM FELINOS FELV POSITIVOS COM
NEOPLASIAS HEMATOPOIÉTICAS**

Santa Maria, RS

2017

Vanessa Bridi Centenaro

**MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO E3 EM FELINOS FELV POSITIVOS COM
NEOPLASIAS HEMATOPOIÉTICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Krause

Santa Maria, RS

2017


Vanessa Bridi Centenaro

**MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO E3 EM FELINOS FELV POSITIVOS COM
NEOPLASIAS HEMATOPOIÉTICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 06 de setembro de 2017:


Alexandre Krause, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Natielen Jacques Schuch, Dra. (UNIFRA)


Maurício Beux dos Santos, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar meu caminho, aliviar minhas preocupações e a vencer cada obstáculo dessa caminhada. Obrigada!

Aos meus queridos pais Luiz e Neusa que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, me incentivando sempre para que eu trilhasse esse caminho sem medo e por renunciarem seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Obrigada!

Aos meus queridos irmãos, Eduardo e Bianca, pela cumplicidade e torcida. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada!

A minha querida avó Elsa, agradeço sua ternura e compreensão, seus ensinamentos e pelo seu exemplo de vida. Obrigada!

Ao meu noivo Leonardo, pelo amor, por estar ao meu lado me incentivando e me apoiando. Obrigada!

A minha eterna amiga Lara, que se fez presente em todas as etapas importantes da minha vida acadêmica e pessoal, obrigada pela energia e otimismo que nunca me deixaram desanimar. Obrigada!

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Krause, pela oportunidade de realizar este sonho, com carinho que te agradeço pelos ensinamentos, pela dedicação, pela confiança e pelos conhecimentos. Obrigada!

A secretária Maria, pelas orientações e pela cumplicidade. Obrigada!

A todos os profissionais do Laboratório de Citogenética e a Dr^a Virgínia Maria Cóser, agradeço pela acolhida, ensinamentos passados durante este período. Obrigada!

Por fim, a todos os animais que eu tive a oportunidade de conviver ao longo de minha vida, pois sem os quais todo esse trabalho não seria realizado, e por serem o motivo de todo o meu esforço e dedicação.

RESUMO

MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO E3 EM FELINOS FELV POSITIVOS COM NEOPLASIAS HEMATOPOIÉTICAS

AUTOR: Vanessa Bridi Centenaro
ORIENTADOR: Alexandre Krause

Os tumores hematopoiéticos são os distúrbios neoplásicos mais comuns em felinos. Muitos desses tumores estão associados à infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV) e um dos mecanismos descritos é pela integração de material viral no genoma felino, que pode levar à instabilidade genômica e consequente alteração de genes relacionados com o controle da proliferação e morte celular. Quando fragmentos maiores de DNA são afetados, tais alterações podem ser observadas pela análise citogenética. O presente estudo objetivou observar as alterações citogenéticas em felinos com neoplasias hematopoiéticas. O estudo foi realizado em oito felinos, sete destes com diagnóstico de leucemia ou linfoma. O controle foi constituído por um felino saudável FeLV negativo com cariótipo normal. Foram analisadas no mínimo 10 metáfases de cada animal. Adicionalmente, destes dois pacientes foram analisados 1.000 linfócitos e classificados citologicamente pelo seu estado de viabilidade (necrose, apoptose), seu estado mitótico (mononucleado, binucleado (BN), multinucleado, mitótico) e seu dano cromossômico ou estado de instabilidade (presença de micronúcleo (MN) em célula mononucleada, binucleada, bem como brotos nucleares (NBUD). Os resultados dessa observação foram analisados estatisticamente pelo teste pareado de Wilcoxon. Nesta análise cromossômica dois destes animais apresentaram monossomia do cromossomo E3, um com diagnóstico de leucemia mieloide aguda do subtipo FAB M6a (LMA-M6a) e outro com linfoma multicêntrico (LM). Houve diferença significativa nas contagens de LMA-M6a (N=7; Z=2,36; p=0,01) e de LM (N=8; Z=2,52; p=0,01) quando comparados com o grupo controle. No entanto, não houve diferença entre LMA e linfoma (N=8; Z=0,07; p=0,94). No cromossomo E3 são descritos 1401 genes, sendo vários relacionados com controle de ciclo celular, (*Plk1*, *Sun*, *Mad111*, *Mcm7*), reparo de DNA (*Pms2*, *Usp42*) e supressão tumoral (*Bcl7b*). A perda de fragmentos de DNA, como o cromossomo E3 nos dois pacientes descritos, que leva a haploinsuficiência de genes importantes para o ciclo celular, poderia ser a causa de instabilidade genômica e, consequentemente suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer. A observação de alterações citogenéticas, dessa forma, possibilita o melhor entendimento do câncer na espécie felina e serve como subsídio para a pesquisa translacional.

Palavras-chave: Cromossomo felino E3, instabilidade genômica, reparo de DNA, FeLV, genes supressores tumorais

ABSTRACT

E3 CHROMOSOME MONOSOMY IN FeLV POSITIVE FELINES WITH HEMATOPOIETIC NEOPLASMS

AUTHOR: Vanessa Bridi Centenaro

ADVISOR: Alexandre Krause

Hematopoietic tumors are the most common neoplastic disorders in felines. Many of these tumors are associated with infection by feline leukemia virus (FeLV) and one of the described mechanisms is the integration of viral material into the feline genome, which can lead to genomic instability and consequent alteration of genes related to proliferation control and cell death. When larger DNA fragments are affected, such changes can be observed by cytogenetic analysis. The present study aimed to observe cytogenetic changes in felines with hematopoietic neoplasms. The study was performed in eight felines, seven of them with a diagnosis of leukemia or lymphoma. The control consisted of a healthy feline FeLV negative with normal karyotype. At least 10 metaphases of each animal were analyzed. Additionally, 1000 lymphocytes of these two patients, were analyzed and classified cytologically by their viability (necrosis, apoptosis), mitotic state (mononuclear, binucleate (BN), mitotic multinucleate) and their chromosomal damage or instability state (presence of micronucleus (MN) in mononuclear, binucleate, as well as nuclear buds (NBUD)). The results of this observation were statistically analyzed by the Wilcoxon paired test. In this chromosomal analysis two of these animals presented monosomy of the E3 chromosome, one with diagnosis of acute myeloid leukemia of the M6a (LMA-M6a) FAB subtype and another with multicenter lymphoma (LM). There were significant differences in LMA-M6a scores ($N = 7$, $Z = 2.36$, $p = 0.01$) and LM scores ($N = 8$, $Z = 2.52$, $p = 0.01$) when group control. However, there was no difference between AML and lymphoma ($N = 8$, $Z = 0.07$, $p = 0.94$). The E3 chromosome has 1401 genes, several related to cell cycle control (*Plk1*, *Sun*, *Mad111*, *Mcm7*), DNA repair (*Pms2*, *Usp42*), tumor suppression (*Bcl7b*). The loss of DNA fragments, such as the loss of the E3 chromosome in the two patients described, led to the haploinsufficiency of important genes for the cell cycle, and this could be a cause of genomic instability and consequently susceptibility to the development of cancer. The observation of cytogenetic alterations, in this way, allows a better understanding of the cancer in the feline species and translational research.

Key-words: Feline chromosome E3, genomic instability, DNA repair, FeLV, tumor suppressor genes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotomicrografia de metáfase representativa, aumento de 1000x, com bandeamento G. Em A) cariótipo: 38, XY, normal, B) representativo da monossomia e deleção do braço curto do cromossomo E3 de um felino com diagnóstico de LMA-M6a e em C) paciente com linfoma multicêntrico apresentando monossomia do E3.....28
- Figura 2 - Fotomicrografias das células obtidas no cultivo celular RPMI 1640 com SBF. Aumento de 1000 vezes. Em (A) célula mononucleada; (B) célula BN; (C) célula multinucleada; (D) célula mononucleada contendo um MN; (E) célula BN contendo um MN; (F) célula apresentando brotamento nuclear, NBUD; (G) célula necrótica; (H) célula apoptótica; (I) célula mitótica.....29

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 Resultados da análise cromossômica relacionados a felinos com neoplasias hematopoiéticas.....30
- Quadro 2 - Descrição das características morfológicas nucleares, ploidia e estado mitótico e de sobrevivência de células de felinos com leucemia mieloide aguda M6a, linfoma multicêntrico e de um animal controle.....31

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	10
1.1 INTRODUÇÃO	11
1.1.1 LINFOMA	11
1.1.2 LEUCEMIA	13
1.1.3 FeLV	13
1.1.4 GENÉTICA E CÂNCER.....	15
1.1.5 CITOGENÉTICA.....	16
2 CAPÍTULO I.....	19
MANUSCRITO	19
ABSTRACT.....	19
RESUMO	20
INTRODUÇÃO	20
MATERIAIS E MÉTODOS	21
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO.....	23
CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS.....	25
3 CONCLUSÃO.....	33
4 REFERÊNCIAS	34

1 APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados sob a forma de manuscrito científico e se encontram no item “Manuscrito”. As seções “Material e Métodos”, “Resultados”, “Discussão” e “Referências” estão contidas no próprio manuscrito que representa este estudo na íntegra. O item “Conclusões”, ao final desta dissertação, refere-se a interpretações gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

Artigo submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira – 2017.

1.1 INTRODUÇÃO

Os tumores hematopoiéticos são os distúrbios neoplásicos mais comuns em felinos domésticos, sendo 90% representados por linfomas (HARDY et al., 1976; WILSON, 2008; HANEY et al., 2009). Esta neoplasia representa cerca de 40% de todos os cânceres em felinos (MICHEL & SORENMO, 2008). Em levantamento realizado com a casuística do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, de 1964 a 2013, a partir da avaliação de 1247 necropsias de felinos, os tumores a terceira maior causa de morte ou levaram à eutanásia (TOGNI et al., 2016).

Os vírus envolvidos em tumores de ocorrência natural em seres humanos e animais podem ser amplamente divididos em vírus de DNA, incluindo herpesvírus, papilomavírus e ortohepnavírus, e vírus de RNA, os retrovírus (BOUVARD et al., 2009). Os vírus causadores de câncer em felinos descritos pertencem às famílias de retrovírus e papilomavírus (MUNDAY et al., 2013). Estima-se que 20% das neoplasias em humanos sejam causadas por agentes infecciosos, sendo que mais da metade destas resultam de infecções virais (PARKIN, 2006).

O diagnóstico de uma doença proliferativa pode ser um desafio. Em alguns casos, a linha divisória entre proliferação reativa e maligna não pode ser determinada usando procedimentos-padrão, como técnicas de exame histomorfológico ou citomorfológico. A discriminação pode ser conseguida demonstrando características que sejam partilhadas por todas as células tumorais, mas não por células não neoplásicas morfológicamente semelhantes. A base de tais características é apresentada na teoria da mutação somática da carcinogênese (KNUDSON, 1985). Uma premissa desta teoria é que o câncer é derivado de uma única célula somática que acumulou múltiplas mutações de DNA. Seguindo esta ideia, a clonalidade é uma característica básica de malignidades, incluindo linfomas e leucemias. Portanto, demonstrar a natureza clonal de uma população celular pode ajudar a diagnosticar um linfoma, como o de Burkitt, onde as células tumorais possuem a translocação t(8;14), por exemplo (HALUSKA et al., 1987).

