

## ¿Pueden los niveles de ATM y de TP53 influenciar el bajo potencial de metástasis del TVT canino?#

Can the ATM and TP53 levels influence the low metastasis potential of canine TVT?

**RR Huppess\*, M Carvalho<sup>b</sup>, TMMR Ferreira<sup>c</sup>, YT Granja-Salcedo<sup>d</sup>, RAR Uscategui<sup>e</sup>, JLC Castro<sup>f</sup>, PM Josiani<sup>c</sup> AB De Nardi<sup>c</sup>, RL Amorim<sup>g</sup>**

<sup>a</sup>Profesor de técnica quirúrgica y clínica de pequeños animales, Facultad Inga-Uningá-Maringá-PR, Brazil.

<sup>b</sup>Asistente de apoyo académico IV ayudando en el desarrollo de la investigación en el campo de la carcinogénesis, Brazil.

<sup>c</sup>Departamento de Clínica y Cirugía Veterinaria, FCAV UNESP, Jaboticabal, Brazil.

<sup>d</sup>Departamento de Producción Animal, FCAV UNESP, Jaboticabal, Brazil.

<sup>e</sup>Departamento de clínica y cirugía veterinaria, FCAV UNESP, Jaboticabal, Brazil.

<sup>f</sup>Profesor de técnica quirúrgica y clínica de pequeños animales, Facultad PUC- Curitiba, Brazil.

<sup>g</sup>Profesor asistente en la Universidad Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP-Botucatu-SP, Brazil.

### SUMMARY

The study of metastatic progression mechanisms of TVT is necessary. Several prognostic markers have been studied, including ATM gene and protein expression. When present in low expression, this gene is associated to neoplastic progression and low survival rates, especially in mammary neoplasms in humans. The main function of TP53 is to interrupt cell cycle and DNA repair or to induce the apoptosis. Therefore, it is suggested that the loss of its function may allow mutated cells to accumulate more mutations, and even inactivate others suppressor and proto oncogenes, favoring the development and onset of neoplasms. This study aimed to evaluate ATM and TP53 gene expression in TVT. Thirty two canine TVT samples that had their mRNA extracted and submitted to qRT-PCR technique were used. The results were compared to peripheral blood of 10 healthy dogs as control group. At the evaluation of the transcript ATM gene it was observed a significant increase expression in tumoral tissue (TVT) ( $P < 0.0001$ ) when compared to control group. However, the TP53 gene showed similar transcript gene between tumor tissue (TVT) ( $P = 0.26$ ) and control group. These factors may explain the low metastatic rate.

*Key words:* expression, metastatic invasion, tumoral suppressor genes.

### RESUMEN

A pesar de que pocos pacientes con TVT presentan metástasis a distancia, el estudio de este modelo de transmisión de células neoplásicas puede contribuir a la comprensión del mecanismo de implantación de las células metastásicas. Varios marcadores de pronóstico se han estudiado en la progresión tumoral, dentro de ellos la expresión génica y proteica del ATM. Este gen, en bajas expresiones está relacionado directamente a la progresión neoplásica, principalmente en neoplasias mamarias en humanos, así como en la reducción de la supervivencia global de estos pacientes. La principal función del TP53 es la interrupción del ciclo celular y reparación del ADN o inducción de la apoptosis, por tal motivo se sugiere que la pérdida de su función puede permitir que células mutadas acumulen aún más mutaciones e inactiven otros supresores y protooncogenes favoreciendo el desarrollo y surgimiento de neoplasias. El objetivo del estudio fue evaluar la expresión génica de ATM y TP53 en TVT. Para eso utilizamos 32 muestras de TVT canino donde su mRNA fue extraído y usado en la técnica de qRT-PCR. Los resultados fueron comparados con un grupo control compuesto por sangre periférica de 10 caninos libres de neoplasias. En la evaluación de la expresión de transcritos de ATM hubo mayor expresión ( $P < 0,0001$ ) en el tejido tumoral del TVT en comparación con el grupo control. En el TP53 no se encontraron diferencias estadísticas ( $P = 0,26$ ) entre los grupos. Estos factores pueden ayudar a explicar el bajo índice metastásico originado por esta neoplasia.

*Palabras clave:* expresión, invasión metastásica, genes supresores tumorales.

### INTRODUCCIÓN

El tumor venéreo transmisible canino (TVT) es una neoplasia maligna de células redondas, siendo transmitido naturalmente entre los caninos y afecta a animales

de ambos sexos (Vazquez-Mota y col 2008, Varughese y col 2012). Normalmente el TVT afecta los genitales externos (Das y Kumar 2000) y su transmisión ocurre por implantación de las células tumorales, principalmente por el coito, sin embargo también puede ocurrir por lamedura o por el olfateo del órgano genital afectado (Marchal y col 1997, Bautista-Gómez y col 2011). La metástasis del TVT raramente ocurre, sin embargo ya fueron descritas afectando órganos como las amígdalas, globo ocular, hígado, bazo, riñón, pulmón, musculatura

Acceptado: 10.09.2015.

# Financiado por la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2011/08290-2) y el CNPq (processo 477670/2011-3).

\* rafaelhuppess@hotmail.com

y hasta órganos múltiples (Oduye y col 1973, Rogers y col 1998, Park y col 2006).

Varios investigadores buscan entender el origen y la evolución del TVT (Rebbeck y col 2009) y estudios actuales sugieren que el TVT se originó de una misma célula clonal de lobos hace 65.000 años y que este tumor es genéticamente distinto de su hospedero (Bautista-Gómez y col 2011, Murchison y col 2014).

El gen ataxia telangiectasia mutado (ATM), identificado en 1995 en humanos (Teraoka y col 1999), está asociado al desarrollo de varias enfermedades, como ataxia cerebelar, telangiectasias oculares, deficiencia inmunológica, radiosensibilidad, diabetes insulinoresistente, envejecimiento precoz y predisposición al desarrollo de varios tipos de cáncer (Teraoka y col 1999, Gatei y col 2000, Cuatrecasas y col 2006, Prokopcova y col 2007, Lavin 2008, Bhatti y col 2010).

El ATM es un gen supresor tumoral, que es activado en respuesta a daños en el ADN, que cuando no son reparados pueden llevar a reordenamientos genómicos e inestabilidad en los cromosomas contribuyendo al proceso de tumorigénesis (Bensimon y col 2011). Además, el ATM ejerce un importante papel en el control tumoral, ya que su expresión puede activar el gen TP53 en la interfaz del ciclo celular en el paso S/G1 para que haya corrección del ADN. Otras modificaciones en la cromatina de las células son capaces de activar las proteínas quinasas del ATM y por tanto de esta manera activar el TP53 (Lavin y Khanna 1999, Loehberg y col 2007).

El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión génica del ATM y del TP53 en muestras caninas de tumor venéreo transmisible, con el fin de investigar algunos de los mecanismos posibles involucrados en la implantación de las células tumorales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este experimento fue aprobado por el Comité de Ética CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais-Jaboticabal-SP), protocolo número 011303/11.

Fueron seleccionados 32 perros provenientes de centros de control de zoonosis de Botucatu/SP y Seropédica/RJ, Brasil. Siendo 19 hembras y 13 machos, con media de edad de 4 años (variando entre dos y seis años). De estos, 29 eran sin raza definida (SRD), un American Pit Bull y dos Poodles. Los tumores colectados se localizaban en la vulva o el pene y el diagnóstico primario fue hecho por examen citológico y posterior confirmación por examen histopatológico.

Como grupo control fueron seleccionados 10 perros sanos y fue colectada sangre para la posterior extracción de leucocitos y evaluación de la expresión del mRNA (ARN mensajero). Estos perros tenían edad media de 2,5 años (variando entre dos y tres años), todos eran SRD, siendo seis hembras y cuatro machos. La selección de estos animales fue basándose en el examen clínico y exámenes

complementarios para la confirmación de la sanidad de los animales.