1.1.1 LINFOMA

Dentre os tumores hematopoiéticos, o linfoma é o mais comumente diagnosticado em felinos. Este neoplasma apresenta-se com diferentes formas anatômicas, sendo o trato gastrointestinal o local primário mais frequente (GIEGER, 2011). Curiosamente, a incidência

de linfoma felino coincide com a do vírus da leucemia felina (FeLV) (LOUWERENS et al., 2005) e a infecção por FeLV foi indicada como a causa mais comum de neoplasias hematopoiéticas entre as décadas de 1960 e 1980, quando 60% a 70% dos casos de linfoma eram associados a gatos virêmicos (VAIL, 2007).

O linfoma mediastínico pode envolver o timo e os linfonodos mediastínicos e esternais. Em gatos com patologia tímica, 63% apresentam linfoma. Adicionalmente, em 17% dos gatos com efusão pleural o linfoma tímico é a causa determinante. Os linfomas mediastínicos são preferencialmente de células T e acometem gatos jovens (idade média inferior a cinco anos), FeLV-positivos, sendo a incidência maior em gatos siameses/orientais (LOUWERENS et al., 2005).

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um gama-retrovírus do tipo C transmitido horizontalmente entre as populações de gatos domésticos (HARDY et al., 1973). Em geral, o genoma viral do FeLV não contém um oncogene, mas o vírus pode ativar proto-oncogenes celulares (NEIL et al., 1991). A integração proviral de FeLV nos locus de proto-oncogenes e regiões comuns de integração está estreitamente associada com o desenvolvimento de linfoma nas infecções naturais e experimentais (TSATSANIS et al., 1994 e MIURA et al., 1987). A inativação de genes supressores de tumores também pode ter algum papel na indução de tumores em animais FeLV positivos (OKUDA et al., 1994). É concebível que os linfomas felinos possam desenvolver-se através da tumorigênese em múltiplos estágios, como mostrado nos carcinomas de cólon humano (FEARON & VOGELSTEIN, 1990).

Anormalidades cromossômicas, como translocações e inversões, são frequentemente encontradas em neoplasmas humanos. Essas alterações forneceram subsídios importantes para entender os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do linfoma (BISHOP, 1987). Em vários tipos de linfomas e leucemias humanos, foram encontradas translocações cromossômicas específicas. Os pontos de quebra dessas translocações podem levar à ativação de oncogenes como *myc* no linfoma de Burkitt (DALLA-FAVERA et al., 1982) , *bcl-2* no linfoma de células B (TSUJIMOTO et al., 1984) e *abl* na leucemia mieloide crônica (KLEIN et al., 1982).

Estudos moleculares e citogenéticos sugerem que as translocações cromossômicas frequentemente contribuem para a tumorigênese ativando oncogenes celulares que se encontram adjacentes a pontos de quebra cromossômicos (KLEIN, 1981 e YUNIS, 1983). A análise das anormalidades cromossômicas em tumores é uma das abordagens mais úteis para desvendar o mecanismo de carcinogênese pela detecção de um oncogene na proximidade de

pontos de quebra em translocações. Anormalidades cromossômicas têm sido relatadas em linfomas e leucemias de felinos (RIPPS & HURVITZ, 1971; GOH et al., 1981; GRINDEM & BUOEN, 1989; GULINO, 1992). Nesses estudos, foram descritas anormalidades numéricas, minicromossomos duplos e alguns cromossomos marcadores alongados ou encurtados. Contudo, não foram reportadas translocações recíprocas de cromossomos específicos.

1.1.2 LEUCEMIA

As leucemias são neoplasias malignas que se originam nas células precursoras hematopoiéticas da medula óssea e são classificadas de acordo com a linhagem celular em duas amplas categorias: linfoide e mieloide (COUTO, 2006). Essas células perdem a capacidade de diferenciação e se auto-replicam originando clones de células geralmente imaturas e afuncionais. Em felinos, as leucemias são mais comuns em relação às demais espécies domésticas e são aproximadamente 70 vezes mais frequentes em animais positivos para os vírus da leucemia felina (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV). As leucemias linfoides são descritas como as mais frequentes na espécie felina e, dentre as leucemias mieloides, a leucemia mielomonocítica é a mais diagnosticada (RITT, 2010).

As duas principais formas clínicas de leucemias linfoides conhecidas em cães e gatos são a leucemia linfoide (linfoblástica) aguda (LLA) e a leucemia linfoide (linfocítica) crônica (LLC) (WALKER, 2009 e SANTANA, 2009). A LLC é geralmente menos frequentemente diagnosticada que a LLA e é definida como a proliferação anormal de linfócitos morfolologicamente maduros na medula óssea ou no sangue periférico (VAIL, 2008).

1.1.3 FeLV

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um vírus de distribuição mundial que pertence ao gênero *Gammaretrovirus*, família *Retroviridae* e está associado à síndrome de imunossupressão, leucemia, linfossarcoma e doenças mieloproliferativas em gatos domésticos (PONTIER et al., 1998; COSTA et al., 2000). O FeLV infecta gatos domésticos e outros felinos em todo o mundo (HOOVER & MULLINS, 1991). O vírus é transmitido verticalmente e horizontalmente. Nas famílias infectadas, existe uma rápida disseminação oronasal por contato com secreções contendo vírus, principalmente saliva (HARDY et al., 1976).

O FeLV está associado a neoplasias malignas hematopoiéticas e linfoides em gatos e a mutagênese de inserção adquirida é o provável mecanismo patogênico subjacente às malignidades induzidas (FUJINO et al., 2008). A identificação das inserções de provírus clonais de retrovírus oncogênicos levou à descoberta de muitos genes associados a tumores (JONKERS & BERNIS, 1996; LI et al., 1999). Estudos anteriores sobre tumores associados ao FeLV sugeriram que os provírus integrados induzem a ativação de genes relacionados ao crescimento celular levando a oncogênese (NEIL et al., 1984; FORREST et al., 1987; MIURA et al., 1987, 1989; LEVESQUE et al., 1990, 1991; LEVY et al., 1993; TSUJIMOTO et al., 1993; TSATSANIS et al., 1994; FUJINO et al., 2009). Essa mutagênese de inserção pode contribuir para a geração de um clone celular com vantagem de crescimento e um eventual fenótipo maligno.

Quando a ideia de câncer induzido por vírus (oncovírus) começava a ser estabelecida, a observação clínica da maior ocorrência de câncer em residências com muitos gatos alimentou a pesquisa desta etiologia na espécie felina (SCHNEIDE et al., 1967). Durante muito tempo, considerou-se que o FeLV era responsável pela maioria das mortes relacionadas à doença tumoral e era responsável por mais síndromes clínicas do que qualquer outro agente único em gatos (HARTMANN, 2012).

A partir da introdução de vacinas para FeLV houve redução significativa de animais infectados e, por esse motivo, dados atuais correlacionando FeLV e tumores hematopoiéticos não estão disponíveis (VAIL, 2013). Entretanto, uma vez que a realidade nacional é divergente, a significativa prevalência de tumores hematopoiéticos observada na rotina do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, por Togni e colaboradores em 2016, pode estar associada à alta infecção dos gatos pelo FeLV, visto que até 70% desses tumores podem estar associados à infecção (FIGHERA & GRAÇA 2011). A integração clonal de provírus de FeLV foi identificada no genoma de células tumorais (NEIL et al., 1991).

Alguns tumores hematopoiéticos são negativos para o antígeno de FeLV e não demonstram integração proviral, o que comprova a existência de tumores hematopoiéticos que ocorrem por outros mecanismos além dos associados com o FeLV (HARDY et al., 1976). Weeden et al. (2016) relataram um caso de alteração mielodisplásica/mieloproliferativa em um gato negativo para o vírus da leucemia felina. Como aumenta o risco de linfoma em 60 vezes, o FeLV é, de longe, o mais importante oncovírus felino conhecido (SHELTON et al., 1990; REZANKA et al., 1992).

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) pode aumentar a incidência de linfoma felino. Contrariamente ao papel direto na gênese tumoral do FeLV, o FIV desempenha um papel indireto, causando imunossupressão do organismo (VAIL, 2007; COUTO, 2009). Os linfomas associados ao FIV têm maior probabilidade de serem de células B enquanto os linfomas associados ao FeLV são predominantemente de células T (VAIL, 2007). Os fatores genéticos e moleculares envolvidos no desenvolvimento de linfoma felino incluem a alteração da expressão de genes supressores tumorais, relacionados com a proliferação celular e também apoptose. Embora raras em gatos, as mutações em *N-ras* foram documentadas (MAYR et al., 2002). Foi também descrita a atividade da telomerase em amostras de linfoma felino (BILLES et al., 1998 apud VAIL, 2007).

Segundo Hartmann (2012) o vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um lentivírus que compartilha várias características com outros lentivírus, como o da imunodeficiência humana (HIV). O mesmo autor cita que a infecção pelo FIV pode levar a imunodeficiência e também afetar a função celular, dependendo do local de integração viral no DNA do hospedeiro. Shelton et al. (1990) mostraram que o risco relativo de desenvolver leucemia / linfoma era 5,6 vezes maior em gatos infectados com FIV do que em gatos não infectados. Além disso, o desenvolvimento de doenças mieloproliferativas também foi relatado em gatos infectados apenas com FIV (YAMAMOTO et al., 1988, HUTSON et al., 1991).

1.1.4 GENÉTICA E CÂNCER

O câncer é definido como uma doença genômica e surge como consequência de alterações cumulativas no material genético (DNA) de células normais, as quais sofrem transformações até se tornarem malignas (JORDE, 2000). A carcinogênese resulta de uma série de eventos e pode envolver dezenas, até centenas, de genes, por meio de alterações quantitativas e qualitativas do DNA (duplicações, deleções, quebras e perdas cromossômicas, translocações, mutações gênicas, e amplificações gênicas) ou relacionadas com a expressão gênica (mecanismos epigenéticos). Os principais grupos de genes envolvidos nesse processo são proto-oncogenes, genes supressores tumorais e genes relacionados ao reparo do DNA (ROCHA & SILVA, 2003). A importância dessas alterações genéticas é tal que, desde 2001, a Organização Mundial da Saúde considera além dos achados morfológicos, imunofenotípicos, biológicos e clínicos as características genéticas para determinar o diagnóstico, tratamento e prognóstico de uma doença neoplásica específica (JAFFE et al., 2001).

O câncer se desenvolve quando os processos normais que controlam o crescimento e proliferação celular são interrompidos. Há muitas condições nas quais o delicado equilíbrio entre a iniciação e redução do ciclo celular pode ser subvertido e alguns vírus contribuem para a transformação celular através de diversos mecanismos. A maioria envolve os produtos de genes virais.

1.1.5 CITOGENÉTICA

A citogenética é a área da genética e da biologia celular que engloba todo e qualquer estudo relacionado com os cromossomos, isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução. A citogenética clássica desenvolveu-se principalmente a partir do início do século 20 e seu crescente progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia (BOAS, 2009).

Taxonomicamente, a família Felidae consiste de três subfamílias: Acinonychinae, Felinae e Pantherinae, divididas em 14 gêneros e 38 espécies, esta família é relativamente uniforme morfologicamente (JOHNSON et al., 1999 e WOZENCRAFT, 2005). O cariótipo do gato doméstico (*Felis catus*) tem sido de grande importância em medicina veterinária, especialmente na descoberta e estudo de algumas anomalias congênitas que envolvem alterações cromossômicas (HSU & REARDEN, 1965 e MAYR et al., 1998) e outras onde estão envolvidas particularidades estruturais. Além disso, ele é considerado o estudo de modelo de cromossomos e caracterização para toda a família Felidae (SCHMIDT-KÜNTZEL et al., 2009).