Para la colecta de los fragmentos de TVT los animales fueron sometidos a medicación preanestésica, con el uso de Midazolam en la dosis 0,3 mg/kg asociado a Tramadol en la dosis de 3 mg/kg por vía intramuscular. Después de 15 minutos a estos pacientes se les realizó una punción transcutánea de la vena cefálica con un catéter para fluido terapia con solución fisiológica 0,9% (10 mL/kg/h). La inducción anestésica fue realizada con Propofol en una dosis de 4 mg/kg vía intravenosa. A partir del momento en el que el canino se encontraba en plano anestésico quirúrgico fue realizada la colecta del tumor, sin la necesidad de profundizar el plano anestésico. Con un bisturí fue retirada una porción de 40 mg del tumor, esa porción fue separada posteriormente en dos fragmentos de 20 mg cada uno e inmediatamente estos fragmentos fueron acondicionados en tubos estériles y mantenidos en nitrógeno líquido y finamente almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras del TVT congeladas fueron seccionadas en un criostato (LEICA), mediante cortes de congelamiento secuenciales de 5  $\mu\text{m}$ . La coloración de las láminas fue realizada con hematoxilina y eosina, posteriormente fueron analizadas en un microscopio de luz (LEICA) con la finalidad de verificar la presencia del tumor en las muestras congeladas. Todas estas presentaron 95% de células neoplásicas.

En seguida estas muestras fueron sometidas a un proceso de clivaje mediante tubos con *bids* magnéticos en un Precellys R (BioAmerica Inc, Florida, EUA). Luego, se realizó la extracción del ARN utilizándose el protocolo de TRIZOL® (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante.

Para comparar la expresión de ATM y de TP53 del Telomere Variant Repeat (TVR) con el grupo control, cerca de 5 mL de sangre fueron extraídos de caninos saludables y acondicionados en tubos con anticoagulante EDTA e inmediatamente refrigerados. Los tubos con sangre fueron centrifugados a  $1.000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, en seguida el agregado leucocitario fue aislado y transferido a un nuevo tubo con 1 mL de tampón de lisis de células rojas (RCLB – pH 7,6 1X: 10 mM de Tris; 5 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 10 mM de NaCl) y centrifugado a  $1.800 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta obtener un *pellet* de leucocitos libres de glóbulos rojos. El *pellet* de leucocitos utilizado para la extracción del ARN total fue el kit TRIZOL® (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Después de la extracción de ARN total muestras de ambos grupos fueron incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos, consecutivamente fueron adicionados 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo al tubo y fueron homogenizados por 3 minutos seguidos de 3 minutos de reposo a temperatura ambiente. Seguidamente las muestras fueron centrifugadas a  $12.000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, fueron adicionados 500  $\mu\text{L}$  de alcohol isopropílico y las muestras permanecieron a

temperatura ambiente en reposo durante 10 minutos, luego fueron centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue descartado. El sedimento fue lavado con etanol al 70% y centrifugado a 7.500 x g durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente el exceso de etanol fue retirado mediante secado al vacío y el sedimento resuspendido en agua libre de DNases y RNases.

La concentración y pureza del ARN total fueron evaluadas por espectrofotometría (Nanodrop™ ND-8.000, Thermo Scientific), mientras que la integridad de ARN fue verificada mediante el Bioanalyzer (kit para RNA 6.000 Nano Series – GE). Para eliminar cualquier contaminación de ADN genómico el ARN total extraído fue tratado con DNase I.

La transcripción reversa del ARN para cADN fue realizada con 1 µg de ARN total tratado con DNase I y con la enzima Super-script III™ Reverse Transcriptase enzyme (Invitrogen Life Technologies Inc). En este protocolo se usó 1 µL de oligodT (500 µg/mL), 1 µL de primers iniciadores (100 µg/mL) y 1 µL de dNTP. Esta mezcla fue calentada a 65 °C por 5 minutos y en seguida fueron adicionados 4 µL de tampón de transcripción 5x, 1 µL de DTT 0,1 M y 1 µL de la enzima Super-scrip III (200 U/µL). Luego se realizó una incubación de 5 minutos a 25 °C, seguida de 1 hora y media a 50 °C y finalmente 15 minutos a 70 °C. Al final de la transcripción el cADN fue conservado a -20 °C.

Los primers iniciadores de ATM y de TP53 fueron diseñados con el auxilio del programa Primer-Blast<sup>1</sup>, mientras que los genes de referencia RPS5, RPS19, RPL8, HPRT

fueron obtenidos según las recomendaciones de Brinkhof y col (2006) y ACTB con el *software* Primer Express 2.0 (cuadros 1 y 2).

Las reacciones de qPCR para ATM, TP53 y los genes de referencia fueron realizadas en dos repeticiones por muestra, en placas de 96 pozos para el termociclador StepOne Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems). En cada pozo fueron adicionados 11,5 µL de una solución compuesta por 6,25 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,3 µL de cada primer iniciador (secuencia *foward* y *reverse*) a 10 Mm y 1 µL de cADN (diluida 1:10). Las condiciones de reacción de las amplificaciones de todos los iniciadores fueron 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C y 1 minuto a 60 °C. La curva de disociación fue concluida en todos los experimentos para determinar la especificidad de los productos de PCR. La cuantificación relativa fue calculada por el método de 2-ΔΔCt (Livak y Schmittgen 2001).

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante la evaluación de la normalidad de los datos y se compararon los valores de expresión génica de ATM y TP53 del TVT con el grupo control mediante el test de Mann-Whitney. Todos los análisis fueron hechos en el programa GraphPrisma, considerándose un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS

Los genes de referencia con mayor estabilidad fueron determinados por el *software* GeNorm a partir del grupo con cinco genes (RPS 5, RPS 19, RPL 8, ACTB y HPRT).

En la evaluación de la expresión de transcritos de ATM fue verificado un aumento significativo de su expresión

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

**Cuadro 1.** *Primers* iniciadores para la expresión génica del gen ATM y TP53, diseñados con el auxilio del programa Primer-Blast. Primers for the gene expression of ATM and TP53 gene, designed with the aid of Primer-Blast program.

GEN	PRIMER FOWARD (5'-3')	PRIMER REVERSE (5'-3')
ATM	CTTAGGAGGAGCCTGGGCCTTTG	CACAACACAGGGAAAGCTCCGTA
TP53	GAACGCTGCTCTGACAGTAGTGA	CCCGCAAATTTCCCTTCCA

**Cuadro 2.** Secuencia de los *primers* iniciadores utilizados en el análisis de expresión génica. Estos datos fueron obtenidos según Brinkhof y col (2006) y con el *software* Primer Express 2.0.

Sequence of the primers primers used in the analysis of gene expression. These data were obtained according Brinkhof *et al* (2006) and with the Primer Express 2.0 software.

GEN	PRIMER FOWARD (5'-3')	PRIMER REVERSE (5'-3')
RPS5	TCACTGGTGAGAACCCCT	CCTGATTCACACGGCGTAG
RPS19	CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG	GTTCTCATCGTAGGGAGCAAG
RPL8	CCATGAATCCTGTGGAGC'	GTAGAGGGTTTGCCGATG
ACTB	GGCATCCTGACCCTCAAGTA	CTTCTCCATGTCGTCGCCAGT
HPRT	AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC	TTATAGTCAAGGGCATATCC

en el tejido tumoral (TVT) ( $P < 0,0001$ ) en relación con grupo control (figura 1). En la evaluación de la expresión de transcritos del TP53 no fue confirmada una diferencia estadística ( $P = 0,26$ ) (figura 2).