O cariótipo felino foi descrito em 1965, sendo 38 o número diploide normal de cromossomos em gatos domésticos. O cariótipo é composto de 18 pares autossômicos agrupados de A a F, de acordo com o tamanho e a localização do centrômero, e os cromossomos são classificados sequencialmente e numerados a partir do 1. O grupo A contém três pares de submetacêntricos grandes; o grupo B, quatro pares submetacêntricos grandes; o grupo C, dois pares metacêntricos grandes; o grupo D, quatro pares submetacêntricos de pequenos a médios; o grupo E, três pares metacêntricos de pequenos a médios; e o grupo F, dois pares acrocêntricos pequenos. O cromossomo X é submetacêntrico e apresenta tamanho médio e o Y é submetacêntrico. Alterações no caritótipo felino são descritas em tumores mamários (MAYR & ORTNER, 1995), células de linhagem de fibrossarcoma felino (ERICHSEN et al., 2012) e linfomas de células T (YANG et al., 1995).

Os MN originam-se de fragmentos cromossômicos (formados a partir de quebras no DNA) ou cromossomos inteiros (não disjunção de cromossomos) que ficam atrás na anáfase durante a divisão nuclear (HEDDLE, 1973 e FENECH, 1986). O ensaio de micronúcleo em blocos de citocinese (CBMN) é o método preferido para a formação de MNi em células humanas e / ou de mamíferos cultivadas, porque o escore é especificamente restringido a células BN, uma vez divididas, que são as células que podem expressar MNi. Devido à sua confiabilidade e boa reprodutibilidade, o ensaio CBMN tornou-se um dos testes citogenéticos-padrão para testes de toxicologia genética em células humanas e de mamíferos. (FENECH, 1986 e FENECH, 2000).

Ao longo dos últimos 17 anos, o ensaio de micronúcleo em blocos de citocinese (CBMN) evoluiu para um método abrangente para medir a ruptura dos cromossomos, falhas no reparo do DNA, perda de cromossomos, falhas na separação das cromátides, necrose, apoptose e citostase. O conceito de "citoma" implica que cada célula no sistema estudado é pontuada citologicamente pelo seu estado de viabilidade (necrose, apoptose), seu estado mitótico (mononucleado, binucleado, multinucleado) e seu dano cromossômico ou estado de instabilidade (presença de micronúcleos (MN), pontes citoplasmáticas (NPBs), brotos nucleares (NBUDs)) (FENECH, 2000; FENECH & MORLEY, 1986; FENECH, 1997; FENECH, 2006).

Na última década, foi descrito um outro mecanismo adicional de formação de MNi, conhecido como brotação nuclear. Esse processo tem sido observado em culturas cultivadas sob condições seletivas fortes que induzem a amplificação do gene, bem como sob deficiência moderada de ácido fólico (SHIMIZU et al., 2005 e KIMURA et al., 2004). Shimizu et al. (1998; 2000) mostraram, usando experimentos in vitro com células de mamíferos, que o DNA amplificado é seletivamente localizado em locais específicos na periferia do núcleo e eliminado via brotação nuclear para formar MN durante a fase S da mitose. O DNA expandido pode ser eliminado através da combinação entre regiões homólogas dentro de sequências amplificadas, formando mini-círculos de DNA acentrônico e atelomérico (minicromossomos duplos), que localizam-se em regiões distantes do núcleo, através da excisão de sequências amplificadas após segregação em regiões distintas do núcleo. O processo de brotação nuclear ocorre durante a fase S e os brotos nucleares (NBUDs) são caracterizados por terem a mesma morfologia dos MN, com a diferença de que eles são ligados ao núcleo por um filamento estreito ou largo de material nucleoplasmático dependendo da fase do processo de brotamento (SHIMIZU et al., 1998; 2000).

O reconhecimento da importância das alterações citogenéticas em tumores de cães e gatos (DEVITT et al., 2009) levou também ao desenvolvimento de técnicas para a identificação de cromossomos nessas espécies (YANG et al., 2000).

A carcinogênese resulta de múltiplas etapas e pode envolver dezenas, até centenas, de genes, que apresentam alterações em sua expressão em decorrência de mutações e ampliações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos. Os principais grupos de genes envolvidos nesse processo, os proto-oncogenes, genes supressores tumorais, genes de controle do ciclo celular e de reparo do DNA (ROCHA & SILVA, 2003). Várias destas alterações são descritas em humanos, sendo as alterações citogenéticas determinantes no estabelecimento do diagnóstico e prognóstico (JAFFE et al., 2001), mas em medicina veterinária ainda precisam ser melhor descritas e estudadas.

Entretanto, em animais, a citogenética ainda é pouco utilizada no diagnóstico de neoplasias hematopoiéticas. Com base nessas informações, o trabalho aqui apresentado teve por objetivo investigar e contribuir para classificar esses transtornos, identificando e registrando a ocorrência de aberrações cromossômicas específicas e servindo como subsídios para o estudo do câncer em animais e na pesquisa translacional. Os resultados estão apresentados a seguir e redigidos no formato exigido pelo periódico Pesquisa Veterinária Brasileira, ao qual será submetido como artigo científico.

2 CAPÍTULO I

MANUSCRITO

Monossomia do cromossomo E3 em felinos FeLV positivos com neoplasias hematopoiéticas¹

Vanessa B. Centenaro^{2*}, Lara S. Dutra³, Larissa S. Mallmann⁴ Jacqueline N. Rodrigues⁴, Virgínia M. Cóser⁴, André P. Schuch⁵, Maurício B. Santos⁵, Alexandre Krause⁶

ABSTRACT.- Centenaro V.B., Dutra L.S., Mallmann L.S., Rodrigues J.N., Cóser V.M., Schuch A.P., Santos M.B., Krause A. 2017. **[E3 chromosome monosomy in Felv positive felines with hematopoietic neoplasms]**. Monossomia do cromossomo E3 em felinos FeLV positivos com neoplasias hematopoiéticas. *Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00*. Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: vane_cafw@yahoo.com.br

Hematopoietic tumors are the most common neoplastic disorders in felines. Many of these tumors are associated with infection by feline leukemia virus (FeLV) and one of the described mechanisms is the integration of viral material into the feline genome, which can lead to genomic instability and consequent alteration of genes related to proliferation control and cell death. When larger DNA fragments are affected, such changes can be observed by cytogenetic analysis. The present study aimed to observe cytogenetic changes in felines with hematopoietic neoplasms. The study was performed in eight felines, seven of them with a diagnosis of leukemia or lymphoma. The control consisted of a healthy feline FeLV negative with normal karyotype. At least 10 metaphases of each animal were analyzed. Additionally, 1000 lymphocytes of these two patients, were analyzed and classified cytologically by their viability (necrosis, apoptosis), mitotic state (mononuclear, binucleate (BN), mitotic multinucleate) and their chromosomal damage or instability state (presence of micronucleus (MN) in mononuclear, binucleate, as well as nuclear buds (NBUD). The results of this observation were statistically analyzed by the Wilcoxon paired test. In this chromosomal analysis two of these animals presented monosomy of the E3 chromosome, one with diagnosis of acute myeloid leukemia of the M6a (LMA-M6a) FAB subtype and another with multicenter lymphoma (LM). There were significant differences in LMA-M6a scores (N = 7, Z = 2.36, p = 0.01) and LM scores (N = 8, Z = 2.52, p = 0.01) when group control. However, there was no difference between AML and lymphoma (N = 8, Z = 0.07, p = 0.94). The E3 chromosome has 1401 genes, several related to cell cycle control (Plk1, Sun, Mad111, Mcm7), DNA repair (Pms2, Usp42), tumor suppression (Bcl7b). The loss of DNA fragments, such as the loss of the E3 chromosome in the two patients described, led to the haploinsufficiency of important genes for the cell cycle, and this could be a cause of genomic instability and consequently susceptibility to the development of cancer. The observation of cytogenetic alterations, in this way, allows a better understanding of the cancer in the feline species and translational research.

INDEX TERMS: Feline chromosome E3, genomic instability, DNA repair, FeLV, tumor supresor genes

¹ Recebido em...

Aceito para publicação em ...

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: alexandrekrause@ufsm.br.

³ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

⁴ Setor de Hematologia-Oncologia, Laboratório de Citogenética, Universidade Federal de Santa Maria.

⁵ Centro Regional Sul de Pesquisas Espaciais – CRS/INPE-MCT Campus da Universidade Federal de Santa Maria.

RESUMO.- Os tumores hematopoiéticos são os distúrbios neoplásicos mais comuns em felinos. Muitos desses tumores estão associados à infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV) e um dos mecanismos descritos é pela integração de material viral no genoma felino, que pode levar à instabilidade genômica e consequente alteração de genes relacionados com o controle da proliferação e morte celular. Quando fragmentos maiores de DNA são afetados, tais alterações podem ser observadas pela análise citogenética. O presente estudo objetivou observar as alterações citogenéticas em felinos com neoplasias hematopoiéticas. O estudo foi realizado em oito felinos, sete destes com diagnóstico de leucemia ou linfoma. O controle foi constituído por um felino saudável FeLV negativo com cariótipo normal. Foram analisadas no mínimo 10 metáfases de cada animal. Adicionalmente, destes dois pacientes foram analisados 1.000 linfócitos e classificados citologicamente pelo seu estado de viabilidade (necrose, apoptose), seu estado mitótico (mononucleado, binucleado (BN), multinucleado, mitótico) e seu dano cromossômico ou estado de instabilidade, presença de micronúcleo (MN) em célula mononucleada, binucleada, bem como brotos nucleares (NBUD). Os resultados dessa observação foram analisados estatisticamente pelo teste pareado de Wilcoxon. Nesta análise cromossômica dois destes animais apresentaram monossomia do cromossomo E3, um com diagnóstico de leucemia mieloide aguda do subtipo FAB M6a (LMA-M6a) e outro com linfoma multicêntrico (LM). Houve diferença significativa nas contagens de LMA-M6a (N=7; Z=2,36; p=0,01) e de LM (N=8; Z=2,52; p=0,01) quando comparados com o grupo controle. No entanto, não houve diferença entre LMA e linfoma (N=8; Z=0,07; p=0,94). No cromossomo E3 são descritos 1401 genes, sendo vários relacionados com controle de ciclo celular, (*Plk1, Sun, Mad11, Mcm7*), reparo de DNA (*Pms2, Usp42*) e supressão tumoral (*Bcl7b*). A perda de fragmentos de DNA, como o cromossomo E3 nos dois pacientes descritos, que leva a haploinsuficiência de genes importantes para o ciclo celular, poderia ser a causa de instabilidade genômica e, consequentemente suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer. A observação de alterações citogenéticas, dessa forma, possibilita o melhor entendimento do câncer na espécie felina e serve como subsídio para a pesquisa translacional.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Cromossomo felino E3, instabilidade genômica, reparo de DNA, FeLV, genes supressores tumorais.

INTRODUÇÃO

As neoplasias são doenças frequentes em medicina veterinária e são caracterizadas pelo crescimento anormal, não coordenado e ilimitado de células. Quando essas células adquirem capacidade de invasão local e disseminação para outros tecidos, as neoplasias recebem a denominação de malignas (Morris & Dobson 2001). As neoplasias são atualmente a principal causa de morte nos animais de companhia, sendo responsável por 32% das mortes em felinos domésticos (Withrow 2013). Os tumores hematopoiéticos são os mais comuns em felinos domésticos e 90% destes são classificados como linfoma (Wilson 2008, Haney et al. 2009).