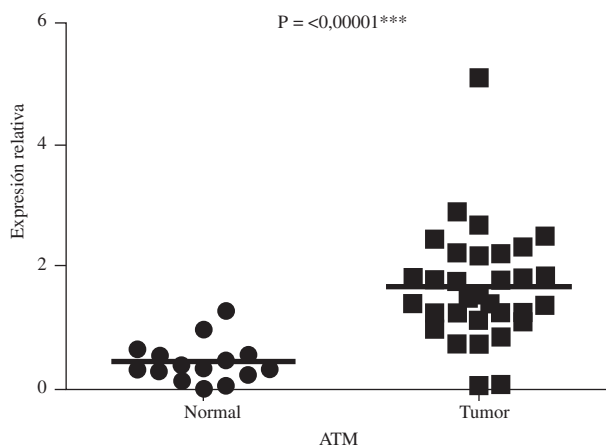
### DISCUSIÓN

A pesar de que el tumor venéreo transmisible (TVT) es considerado una neoplasia maligna por la capacidad de diseminarse para otros órganos, en la mayoría de los casos está asociado a un pronóstico favorable, por la baja tasa de invasión metastásica y de mortalidad sumado a la alta respuesta a los tratamientos quimioterapéuticos (Vásquez-Mota y col 2008, Lapa 2009, Tinucci-Costa 2009, Varughese y col 2012). Estudios recientes por Strakova y col (2014) relatan la presencia de 0,5% de invasión metastásica en perros, y los principales sitios de invasión metastásica en estos pacientes son: ganglios linfáticos, útero, piel, cavidad nasal y bucal. La forma en que ocurre su transmisión, por la implantación directa de las células tumorales diferentes de su hospedero hace que el TVT sea una neoplasia diferenciada, generando una búsqueda continua por la comprensión de los mecanismos carcinogénicos que llevan a su formación y baja malignidad (Marchal y col 1997, Bautista-Gómez y col 2011). Este factor puede ser correlacionado en nuestro estudio con la expresión génica de ATM en las células del TVT, una vez que la baja expresión de esta proteína ya fue correlacionada con metástasis en los nódulos linfáticos de perras afectadas por tumores mamarios (Raposo 2013). En un estudio realizado por Raposo (2013) fue observada la disminución en los niveles de la expresión génica de ATM en carcinomas mamarios metastásicos y no metastásicos al ser comparados con glándulas mamarias normales. Por

tanto, este factor puede estar directamente relacionado al desarrollo del carcinoma mamario y a la evolución metastásica de la enfermedad.

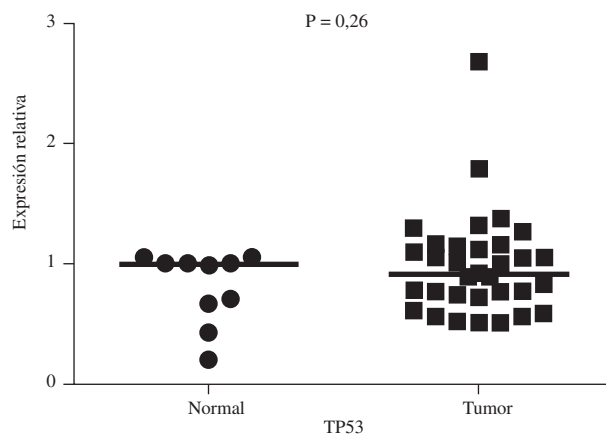
Bueno y col (2013) evaluó 926 muestras de neoplasias mamarias en mujeres, observó que la baja expresión de ATM ocurre en neoplasias de alto grado, así como en la progresión de la enfermedad con invasión metastásica. Otro dato observado fue que las neoplasias que expresaban ATM tenían menor índice de invasión metastásica. Según Cuatrecasas y col (2006), en tumores mamarios en mujeres la baja expresión del ATM estimula tanto la microvascularización como el factor de inducción de hipoxia, estimulando la angiogénesis por medio de la expresión del VEGF, factores importantes de la diseminación de las células neoplásicas a distancia y para el desarrollo de tumores localizados (Ousset y col 2010). En el presente estudio se observó un aumento de la expresión de transcritos de ATM en las muestras caninas de TVT comparado con el grupo control, sugiriendo una asociación de su expresión en el comportamiento menos agresivo de estos tumores.

Era de esperarse que el aumento de transcritos de ATM pudiese estimular los niveles de TP53, lo que no fue observado en este estudio, ya que este último presentó niveles similares en ambos grupos. Según Lavin y Khanna (1999) y Loehberg y col (2007), la alta expresión del ATM, así como las alteraciones en la cromatina celular, pueden activar el gen TP53 y de esta manera interceptar a las células con alteraciones genéticas en la fase S/G1 corrigiendo el error en el ADN y en caso contrario inducir apoptosis. Probablemente, otros mecanismos regulatorios influyen los niveles transcritos de TP53, dentro de ellos el silenciamiento génico o la acción del miARN. Así, la expresión del TP53 no presentó diferencia estadística en



**Figura 1.** Representación gráfica de la mediana del cuantificación relativa (RQ) del ATM  $\pm$  la desviación estándar del marcador en la sangre (control) y en el TVT. Test de Mann-Whitney.