O linfoma é uma neoplasia maligna hematopoiética que tem origem em células linfoides de órgãos sólidos (como linfonodos, fígado e intestino) (Withrow 2013), distinguindo-se, assim, da leucemia, onde as alterações primárias surgem na medula óssea (Barr 2006). As leucemias são neoplasias malignas que se originam das células precursoras hematopoiéticas da medula óssea que perdem a capacidade de diferenciação e se autoreplicam como clones de células geralmente imaturas e não funcionais. Em felinos, as leucemias são mais comuns em relação às demais espécies domésticas e são 70 vezes mais frequentes em animais positivos para os vírus da leucemia felina (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV) (Ritt 2010). O FeLV é um retrovírus do tipo C transmitido horizontalmente entre as populações de gatos domésticos (Hardy et al. 1973). O FeLV é pancitotrópico e causa alterações degenerativas ou proliferativas em diferentes tecidos, sendo a medula óssea e os órgãos linfoides seus principais alvos (Hardy 1982, Hoover & Mullins 1991). A integração proviral de FeLV nos locus de proto-oncogenes e regiões comuns de integração está estreitamente associada com o desenvolvimento de linfoma nas infecções naturais e experimentais (Tsatsanis et al. 1994, Miura et al. 1987). A integração clonal de provírus de FeLV foi identificada no genoma dessas células tumorais (Neil et al. 1991).

A etiopatogenia das neoplasias hematopoiéticas é multifatorial e a expressão aberrante de genes responsáveis por mecanismos celulares vitais, como proliferação e diferenciação, pode causar instabilidade genômica, elevando a probabilidade de eventos adicionais que culminam na transformação

neoplásica e na doença clínica. Em geral, o genoma do FeLV não contém oncogenes, mas o vírus pode se integrar em regiões e afetar a expressão de proto-oncogenes do hospedeiro (Neil et al. 1991). A inativação de genes supressores tumorais também pode ter algum papel na indução de tumores (Okuda et al. 1994).

O reconhecimento da importância das alterações citogenéticas de tumores de cães e gatos levou também ao desenvolvimento de técnicas para a identificação de cromossomos nessas espécies (Yang et al. 2000; Devitt et al. 2009). A citogenética de tumores tornou-se uma ferramenta importante para o diagnóstico e prognóstico de algumas doenças neoplásicas humanas, particularmente, do sistema hematopoiético e é, desde 2001, utilizada na classificação das neoplasias hematopoiéticas pela Organização Mundial da saúde.

A citogenética é baseada na análise cromossômica e na análise de micronúcleos (MN), que são formações globulares de DNA, originadas a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros, não incorporados ao núcleo da célula filha ao final do processo de divisão celular (Fenech et al. 1999). O cariótipo felino foi descrito em 1965, sendo 38 o número diploide normal de cromossomos em gatos domésticos. O cariótipo é composto de 18 pares autossômicos agrupados de A a F, de acordo com o tamanho e a localização do centrômero, e os cromossomos são classificados sequencialmente e numerados a partir do 1. O grupo A contém três pares de submetacêntricos grandes; o grupo B, quatro pares submetacêntricos grandes; o grupo C, dois pares metacêntricos grandes; o grupo D, quatro pares submetacêntricos de pequenos a médios; o grupo E, três pares metacêntricos de pequenos a médios; e o grupo F, dois pares acrocêntricos pequenos. O cromossomo X é submetacêntrico e apresenta tamanho médio e o Y é submetacêntrico (Cho et al. 1997).

Como complemento à análise de células metafásicas, propôs-se utilizar a análise de MN, que é tido como um método sensível para medir o dano citogenético (referente ao material genético, DNA da célula). O micronúcleo (MN) é uma forma de aberração cromossômica na cariocinese formado por dano de DNA. No estágio de interfase da mitose, a perda do centrômero ou danos ao fuso podem levar à formação de fragmentos cromossômicos que eventualmente permanecem no citoplasma das células-filhas após a mitose e formam um ou mais núcleos secundários, os micronúcleos. O MN possui forma oval ou arredondada, com diâmetro representando 1/20 a 1/3 do núcleo, localiza-se no citoplasma e possui padrão de coloração semelhante ao do núcleo (Countryman & Heddle 1976).

A investigação citogenética no gato doméstico foi iniciada há mais de 50 anos, com extensão posterior a outros membros da família Felidae. Esta foi acompanhada de avanços significativos, entre os quais está o "refinamento" da cultura celular, amostragem técnica e métodos cromossômicos. No entanto, a citogenética de felinos permanece limitada em comparação com estudos em outras famílias de mamíferos (Maldonado & Benavides 2011).

Em animais, a citogenética é pouco utilizada no diagnóstico de neoplasias hematopoiéticas e, assim como no estudo das neoplasias humanas, pode contribuir para classificar esses transtornos, pela identificação e registro da ocorrência de aberrações cromossômicas específicas, servindo como subsídio para o estudo do câncer. Assim, o objetivo deste estudo é descrever alterações cromossômicas e a presença de micronúcleos em células de dois felinos positivos para FeLV, um com diagnóstico de linfoma e outro, leucemia eritroide aguda (LMA M6).

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes e as amostras

O estudo foi realizado em sete felinos, trazidos para atendimento no Hospital Veterinário Universitário - UFSM. O diagnóstico de cada paciente com alterações hematopoiéticas foi determinado pelo exame clínico, hemograma, citologia aspirativa com agulha fina, mielograma e teste imunológico rápido para FeLV (ALERE S/A, São Paulo, SP). O controle foi constituído por um felino saudável. Parte do material coletado para exames complementares (1 ml de sangue periférico ou 1 ml de medula óssea) de cada paciente foi acondicionado em seringa com heparina e processado até 24 horas após a colheita. Nenhum dos animais havia recebido quimioterapia e / ou glicocorticoides antes da coleta da amostra. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM), mediante protocolo nº 4934020517.

Citogenética

Os procedimentos de cultivo celular foram realizados segundo Verma & Badu (1989), com modificações padronizadas previamente no laboratório de citogenética do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria.

Cultivo celular

O material de sangue periférico ou medula óssea colhido em seringa heparinizada foi diluído 1:1 em solução fisiológica estéril. Em seguida o material foi colocado em tubo de polipropileno estéril de 15 ml (tipo falcon) sobre Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich Brasil São Paulo), de acordo com as instruções do fabricante e submetido à centrifugação por 20 minutos a 400g, para separação das células mononucleares. Após, foram retiradas as células mononucleares, separadas pelo gradiente e transferidas para outro tubo estéril 15 ml. As células foram ressuspensas em RPMI – 1640 (Eximlab Com. De Equip. Lab. Ltda Curitiba Paraná) e centrifugadas a 400g durante cinco minutos. Esse procedimento foi repetido e, após a obtenção do pellet, as células foram ressuspensas em 2 ml do mesmo meio. Aproximadamente 0,3 ml da suspensão foram adicionados a um frasco de vidro estéril para cultivo celular, contendo 8 ml de meio de cultura (RPMI – 1640) suplementado com 2 ml de Soro bovino fetal (América do Sul Life Technologies do Brasil Com. Ind.Prod. Biotec Ltda, Itapevi, São Paulo) e incubadas por aproximadamente 24 horas a 37,5°C, 0,5% CO₂. Após a incubação, foram acrescentadas cinco gotas de colchicina (0,05µg/ml) (Sigma Chemical Company MO, USA) às células, que foram novamente incubadas por 15 minutos. Após este tempo o material foi centrifugado a 400g por cinco minutos, o sobrenadante retirado e as células ressuspensas em 10 ml de solução hipotônica (Gibas 1985), previamente aquecida, e colocadas a 37,5°C, 0,5% CO₂ durante 45 minutos. Após esta etapa foram acrescentadas às células 15 gotas da solução de fixação preparada imediatamente antes do uso (metanol: ácido acético, 3:1) (Ensure Merck, Darmstadt, Germany; PA Glacial. Proquímios, Bangu, Rio de Janeiro), homogeneizadas e centrifugadas a 400 g durante cinco minutos. Depois de retirado o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 5 ml de fixador. Nessa fase o material permaneceu 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 400g durante cinco minutos e ressuspendido na mesma solução. Essa etapa (lavagem) foi repetida por, no mínimo, três ciclos adicionais. Ao sedimento final foi acrescentado um volume de solução fixadora correspondente a três vezes ao do sedimento. Foram distribuídas três gotas da suspensão sobre lâminas previamente lavadas (conservadas em água destilada na geladeira). Após a secagem em ambiente úmido (banho-maria a 65°C), as lâminas foram identificadas e estocadas em estufa a 37,5°C por, no mínimo, sete dias, para posterior bandeamento G.

Bandeamento G

De cada paciente foram selecionadas três lâminas para a realização do bandeamento para obtenção das bandas G. Para tal, as lâminas foram imersas em RPMI1640 contendo Enzar – T (80µl de Enzar – T em 30 ml de RPMI pH 7,8, entre 20 a 23°C), durante 25 segundos. Imediatamente após transferidas para cubas contendo Etanol 70% (Merck, Darmstadt, Germany), onde foram imersas por cinco vezes; imersão em Tampão fosfato (pH 6,8). Após foi realizada a coloração com Giemsa (EMS, Washington DC, USA) (4,5 ml de Giemsa em 30 ml de Tampão fosfato pH 6,8) durante 20 minutos. Após os 20 minutos, lavagem com água destilada para a retirada do excesso de corante e secagem em temperatura ambiente. As lâminas foram analisadas e sempre que possível, foram analisadas no mínimo 10 metáfases de cada amostra em microscopia óptica em objetiva de 100 aumentos, as metáfases foram capturadas e cariotipadas sob um sistema de imagem, utilizado para cariótipos humanos, a partir desta primeira organização os cromossomos felinos foram classificados manualmente de acordo com Cho et al. (1997) utilizando o programa de processamento de imagem.

Análise de micronúcleo

A análise de micronúcleo foi baseada com critérios definidos por Fenech (2007). Para cada caso, foram analisados 1.000 células e classificados citologicamente pelo seu estado de viabilidade (necrose, apoptose), seu estado mitótico (mononucleado, binucleada (BN), multinucleado, mitótica) e seu dano cromossômico ou estado de instabilidade, presença de micronúcleo (MN) em célula mononucleada, binucleada, bem como brotos nucleares (NBUD). Os valores obtidos na análise de micronúcleo foram comparados por teste pareado de Wilcoxon (Zar 1999). Para o comparativo direto, os valores de células normais foram desconsiderados.

Identificação de possíveis genes-alvo

Foi consultada a página do Centro Nacional para Informação em Tecnologia (The National Center for Biotechnology Information (NCBI)) para a identificação dos genes descritos no cromossomo E3 felino e selecionados os genes cuja função poderia estar relacionada ao desenvolvimento do câncer, como controle da proliferação, ciclo celular, sobrevivência, apoptose e expressão gênica (Hanahan & Weinberg, 2011).

RESULTADOS

Dos sete animais com diagnóstico de neoplasias hematopoiéticas, quatro foram positivos para FIV e FeLV, dois apenas FeLV e um animal não havia sido testado. O indivíduo controle apresentava-se saudável e negativo para FeLV e FIV. Quanto ao diagnóstico, três apresentavam linfoma multicêntrico, dois linfoma mediastinal, um leucemia eritroide aguda (LMA M6a) e outro leucemia aguda não classificada.