Graphical representation of the median relative quantification (RQ) of ATM  $\pm$  standard deviation of the marker in the blood (control) and in the TVT. Mann-Whitney Test.



**Figura 2.** Representación gráfica de la mediana del cuantificación relativa (RQ) del TP53  $\pm$  la desviación estándar del marcador en la sangre (control) y en el TVT. Test de Mann-Whitney.

Graphical representation of the median relative quantification (RQ) of TP53  $\pm$  standard deviation of the marker in the blood (control) and TVT. Mann-Whitney Test.

relación con el grupo control, este hecho también fue descrito por Moro y col (2010).

En TVT trasplantados en fase de regresión espontánea, las células tumorales presentan bajos índices de marcación inmune de P53, lo que puede sugerir que el P53 está activo y promoviendo apoptosis celular y por este motivo ocurre la regresión del tumor (Moro y col 2010).

Otro factor a considerar es que en TVTs de origen natural la marcación inmune proteica para P53 fue pobre, sugiriendo que esta proteína no participa directamente en el control de esta neoplasia (Moro y col 2010). Esta no expresión proteica puede ser correlacionada al silenciamiento genético del TP53 observado en nuestro estudio.

En otros tumores mamarios en perras, la marcación inmune del P53 se evidencia siempre en neoplasias con características metastásicas (Bertagnolli y col 2009). Lopes y col (2010) relataron baja inmunorreactividad en neoplasias mioepiteliales mamarias y constantes mutaciones en el gen TP53 en adenocarcinomas mamarios en humanos. Así como Lopes y col (2010), Terra (2010), observaron mayor marcación inmune de P53 en neoplasias mamarias malignas al ser comparados con un grupo de neoplasias benignas. Esos hallazgos corroboran el potencial maligno de neoplasias que acumulan la forma mutante de la proteína P53 y difieren de los resultados observados en nuestro estudio, donde los niveles de TP53 se mantuvieron dentro de la normalidad, garantizando la acción de este gen supresor tumoral.

Se concluye que la baja tasa de diseminación a distancia del TVT puede estar relacionada al aumento en la expresión del ATM, así como a la expresión normal del TP53 en las células tumorales del TVT, ambos genes podrían vincularse a la baja progresión tumoral.