Análise citogenética

As técnicas de citogenética convencional padronizadas para amostras humanas permitiram obter o cariótipo de sangue periférico e de medula óssea dos oito felinos analisados, dos quais foi possível analisar metáfases normais e com alterações numéricas como pode ser observado no Quadro 1. A principal alteração foi relacionada ao animal que apresentava LMA M6a e um dos animais com linfoma multicêntrico. Do primeiro, diagnosticado com LMA-M6a, foram analisadas onze metáfases, nas quais foram observadas três com número normal de cromossomos ($2n=38$) e oito anormais ($2n=37$), neste paciente também foi observada a deleção do braço curto do cromossomo E3. No segundo paciente, que apresentava linfoma multicêntrico, nove das 12 células analisadas também apresentaram esta mesma alteração numérica. A Figura 1 ilustra o cariótipo dos dois animais mencionados, dos quais foi observada a monossomia do cromossomo E3. Os demais animais apresentaram aneuploidia em seus cariótipos e não envolveram cromossomos específicos, sendo aleatório em vários pares de cromossomos.

A partir da análise cromossômica foi considerada a análise de MN apenas para os pacientes que apresentavam monossomia do cromossomo E3, devido a esta alteração ter sido recorrente, como pode ser observado na Figura 2. Os resultados mostram que houve o predomínio de células contendo um MN, e células binucleadas contendo um MN foram observadas apenas no paciente que apresentava linfoma. Não foram observadas células contendo dois ou mais micronúcleos. O Quadro 2 demonstra a contagem das células segundo a classificação citológica. Houve diferença significativa nas contagens de LMA-M6a ($N=7$; $Z=2,36$; $p=0,01$) e de Linfoma ($N=8$; $Z=2,52$; $p=0,01$) quando comparados com o grupo controle. No entanto, não houve diferença entre LMA e linfoma ($N=8$; $Z=0,07$; $p=0,94$).

Identificação de possíveis genes-alvo

Dentre os genes presentes no cromossomo E3 estão genes relacionados com o reparo de DNA (*Pms2*, *Ercc4* e *Usp42*), supressores tumorais (*Bcl7b*), controle de ciclo celular (*Plk1*, *Sun*, *Mad111*, *Mcm7*, *Usp42*), oncogênese (*Rab40*) e Apoptose (*Usp42*).

DISCUSSÃO

Desde as décadas de 1960 e 1970, uma correlação positiva entre a incidência de linfoma (Louwerens 2005), Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (Kawakami et al. 1967) e LMA, subtipo M6 (Oshiro et al., 1971) e a incidência de FeLV foi observada. Desta forma, o FeLV foi considerado a causa mais comum de neoplasmas hematopoiéticos entre as décadas de 1960 e 1980, quando 60% a 70% dos casos de linfoma eram diagnosticados em gatos virêmicos (Vail 2007).

No presente estudo foi observada a monossomia do cromossomo E3 em um paciente com linfoma e em outro com LMA M6a, além da perda de um segmento do braço curto do E3 remanescente neste último. A observação de uma mesma alteração citogenética em dois felinos FeLV positivos com neoplasmas hematopoiéticos sugere uma alteração cromossômica recorrente, como as descritas em vários cânceres (Bohlander, 2000). Alterações envolvendo o cromossomo E3 foram descritas em melanoma (monossomia) e em células cultivadas de sarcoma t(A2q; E3q). Pode-se notar que há uma relação entre a perda cromossômica e os resultados observados na análise de micronúcleos, que revelou maior ocorrência de micronúcleos e multinucleação nos dois pacientes descritos. A perda de um dos cromossomos E3, no qual são descritos 1401 genes, sendo muitos dos quais envolvidos em controle do ciclo celular, apoptose e outros processos vitais pode explicar a presença desses achados (Quadro 2). Segundo Bhattathiri (2001), nas neoplasias, a ocorrência de células multinucleadas pode ser devida à falha nos mecanismos de regulação da divisão celular ou pela falta de uma coordenação adequada entre a cariocinese e a citocinese.

O significado do aparecimento de mais de um núcleo ainda não é bem compreendido, mas tem sido sugerido um possível mecanismo compensatório para manter o balanço genético em certa população ou é um estado transicional para a poliploidia. Para DeNicola & Reagan (1998), células com múltiplos núcleos de vários tamanhos, incluindo os micronúcleos, são evidências de divisão anormal com desigual distribuição de cromatina nuclear e, portanto, características de malignidade celular.

Na análise citogenética dos dois pacientes que apresentaram maior frequência de MN em relação ao controle, também foi notado maior número de células necróticas, apoptóticas, mitóticas e a presença NBUDs. Esses dados corroboram com dados da literatura, nos quais a frequência de ocorrência de um micronúcleo tem correlação positiva com a ocorrência de aberrações cromossômicas (Kuramoto et al. 2002, Smith et al. 2003, Fenech 2006, Hamza & Mohankumar 2009, Juchimiuk-Kwasniewska et al. 2011). Atualmente, o teste de MN em linfócitos de sangue periférico é utilizado como biomarcador de dano cromossômico *in vivo* e *in vitro*. Muitas evidências teóricas se somam para dar subsídio ao papel causal da indução do MN no desenvolvimento do câncer (Mateuca et al. 2006).

A presença de células binucleadas com MN foi observada apenas no paciente que apresentava linfoma e era positivo somente para FeLV, segundo Rodilla (1993), que observou vários tipos celulares de mamíferos, a formação de células binucleadas seria o primeiro passo para altos níveis de ploidia e poderia ter um importante papel na transformação maligna. Nos dois pacientes que apresentaram a monossomia e a presença de MN tiveram um prognóstico desfavorável devido ao curso da doença, e em pouco tempo vieram a óbito, esta informação vai de acordo com vários estudos em medicina humana que mostram que a formação de micronúcleos em linfócitos é relevante para o grau de doença e tumores com maior formação de micronúcleo terão maior malignidade (Bonassi et al. 2007, Hamurcu et al. 2008).

Devido à positividade ao FeLV estar presente nos casos analisados, acredita-se que a integração de partículas virais ao genoma das células está relacionada com o desenvolvimento de tumores. A tumorigênese induzida pelo FeLV ocorre pela ativação de oncogenes ou por mutações no local de inserção. As sequências promotoras retrovirais, LTR (long terminal repeats), quando integradas próximas a um gene envolvido com proliferação ou auto-renovação, podem levar à sua hiperexpressão, fazendo com que as células-alvo apresentem maior proliferação ou sobrevida (Ghosh et al. 2000). Genes relacionados com a auto-renovação conferem imortalidade às células transformadas e propiciam o acúmulo de mutações, levando à instabilidade genômica (Yao & Dai 2014).

É provável que uma complexa interação de fatores co-oncogênicos esteja envolvida na patogênese do linfoma e da leucemia associados ao FeLV. Um dos sítios comuns de integração do FeLV é o *locus* do *flvi-2*. Esse gene é ortólogo do *Bmi1* humano, um gene polycomb responsável pela auto-renovação de células-tronco e cuja expressão é alterada em algumas leucemias (Mulaw et al. 2012). Em felinos, estas alterações também são descritas em tumores mamários (Mayr & Ortner 1995), células de linhagem de fibrossarcoma (Erichsen et al. 2012) e linfomas de células T (Yang et al. 1995).

A perda estrutural de um ou de vários genes, como o que ocorreu na monossomia descrita neste relato, leva à perda de heterozigosidade, uma condição importante quando os alelos remanescentes também estão alterados. Quando tais genes desempenham funções como supressão tumoral, controle de ciclo celular e apoptose, como alguns dos presentes no E3, a possibilidade de transformação maligna das células alteradas é grande. Tal condição é observada nas síndromes mielodisplásicas humanas, onde a deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5 [del(5q-)] pode ocorrer tanto em células progenitoras mieloides como eritroides e está relacionada à haploinsuficiência e posterior inativação do gene *RPSS14*, levando à ativação do p53 (Gabala & Besa 2014).

A exemplo de possíveis consequências da perda de genes importantes presentes no cromossomo E3, são listados os genes: *Mad111* (Mitotic Arrest Deficient Like 1), responsável pelo controle da montagem do fuso mitótico que impede o início da anáfase até que todos os cromossomos estejam adequadamente alinhados na metáfase. Dessa forma, o *Mad111* pode desempenhar um papel no controle do ciclo celular e na supressão tumoral (Akeray & Watanabe 2016). Este gene pode estar diretamente associado à presença de MN encontrados nos dois pacientes em questão, por apresentarem falhas no alinhamento dos cromossomos. Segundo Fenech & Morley 1986 e Hsu et al. 1989, os sistemas de reparo do DNA são responsáveis, pelo menos em parte, pela manutenção da integridade do material genético após os danos espontâneos ou induzidos no DNA. Partindo dessa premissa, na perda do E3, levando à haploinsuficiência do *Mad111* em um genoma instável pela positividade ao FeLV, pode ter ocorrido a deleção do outro alelo, causando alterações na mitose e a consequente formação dos MN observados.

Outro gene importante presente no E3 é o *Pms2*, responsável pelo sistema de reparo de bases mal pareadas do DNA (Wang & Lai 2014, Nakamura et al. 2014). O gene *Plk1*, cuja regulação dinâmica é crucial para os seus papéis na maturação do centrosoma, montagem do fuso, fixação dos microtúbulos-cinetocoros e citocinese (Degenhardt & Lampkin 2010). A proteína MCM2-7 que está intimamente ligada ao início da replicação do DNA (Luo 2011, Blow & Dutta 2005). A protease USP42 que está envolvida em vários processos celulares, tais como o ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (Paulsson et al. 2006). A perda funcional de vários genes como os acima descritos reforça a hipótese multicausal do câncer, onde vários genes que controlam processos cruciais estão alterados, levando à instabilidade genômica, que, pelo acúmulo de alterações leva ao desenvolvimento do câncer.

CONCLUSÕES

A monossomia do cromossomo E3 em dois felinos resulta em importante perda de genes responsáveis pelo controle do ciclo celular e é um dos eventos causais da instabilidade genômica e carcinogênese, podendo ser considerada um evento recorrente.

A positividade para FeLV observada nos pacientes reforça o papel da infecção viral como evento importante no desenvolvimento do câncer em felinos.

Agradecimentos.- A todos os colegas que colaboraram para a realização deste estudo, aos clínicos de pequenos animais e patologistas clínicos veterinários do HVU por contribuírem com informações referentes aos pacientes, a equipe do Laboratório de Citogenética do HUSM, em especial a Dra. Virginia Maria Cóser pelo seu tempo em orientar e também disponibilizar o espaço físico para desenvolver a maior parte deste projeto.

REFERÊNCIAS

Akeray, T. & Watanabe, Y. 2006. The spindle assembly checkpoint promotes chromosome bi-orientation: A novel Mad1 role in chromosome alignment. *Cell Cycle* v. 15, n. 4, 493-497.

Barr F. Imaging lymphoproliferative diseases in cats. In *Proceedings of the North American Veterinary Conference, Orlando, Florida, January 7-11, 2006, Volume 20, Small Animal Edition*, p. 583-585. 2006.

Bhattathiri, V.N. 2001. Amitotic cell divisions and tumour growth: an alternative model for cell kinetic compartments in solid tumours. *Oral Onc.* 37: 288-295.

Blow J.J. & Dutta A. 2005. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:476-86.

Bohlander, S.K. 2000. Fusion genes in leukemia: an emerging network. *Cytogenet. Cell. Genet.*91:52-56.

Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., et al. 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28, 625-31.

Cho K.W., Youn H.Y., Watari T. et al. 1997. A proposed nomenclature of the domestic cat karyotype, *Cytogenet. Cell Genet.* 79:71-78.

Countryman P.I. & Heddle J.A. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 41, 321-332.

Degenhardt Y. & Lampkin T. 2010. Targeting Polo-like kinase in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 16(2):384-389.

Denicola D. & Reagan, W. J. 1998. Using cytology in the diagnosis of cancer. In: Morrison, W.B. *Cancer in the dogs and cats: medical and surgical management*. Baltimore : Williams & Wilkins. Cap.9, p.79-94.

Devitt J.J., Maranon D.G., Ehrhart E.J., Bachand A.M., Lana S.E. & LaRue S.M. 2009. Correlations between numerical chromosomal aberrations in the tumor and peripheral blood in canine lymphoma. *Cytogenet. and Gen. Res.* v. 124, p. 12-18.

Erichsen J.V., Hecht W., Löhberg-Gruene C. & Reinacher M. 2012. Cell lines derived from feline fibrosarcoma display unstable chromosomal aneuploidy and additionally centrosome number aberrations. *Vet. Pathol.* 49(9), 648-657.

Fenech, M. & Morley, A.A. 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat. Res.* 161: 193-8.

- Fenech M., Holland N., Chang W.P., Zeiger E. & Bonassi S. 1999. The Human MicroNucleus Project: an international collaborative study on the use of micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428, 271-83.
- Fenech M. 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.* 600, 58-66.
- Fenech M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, v.2 n.5 1084-1104. South Australia, Australia.
- Ghosh S.K., Roy-Burman P. & Faller D.V. 2000. Long terminal repeat regions from exogenous but not endogenous feline leukemia viruses transactivate cellular gene expression. *J. Virol.* 74:9742-9748.
- Hamurcu Z., Dönmez-Altuntas H. & Papiroglu T. 2008. Basal level micronucleus frequency in stimulated lymphocytes of untreated patients with leukemia. *Canc. Genet. Cytogen.*, 180, 140-4.
- Hamza V.Z. & Mohankumar M.N. 2009. Cytogenetic damage in human blood lymphocytes exposed in vitro to radon. *Mutat. Res.* 661, 1-9.
- Haney S.M., Beaver L., Turrel J., Clifford C.A., Klein M.K., Crawford S., Poulson J.M. & Azuma C. Survival analysis of 97 cats with nasal lymphoma: a multiinstitutional retrospective study (1986-2006). *J. of Vet. Int. Med.*, 23, 287-294. 2009.
- Hardy W.D. Jr., Old L. J., Hess P. W., Essex M., et al. 1973. Horizontal transmission of feline leukemia virus. *Nature* 244, 266.
- Hardy, W.D., Jr., Hess. P.W., MacEwen, E.G., McClelland, A.J., Zuckerman. E.E., Essex. M., Cotter, S.M. & Jarrett. O. 1976. Biology of feline leukemia virus in the natural environment. *Cancer Res.* 36. 582-588.
- Hardy, W.D. 1982. Immunopathology induced by the feline leukemia-virus. *Springer Seminars in Immunopathology* 5, 75-106.
- Hoover, E.A. & Mullins, J.I. 1991. Feline leukemia virus infection and diseases. *J. A. Vet. Med Assoc.* 199, 1287-1297.
- Hsu T.C., Rearden H.H. & Luquette G.F. 1963. Karyological studies of nine species of Felidae. *American Naturalist*, v.97, n.895, p.225-234.
- Hsu T.C., Johnston D.A., Cherry L.M., Ramkissoon D., Schantz S.P., Jessup J.M., Winn R.J., Shirley L. & Furlong C. 1989. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int. J. Cancer.* 43: 403-09.
- Juchimiuk-Kwasniewska J., Brodziak L. & Maluszynska J. 2011. FISH in analysis of gamma ray-induced micronuclei formation in barley. *J. genet.* 52, 23-9.
- Kawakami T.G., Theilen G.H., Dungworth D.L., Munn R.J. & Beali S.G. 1967. "C"-type viral particles in plasma of cats with feline leukemia. *Science* 158:1049-1050.
- Kuramoto K., Ban S., Oda K., et al. 2002. Chromosomal instability and radiosensitivity in yelodysplastic syndrome cells. *Leukemia*, 16, 2253-58.
- Louwerens M., London C.A., Pedersen N.C. & Lyons L.A. 2005. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *J Vet Intern Med.* May-Jun;19(3):329-35.
- Luo J. 2011. Oncogenic activity of MCM7 transforming cluster. *World J. Clin. Oncol.* 2:120-4.
- Maldonado, A.C. & Benavides, G.F.R. 2011. Características cromosómicas de la familia Felidae. *Vet.zootec.* 5(1): 87-95.
- Mateuca R., Lombaert N., Aka P.V., Decordier I. & Kirsch-Volders M. 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88, 1515-31.

- Mayr, B. & Ortner W. 1995. Loss of chromosome B2-material in three cats of feline mammary tumours. *Res. Vet. Science.* 59, 61-63.
- Miura T., Tsujimoto H., Fukasawa M., Kodama T., et al. 1987 Structural abnormality and over-expression of the myc gene in feline leukemias. *ht. J. Cancer* 40, 564.
- Morris J. & Dobson J. *Small animal oncology.* Oxford: Blackwell Science Ltd. 2001.
- Mulaw, M.A., Krause, A., Deshpande, A.J., Krause, L.M., Rouhi, A., La Starza, R., Borkhardt, A., Buske, C., Mecucci, C., Ludwig, W.D., Lottaz, Bohlander, S.K. *Leukemia* 26, 1012-1019. 2012.
- Nakamura K., Banno K., Yanokura M., Iida M., Adachi M., Masuda K., et al. 2014. Features of ovarian cancer in Lynch syndrome (review). *Mol. Clin. Oncol.* 2:909-916.
- Neil J. C., Fulton R., Rigby M. & Stewart M. 1991. Feline leukemia virus: generation of pathogenic and oncogenic variants. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 171, 67.
- Okuda M., Umeda A., Sakai T., Ohashi T., et al. 1994. Cloning of feline p.53 tumor suppressor gene and its aberration in hematopoietic tumors. *ht. J. Cancer* 58,602.
- Oshiro L.S., Riggs J.L., Taylor D.O.N., Lennette E.H. & Huebner R.J. 1971. Ferritin-label antibody studies of feline C-type particles. *Cancer Res.* 31:1100-1110.
- Paulsson K., Békássy A.N., Olofsson T., Mitelman F., Johansson B. & Panagopoulos I. 2006. A novel and cytogenetically cryptic (7;21)(p22;q22) in acute myeloid leucemia results in fusion of RUNX1 with the ubiquitin-specific protease gene USP42. *Leukemia.* 20(2):224-229.
- Ritt M.G. 2010. Epidemiology of Hematopoietic Neoplasia, p.453-458. In: Weiss & Wardrop K.J. *Schalm's Veterinary Hematology.* 6th ed. Wiley-Blackwell. Ames.
- Rodilla, V. 1993. Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated CHO cultures. *Mut. Res./Genetic Toxicol.* v. 300, Issues 3-4, p. 281-291.
- Smith L.E., Nagar S., Kim G.J. & Morgan W.F. 2003. Radiation induced genomic stability: radiation quality and dose response. *Health Phys.* 85, 23-29.
- Tsatsanis C., Fulton R., Nishigaki K., Tsujimoto H., et al. 1994 Genetic determinants of feline leukemia virus- induced lymphoid tumors: patterns of proviral insertion and gene rearrangement. *J. Virol.* 68, 8296.
- Vail, D.M. 2007. Feline lymphoma and leukemia. In Vail, D.M. & Withrow, S.J. (Eds). *Withrow and Macewen's small animal clinical oncology.* 4th ed. 31-50. Saunders Elsevier. Missouri.
- Verma, R. & Badu, A. 1989. *Human Chromosomes: Principles and Techniques.* McGraw-Hill, New York.
- Wang W.C. & Lai Y.C. 2014. Molecular pathogenesis in granulosa cell tumor is not only due to somatic FOXL2 mutation. *J Ovarian Res.* 7:88.
- Wilson H.M. Feline alimentary lymphoma: demystifying the enigma. *Topics in Companion Animal Medicine,* 23(4), 177-184. 2008.
- Withrow S.J. Vail, D.M., Page, R.L. (Eds). *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology.* (5th ed.). (p. 638-653). Missouri: Saunders Elsevier. 2013.
- Yang F.W., Iijima K., Tsujimoto H., Tamurat Y. & Higurashi M. 1995. Chromosomal translocations in two feline t-cell lymphomas. *Leukemia Res.* v. 19, n.11, p. 857-860.
- Yang F., Milne B.S., Schelling C., Dolf G., Schläpfer J., Switonski M., Ladon D., Pienkowska A., Bosma A.A., Sargan D.R. & Ferguson-Smith M.A. 2000. Chromosome identification and assignment of DNA clones in the dog using a red fox and dog comparative map. *Chromosomic Res.,* v. 8, p. 93-110.
- Yao Y. & Dai W. Genomic Instability and Cancer. *J. Carcinog. Mut..* 5. 2014.

Zar, J.H. Biostatistical analysis. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p.875.

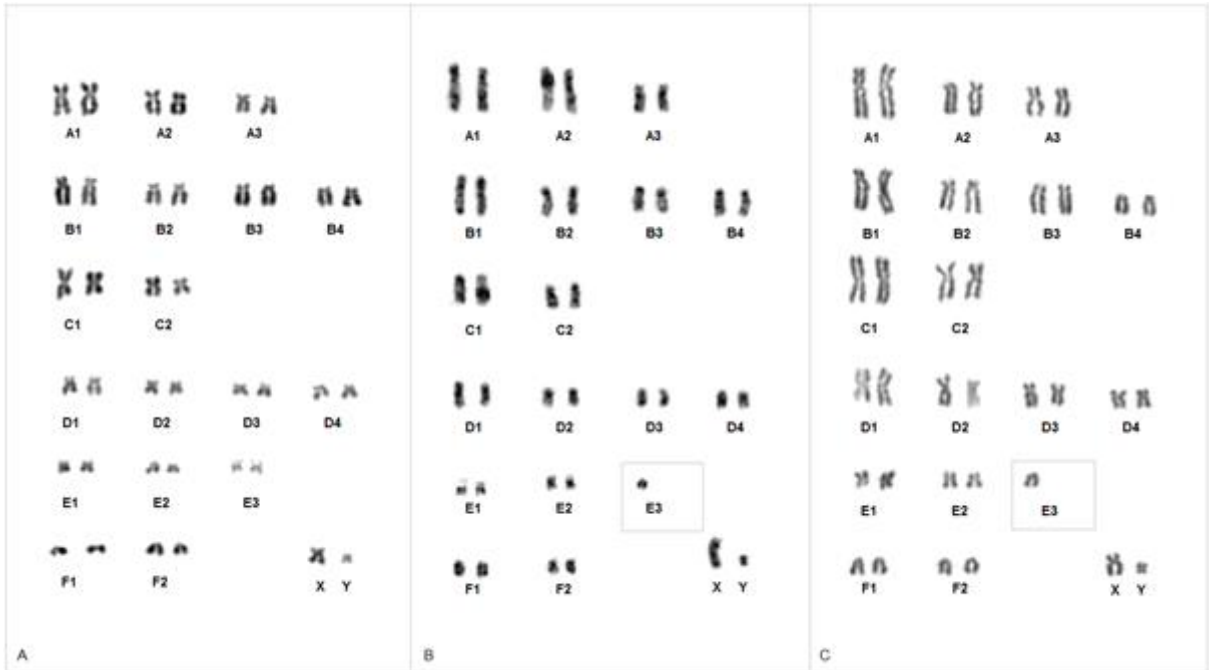


Figura 1- Fotomicrografia de metáfase representativa, aumento de 1000x, com bandeamento G. Em A) cariótipo: 38,XY, normal, B) representativo da monossomia e deleção do braço curto do cromossomo E3 de um felino com diagnóstico de LMA-M6a e em C) paciente com linfoma apresentando monossomia do E3.