## REFERENCIAS

- Bautista-Gómez LG, S Martínez-Castañeda, E Córdova-Alarcón, JC Vázquez-Chagoyán. 2011. Analysis of canine transmissible venereal tumor genotypes using the D-loop region of mitochondrial DNA. *Genes Genet Syst* 86, 351-355.
- Bensimon A, R Aebersold, Y Shiloh. 2011. Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. *FEBS Lett* 585, 1625-1639.
- Bertagnolli AC, GD Cassali, MCLS Genelhu, FA Costa, J FC Oliveira, PBD Gonçalves. 2009. Immunohistochemical expression of p63 and  $\Delta Np63$  in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. *Vet Pathol* 46, 407-415.
- Bhatti S, S Kozlov, AA Farooqi, A Nagi, M Lavin, KK Khanna. 2010. ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. *Cell Mol Life Sci* 68, 2977-3006.
- Bueno CR, RA Canevan, RAR Villacis, MAC Domingues, JRF Caldeira, RM Rocha, SA Drigo, SR Rogatto. 2013. ATM down-regulation is associated with poor prognosis in sporadic breast carcinomas. *Ann Oncol* 25, 69-75.
- Cuatrecasas M, G Santamaría, M Velasco, E Camacho, L Hernández, M Sánchez, C Orrit, C Murcia, A Cardesa, E Campo, P Fernández. 2006. ATM gene expression is associated with differentiation and angiogenesis in infiltrating breast carcinomas. *Histol Histopathol* 21, 149-156.
- Das U, AD Kumar. 2000. Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Vet Res Commun* 24, 545-556.
- Gatei M, SP Scott, I Filippovitch, N Soronika, MF Lavin, B Weber, KK Khanna. 2000. Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA11. *Cancer Res* 60, 3299-3304.
- Lapa FAS. 2009. Estudo comparativo da eficácia de dois protocolos de tratamento de tumor venéreo transmissível em cães. *Dissertação de Mestrado*. Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, Brasil.
- Lavin MF, KK Khanna. 1999. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol* 75, 1201-1214.
- Lavin MF. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signaling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 759-769.
- Livack KJ, TD Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Loehberg CR, T Thompson, MB Kastan. KH Maclean, DG Edwards, FS Kittrell, D Medina, OM Conneely, BW O'Malley. 2007. Ataxia telangiectasia-mutated and p53 are potential mediators of Chloroquine-induced resistance to mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 67, 12026-12033.
- Lopes RA, TC Cardoso, MCR Luvizotto, AL Andrade. 2010. Occurrence and expression of p53 suppressor gene and c-Myc oncogene in dog eyelid tumors. *Vet Ophthalmol* 13, 69-75.
- Marchal T, L Chabanne, C Kaplanski, D Rigal, J Mangol. 1997. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumor. *Vet Immunol Immunopathol* 57, 1-11.
- Moro JV, M Tinucci-Costa, ACT Silveira, DC Gerardi, AC Alessi. 2010. Reatividade da proteína P 53 no tumor venéreo transmissível. *Arqu Bras Med Vet Zoot* 62, 318-323.
- Murchison EP, C David, DC Wedge, LB Alexandrov, B Fu, I Martincorena, Z Ning, JM Tubio, I Werner, J Allen, ABD Nardi, EM Donelan, G Marino, A Fassati, PJF Campbell, F Yang, A Burt, RA Weiss, MR Stratton. 2014. Transmissible dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. *Science* 24, 437-440.
- Oduye OO, BO Ikede, GO Esuruoso, JU Akpokodje. 1973. Metastatic transmissible venereal tumour in dogs. *J Small Anim Pract* 14, 625-637.
- Ousset M, F Bouquet, F Fallone, D Biard, C Dray, P Valet, B Salles, C Muller. 2010. Loss of ATM positively regulates the expression of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) through oxidative stress: Role in the physiopathology of the disease. *Cell Cycle* 9, 2814-2822.
- Park MS, Y Kim, M Kang, S Oh, D Cho, N Shin, D Kim. 2006. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. *J Vet Diagn Invest* 18, 130-133.
- Prokopcova J, Z Kleibl, CM Banwell, P Pohlreich. 2007. The role of ATM in breast cancer development. *Breast Cancer Res Treat* 104, 121-128.
- Rebeck CA, R Thomas, M Breen, AM Leroi, A Burt. 2009. Origins and evolution of a transmissible cancer. *Evolution* 63, 2340-2349.
- Rogers KS, MA Walker, HB Dillon. 1998. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 34, 463-470.
- Strakova A, EP Murchinson. 2014. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. *BMC Vet Res* 10, 168.
- Teraoka SN, M Telatar, S Becker-Catania, T Liang, S Onengut, A Tolun, L Chessa, O Sanal, E Bernatowska, RA Gatti, P Concannon. 1999. Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet* 64, 1617-1631.
- Terra EM. 2010. TGF $\beta$ , pSmad2, p53, p63, E-caderina e Vimentina como marcadores prognósticos em tumores espontâneos de mama de cadelas. *Dissertação de Mestrado*, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.
- Tinucci-Costa M. 2009. Tumor venéreo transmissível canino. In: Daleck CR, De Nardi AB, Rodaski S (eds). *Oncologia em Cães e Gatos*. 1ª ed. Roca, São Paulo, Brasil, Pp 540-551.
- Varughese EE, VK Singla, U Ratnakaran, VK Gandotra. 2012. Successful management of metastatic transmissible venereal tumour to skin of mammary region. *Reprod Domest Anim* 47, 366-369.
- Vásquez-Mota N, J Simón-Martinez, E Córdova-Alarcón, L Lagunes, R Fajardo. 2008. The T963C mutation of TP53 gene does not participate in the clonal origin of canine TVT. *Vet Res Commun* 32, 187-191.