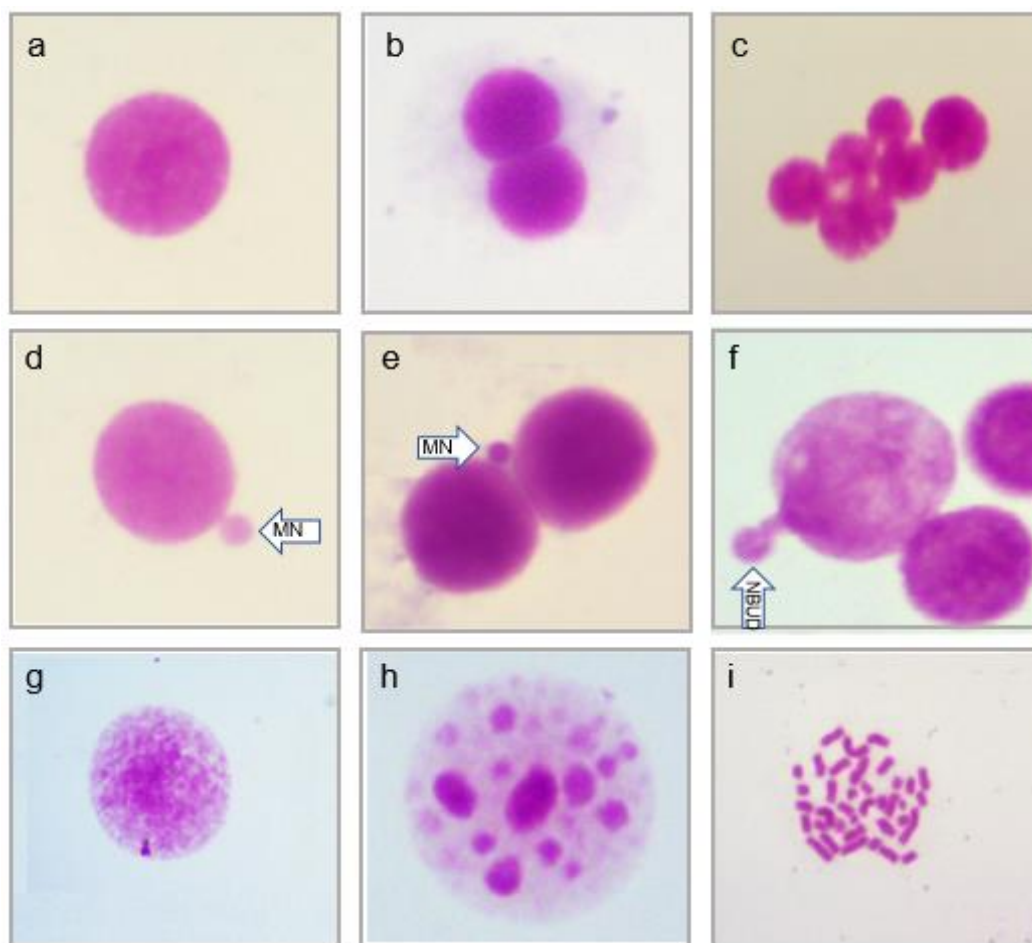


Figura 2 - Fotomicrografias das células obtidas no cultivo celular RPMI 1640 com SBF. Aumento de 1000 vezes. Em (A) célula mononucleada; (B) célula BN; (C) célula multinucleada; (D) célula mononucleada contendo um MN; (E) célula BN contendo um MN; (F) célula apresentando brotamento nuclear, NBUD; (G) célula necrótica; (H) célula apoptótica; (I) célula mitótica.

Quadro 1. Resultados da análise cromossômica relacionados a felinos com neoplasias hematopoiéticas.

Animal	Neoplasia	FeLV ²	FIV ³	Metáfase normal	Metáfase alterada
1	LMA M6a ¹	Positivo	Positivo	3	8
2	Linfoma Multicêntrico	Positivo	Negativo	3	9
4	Linfoma Multicêntrico	Positivo	Negativo	7	3
4	Linfoma Mediastinal	Positivo	Positivo	9	1
5	Leucemia aguda	Positivo	Positivo	6	4
6	Linfoma Multicêntrico	Positivo	Positivo	7	3
7	Linfoma Mediastinal	NT ⁴	NT	10	0
Controle	Sem alterações	Negativo	Negativo	10	0

¹LMA-M6a: leucemia eritroide aguda. ²FeLV: vírus da leucemia felina. ³FIV: vírus da imunodeficiência felina. ⁴NT: não testado.

Quadro 2. Descrição das características morfológicas nucleares, ploidia e estado mitótico e de sobrevivência de células de felinos com leucemia mieloide aguda M6a, linfoma multicêntrico e de um animal controle.

Células	Animal		
	Controle	LMA-M6a ⁴	Linfoma
Mononuclear	989	889	932
Binuclear	7	8	16
Multinuclear	0	8	19
Mononuclear MN¹	0	5	7
Binuclear MN	0	0	2
NPBs²	0	0	0
NBUDs³	0	3	7
Necrótica	1	12	8
Apoptótica	1	24	5
Mitótica	2	51	4
Total	1000	1000	1000

¹MN: micronúcleo. ²NPBs: pontes nucleoplasmáticas. ³NBUDs: brotos nucleares. ⁴LMA-M6a: leucemia eritroide aguda.

3 CONCLUSÃO

A análise citogenética de células neoplásicas é importante para identificar alterações e estabelecer possíveis causas associadas ao desenvolvimento das neoplasias.

A monossomia do cromossomo E3 é uma alteração citogenética recorrente em felinos e envolve genes importantes no controle de ciclo celular, apoptose, reparo de DNA e supressão tumoral e sobrevida, processos associados à malignidade. A presença de micronúcleos está relacionada com a malignidade dos neoplasmas.

A citogenética convencional é adequada para identificar anomalias cromossômicas relacionadas com a etiopatogenia das neoplasias.

4 REFERÊNCIAS

- BISHOP, J. M. The molecular genetics of cancer. **Science** 235, 305. 1987.
- BOAS, D. S. V.; Cariótipo multicolorido: mapeamento cromossômico através do uso de sondas de DNA fluorescentes. **Revista Ceciliana**, v. 1, n. 1, p. 1-17, Santa Cecília, 2009.
- BOUVARD, V., BAAN, R., STRAIF, K., GROSSE, Y., SECRETAN, B., EL GHISSASSI, F., BENBRAHIM TALLAA, L., GUHA, N., FREEMAN, C., GALICHET, L., et al. A review of human carcinogens-Part B: biological agents. **Lancet Oncology** 10, 321–322. 2009.
- COSTA, U.M., REISCHAK, D., SCHMITT, A.C., RENCK, L., OLIVEIRA, E.S., FERREIRO, L. Detection of feline leukemiavirus (FeLV) antigen from 1992 to June 2000 by indirect immunofluorescence test in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Virus Reviews Research**. 5, 94.
- COUTO, C. G. Linfoma em cães e gatos., IN: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. *Medicina interna de pequenos animais*. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- COUTO, C.G. Lymphoma in the cat and dog. In: NELSON, R.N. & COUTO, C.G. (Eds). *Small animal internal medicine*. 2009. (4th ed.). (pp. 1175-1186). Missouri: Mosby Elsevier.
- DALLA-FAVERA, R., BREGNI, M. & ERIKSON, J. Human c- myc one gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA. 79, 7824. 1982.
- DEVITT, J.J., MARANON, D.G., EHRHART, E.J., BACHAND, A.M., LANA, S.E. & LARUE, S.M. Correlations between numerical chromosomal aberrations in the tumor and peripheral blood in canine lymphoma. **Cytogenetical and Genome Research**, v. 124, p. 12–18. 2009.
- ERICHSEN, J.V., HECHT, W., LÖHBERG-GRUENE, C. & REINACHER, M. Cell lines derived from feline fibrosarcoma display unstable chromosomal aneuploidy and additionally centrosome number aberrations. **Veterinary Pathology** 49(9), 648-657. 2012.
- FEARON, E. F. & VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 61, 759. 1990.
- FENECH, M. & MORLEY, A.A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low-dose x-irradiation. **Mutation Research**. 161, 193–198. 1986.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**. 600, 58–66. 2006.
- FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**. 392, 11–18. 1997.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. 455, 81–95. 2000.

FIGHERA R.A. & GRAÇA D.L. Sistema hematopoiético. In: SANTOS R.L. & ALESSI A.C. (Eds), **Patologia Veterinária Brasileira**. São Paulo: Roca, 2011. p.337-422

FORREST, D., ONIONS, D., LEES, G., NEIL, J.C. Altered structure and expression of c-myc in feline T-cell tumours. **Virology** 158, 194–205. 1987.

FUJINO, Y., OHNO, K., TSUJIMOTO, H. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: insertional mutagenesis. **Veterinary Immunology Immunopathology** 123, 138–143. 2008.

FUJINO, Y., LIAO, C.P., ZHAO, Y.S., PAN, J., MATHES, L.E., HAYES, K.A., OHNO, K., TSUJIMOTO, H., ROY-BURMAN, P. Identification of a novel common proviral integration site, flit-1, in feline leukemia virus induced thymic lymphoma. **Virology** 386, 16–22. 2009.

GIEGER T. Alimentary Lymphoma in Cats and Dogs, **Veterinary Clinical Small Animal** 41, 419–432. 2011.

GOH, K.O., SMITH, R. A. & PROPER, J. S. Chromosomal aberrations in leukemic cats. **Cornell Vet.** 71, 43. 1981.

GRINDEM, C. B. & BUOEN, L. C. Cytogenetic analysis in nine leukaemic cats. **Journal Comparative Pathology** 101, 21. 1989.

GULINO, S. E. Chromosome abnormalities and oncogenesis in cat leukemias. **Cancer Genetic Cytogenetic.** 64, 149. 1992.

HALUSKA, F.G., TSUJIMOTO, Y., CROCE, C.M. The t(8:14) chromosome translocation of the Brukitt lymphoma cell line Daudi occurred during immunoglobulin gene rearrangement and involved the heavy chain diversity region. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA. oct; 84(19): 6835-6839. 1987.

HANEY, S.M., BEAVER, L., TURREL, J., CLIFFORD, C.A., KLEIN, M.K., CRAWFORD, S., POULSON, J.M. & AZUMA, C. Survival analysis of 97 cats with nasal lymphoma: a multiinstitutional retrospective study (1986-2006). **Journal of Veterinary Internal Medicine.** 23, 287-294. 2009.

HARDY, W.D. JR., OLD, L. J., HESS, P. W., ESSEX, M., et al. Horizontal transmission of feline leukemia virus. **Nature.** 244, 266. 1973.

HARDY, W.D.. JR., HESS. P.W., MACEWEN, E.G., MCCLELLAND, A.J.. ZUCKERMAN. E.E., ESSEX. M., COTTER, S.M., JARRETT. O.. Biology of feline leukemia virus in the natural environment. **Cancer Research.** 36. 582-588. 1976.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. **Viruses** 4, 2684–2710. 2012.

- HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**. 18, 187–192. 1973.
- HOOVER, E.A. & MULLINS, J.I. Feline leukemia virus infection and diseases. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 199, 1287–1297. 1991.
- HSU, T.C. & REARDEN, H.H. Further Karyological Studies on Felidae. **Chromosoma** (Berl.), v.16. p.365-371, 1965.
- HUTSON, C.A., RIDEOUT, B.A., PEDERSEN, N.C. Neoplasia associated with feline immunodeficiency virus infection in cats of Southern California. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 199. 1357-1362. 1991.
- JAFFE, E.S., HARRIS, N.L., STEIN, H. & VARDIMAN, J.W. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Lyon, IARC Press). 2001.
- JOHNSON, W.E., SLATTERY, J.P., EIZIRIK, E. et al. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. **Molecular Ecology**, v.8, p.79-94, 1999.
- JONKERS, J. & BERNS, A. Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. **Biochimica et Biophysica Acta** 1287, 29–57. 1996.
- JORDE, L.B., CAREY, J.C., BAMSHAD, M.J. & WHITE, R.L. 2000. **Genética Médica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- KIMURA, M., UMEGAKI, K., HIGUCHI, M., THOMAS, P. & FENECH, M. MTHFR C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. **Journal of Nutrition**. 134, 48–56. 2004.
- KLEIN, A. DE, KESSEL A. G. VAN & GROSVELD G. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. **Nature** 300, 765. 1982.
- KLEIN, G. The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis. **Nature** 294, 313. 1981.
- KNUDSON, JR., A.G. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. **Cancer Research**. 45, 1437–1443. 1985.
- LEVESQUE, K.S., BONHAM, L., LEVY, L.S. flvi-1, a common integration domain of feline leukemia virus in naturally occurring lymphomas of a particular type. **Journal of Virology**. 64, 3455–3462. 1990.
- LEVESQUE, K.S., MATTEI, M.G., LEVY, L.S. Evolutionary conservation and chromosomal localization of flvi-1. **Oncogene** 6, 1377–1379. 1991.
- LEVY, L.S., LOBELLE-RICH, P.A., OVERBAUGH, J. flvi-2, a target of retroviral insertional mutagenesis in feline thymic lymphosarcomas, encodes bmi-1. **Oncogene** 8, 1833–1838. 1993.

- LI, J., SHEN, H., HIMMEL, K.L., DUPUY, A.J., LARGAESPADA, D.A., NAKAMURA, T., SHAUGH-NESSY JR., J.D., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G. LEUKAEMIA disease genes: large-scale cloning and pathway predictions. **Nature Genetics**. 23, 348–353. 1999.
- LOUWERENS, M., LONDON, C.A., PEDERSEN, N.C. & LYONS, L.A. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. May-Jun;19(3):329-35. 2005.
- MAYR, B. & ORTNER W. Loss of chromosome B2-material in three cats of feline mammary tumours. **Research in Veterinary Science**. 59, 61-63. 1995.
- MAYR, B., WEGSCHEIDER, H., REIFINGER, M., et al. Cytogenetic Alterations in Four Feline SoftTissue Tumours. **Veterinary Research Communications**, v.22, p.21-29, 1998.
- MAYR, B., WINKLER, G., SCHAFFNER, G., REIFINGER, M. & BREM, G. Short communication: N-ras mutation in a feline lymphoma. Low frequency of N-ras mutations in a series of feline, canine and bovine lymphomas. **The Veterinary Journal**, 163, 326-328. 2002.
- MICHEL, K.E. & SORENMO, K.U. Nutritional status of cats with cancer: nutritional evaluation and recommendations. 2008. In: P. PIBOT, V. BIOURGE & D. ELLIOTT (Eds.), **Encyclopedia of Feline Clinical Nutrition**.
- MIURA, T., SHIBUYA, M., TSUJIMOTO, H., FUKASAWA, M., HAYAMI, M. Molecular cloning of a feline leukemia provirus integrated adjacent to the c-myc gene in a feline T-cell leukemia cell line and the unique structure of its long terminal repeat. **Virology** 169, 458–461. 1989.
- MIURA, T., TSUJIMOTO, H., FUKASAWA, M., KODAMA, T., et al. Structural abnormality and over-expression of the myc gene in feline leukemias. **International Journal of Cancer**. 40, 564. 1987.
- MUNDAY, J.S., DUNOWSKA, M., HILLS, S.F., LAURIE, R.E. Genomic characterization of Felis catus papillomavirus-3: A novel papillomavirus detected in a feline Bowenoid in situ carcinoma. **Veterinary Microbiology** 165, 319–325. 2013.
- NEIL, J.C., FULTON, R., RIGBY, M., HOOVER, E.A. Feline leukemia virus: generation of pathogenic and oncogenic variants. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 171, 67-93. 1991.
- NEIL, J.C., HUGHES, D., MCFARLANE, R., WILKIE, N.M., ONIONS, D.E., LEES, G., JARRETT, O. Transduction and rearrangement of the myc gene by feline leukaemia virus in naturally occurring T-cell leukaemias. **Nature** 308, 814–820. 1984.
- OKUDA, M., UMEDA, A., SAKAI, T., OHASHI, T., et al. Cloning of feline p.53 tumor suppressor gene and its aberration in hematopoietic tumors. **International Journal of Cancer** 58,602. 1994.

PARKIN, D.M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. **International Journal of Cancer** 118, 3030–3044. 2006.

PONTIER, D., FROMONT, E., COURCHAMP, F., ARTOIS, M., YOCCOZ, G. Retroviruses and sexual size dimorphism in domestic cats (*Felis catus*). **Proceedings Biological Sciences**. 265, 167–173. 1998.

REZANKA, L.J., ROJKO, J.L., NEIL, J.C. Feline leukemia virus- pathogenesis of neoplastic disease. **Cancer Investigation** 10, 371–389. 1992.

RIPPS, C. S. & HURVITZ, A. I. Myeloproliferative disorder in two cats: cytogenetic studies. **American Journal of Veterinary Research**. 32, 93. 1971.

RITT M.G. Epidemiology of Hematopoietic Neoplasia, p.453-458. In: WEISS & WARDROP K.J. Schalm's **Veterinary Hematology**. 2010. 6th ed. Wiley-Blackwell. Ames.

ROCHA, J.C.C. & SILVA, S.N. Oncogenética. In: COELHO FRG, KOWALSKI LP. **Bases da Oncologia**. 2. ed. São Paulo: TECMEDD; 2003: p. 423-32.

SANTANA, A. E. **Oncologia em cães e gatos**, IN: DALECK, C. R.; NARDI, A. B.; RODASKI, S. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2009.

SCHMIDT-KÜNTZEL, A., NELSON, G., DAVID, V.A. et al. A Domestic cat X Chromosome Linkage Map and the Sex-Linked orange Locus: Mapping of orange, Multiple Origins and Epistasis Over nonagouti. **Genetics**, v.181, p.1415-1425, 2009.

SCHNEIDE, R., FRYE, F.L., TAYLOR, D.O.N., DORN, C.R. A household cluster of malignant lymphoma. **Cancer Research** 27, 1316–1322. 1967.

SHELTON, G.H., GRANT, C.K., COTTER, S.M., GARDNER, M.B., HARDY, W.D., DIGIACOMO, R.F. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia-virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats – a retrospective study (1968–1988). **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology** 3, 623–630. 1990.

SHIMIZU, N., ITOH, N., UTIYAMA, H. & WAHL, G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **Journal of Cell Biology**. 140, 1307–1320. 1998.

SHIMIZU, N., SHIMUARA, T. & TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutation Research**. 448, 81–90. 2000.

SHIMIZU, N., SHINGAKI, K., KANEKO-SASAGURI, Y., HASHIZUME, T. & KANDA, T. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. **Experimental Cell Research**. 302, 233–243. 2005.

TOGNI, M., CURTIS, A., KOMMERS, G.D., IRIGOYEN, L.F., FIGHERA, R.A. Causas de morte e razões para eutanásia em gatos na Região Central do Rio Grande do Sul (1964-2013).

2016. 80f. Tese de doutorado (Patologia Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

TSATSANIS, C., FULTON, R., NISHIGAKI, K., TSUJIMOTO, H., et al. Genetic determinants of feline leukemia virus- induced lymphoid tumors: patterns of proviral insertion and gene rearrangement. **Journal of Virology**. 68, 8296. 1994.

TSUJIMOTO, H., FULTON, R., NISHIGAKI, K., MATSUMOTO, Y., HASEGAWA, A., TSUJIMOTO, A., CEVARIO, S., O'BRIEN, S.J., TERRY, A., ONIONS, D., et al. A common proviral integration region, fit-1, in T-cell tumors induced by myc-containing feline leukemia viruses. **Virology**. 196, 845–848. 1993.

TSUJIMOTO, Y., FINGER, L. R., YUNIS, J., NOWELL, P. C., et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cell with the t(14;18) chromosome translocation. **Science**. 226, 1097. 1984.

VAIL, D. M. Manual Sanders: **Clínica de pequenos animais**. IN: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. 2008. 3ª Edição. São Paulo: Roca.

VAIL, D.M. Feline lymphoma and leukemia. In: WITHROW, S.J., VAIL, D.M., PAGE, R.L. (Eds). Withrow and MacEwen's. **Small animal clinical oncology**. (5th ed.). (p. 638-653). Missouri: Saunders Elsevier. 2013.

WALKER, D. **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**, IN: COWELL, R. L; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA, D. B. 2009. 3ª Edição. São Paulo: Med. Vet.

WEEDEN, A.L., TAYLOR, K.R., TERRELL, S.P., GALLAGHER, A.E., WAMSLEY, H.L. Suspected myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm in a feline leukemia virus-negative cat. **Veterinary Clinical Pathology**, 45/4, 584–593. 2016.

WILSON, H.M. Feline alimentary lymphoma: demystifying the enigma. **Topics in Companion Animal Medicine**, 23(4), 177-184. 2008.

WOZENCRAFT, W.C. Order Carnivora. In: WILSON, D.E., REEDER, D.M. (Eds.). **Mammal Species of the World. A taxonomic and geographic reference**. 3.ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005. p.532-545.

YAMAMOTO, J.K., SPARGER, E., HO E.W., ANDERSEN, P.R., O'CONNOR, P., MANDELL, C.P., LOWENSTINE, L., MUNN, R., PEDERSEN, N.C. The pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. **American Journal of Veterinary Research**. 49, 1246-1258. 1988.

YANG, F., MILNE, B.S., SCHELLING, C., DOLF, G., SCHLÄPFER, J., SWITONSKI, M., LADON, D., PIENKOWSKA, A., BOSMA, A.A., SARGAN, D.R. & FERGUSON-SMITH, M.A. Chromosome identification and assignment of DNA clones in the dog using a red fox and dog comparative map. **Chromosomic Research**, v. 8, p. 93-110. 2000.

YANG, F.W., IJIMA, K., TSUJIMOTOT, H., TAMURAT, Y. & HIGURASHI, M. Chromosomal translocations in two feline t-cell lymphomas. **Leukemia Research**. Vol. 19, No. 11, pp. 857-860. 1995.

YUNIS J. J. The chromosome basis of human neoplasia. **Science** 221, 227. 1983.