

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, ÊNFASE EM BIOLOGIA
MARINHA E COSTEIRA**

BEATRIZ CRISTINE MÜLLER

CÂNCER EM MAMÍFEROS MARINHOS:

investigando genes relacionados ao linfoma em lobos-marinhos-sul-americanos

(*Arctocephalus australis* Zimmermann, 1783)

IMBÉ

2024

BEATRIZ CRISTINE MÜLLER

CÂNCER EM MAMÍFEROS MARINHOS:

investigando genes relacionados ao linfoma em lobos-marinhos-sul-americanos
(*Arctocephalus australis* Zimmermann, 1783)

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Marinha e Costeira, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, convênio Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rossana Colla Soletti

Coorientador: Prof. Dr. Enéas Ricardo Konzen

IMBÉ
2024

CIP - Catalogação na Publicação

Müller, Beatriz Cristine

Câncer em mamíferos marinhos: investigando genes relacionados ao linfoma em lobos-marinhos-sul-americanos (*Arctocephalus australis* Zimmermann, 1783) / Beatriz Cristine Müller. -- 2024. 58 f.

Orientadora: Rossana Colla Soletti.

Coorientador: Enéas Ricardo Konzen.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Ciências Biológicas: Biologia Marinha e Costeira, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Câncer. 2. Mamíferos marinhos. 3. Pinípedes. 4. Linfoma. 5. Oncogenética. I. Colla Soletti, Rossana, orient. II. Konzen, Enéas Ricardo, coorient. III. Título.

BEATRIZ CRISTINE MÜLLER

CÂNCER EM MAMÍFEROS MARINHOS:

investigando genes relacionados ao linfoma em lobos-marinhos-sul-americanos
(*Arctocephalus australis* Zimmermann, 1783)

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Marinha e Costeira, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, convênio Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rossana Colla Soletti

Coorientador: Prof. Dr. Enéas Ricardo Konzen

Aprovada em: 06/02/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Fernanda Sperb-Ludwig
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rafael Real Guerra
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a Dr^a Camila Both
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fábio Lameiro Rodrigues
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho dependeu da colaboração de diversas partes. Agradeço ao laboratório BRAIN do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), ao Laboratório de Biologia Molecular do HCPA e ao Laboratório de Genomas e Populações de Plantas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo apoio com o empréstimo de equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho. Também agradeço ao Laboratório de Microbiologia da FEEVALE e ao setor de Patologia Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS pelas amostras tumorais gentilmente cedidas.

Agradeço ao Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CERAM) e ao Museu de Ciências Naturais (MUCIN) da UFRGS pela imensa colaboração com a aquisição das amostras biológicas. Em especial, agradeço ao veterinário Derek Blaese de Amorim pelo imenso auxílio e paciência com o desenvolvimento do trabalho e com a obtenção das amostras tumorais e não-tumorais, e ao biólogo Maurício Tavares Nunes pela disposição e auxílio com os monitoramentos de praia e dados das amostras.

Porém, nada do que foi feito teria sido possível sem o apoio das duas pessoas incríveis que escolhi como orientadores. A conclusão deste trabalho é um mero resumo representativo de uma longa trajetória, que se inicia com a prof. Dra. Rossana Soletti, minha orientadora e mãe científica. Agradeço por ter sido a grande mulher inspiradora que me despertou a paixão pela produção da ciência. Seu apoio foi a base fundadora de conquistas e mudanças muito além da academia. Obrigada por ter acreditado em meu potencial desde o início; sem você, nada do que fiz e ainda farei seria possível.

Ao meu orientador Dr. Enéas Konzen, agradeço pelas longas tardes de companhia no laboratório em pleno auge do verão. Sua dedicação e amor incondicional à ciência são inspirações que carregarei para sempre comigo (e são dignas de um membro de Corvinal). Ao ter visto potencial em mim, você me fez acreditar em mim mesma também, e nada do que desenvolvi teria sido possível sem sua paciência em ensinar. Onde quer que o futuro me leve, saiba que foi também resultado do seu impulso. Obrigada por ter sido um orientador em todos os sentidos da palavra.

Agradeço também a todos os professores que se desempenham arduamente para produzir conhecimento científico e ensino no CECLIMAR. O trabalho que vocês desempenham é inspirador e foi marcante no decorrer de minha trajetória acadêmica. Em especial, agradeço ao prof. Dr. Rafael Guerra, que foi peça fundamental nos meus conhecimentos de Biologia Molecular e planejamento de carreira.

Aos inúmeros amigos que encontrei no decorrer da graduação, agradeço por melhorarem toda essa longa experiência. Agradeço especialmente a Thaísa Deichel, que foi a pessoa que me fez sentir acolhida na Biomar desde o primeiro dia; obrigada por ter dividido tantos momentos especiais comigo. Agradeço também Juliana Stein, que foi minha dupla em tantos anos de graduação. Bruna Bordignon Vian, agradeço pelo apoio crucial para minha formação, especialmente como inspiração e motivação para não temer desafios. Por fim, agradeço ao meu gato Jordinha por ter sido um grande melhor amigo nesta jornada.

Ao Dr. David Tarin, agradeço por ter disponibilizado material de ensino para que eu pudesse aprender mais sobre a temática do câncer. Sua disposição, humildade e vontade de ajudar revigoraram minha fé na humanidade.

Aos meus pais Alfredo e Marlise, agradeço por terem acreditado no meu potencial, me apoiado e me incentivado a buscar o estudo desde a infância. Nada do que conquistei teria sido possível sem vocês. Também agradeço minhas irmãs, Kátia e Margith e suas respectivas famílias por terem sido conforto, companhia e inspiração.

Por fim, agradeço ao meu amor, Giuliano, por ter sido a pessoa que mais me incentivou a perseguir sonhos grandes. Obrigada por sempre ter me dado o cafezinho que eu precisava para continuar estudando. Sua presença e seu apoio foram o diferencial nessa jornada. Tudo que conquistei, conquistamos juntos.

RESUMO

Os lobos-marinhos (família Otariidae, subfamília *Arctocephalinae*) são um dos exemplos de animais que raramente desenvolvem câncer, com poucas indicações sobre incidência da doença na literatura. Recentemente, foi descrito o primeiro caso de linfoma linfocítico de pequenas células B (SLL) em um lobo-marinho da espécie *Arctocephalus australis* encalhado no município de Xangri-lá (RS). Devido à raridade dos casos de câncer em lobos-marinhos, é possível que as células tumorais destes indivíduos possuam mutações em genes relacionados à resistência ao câncer, que não são encontradas em células não tumorais da mesma espécie ou de espécies relacionadas. Para avaliar possíveis alterações genéticas envolvidas na formação e resistência a tumores em *A. australis*, foram escolhidos os genes *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1*, envolvidos com a formação de SLL em outras espécies animais. A construção de árvores filogenéticas e a análise de motivos proteicos conservados foram adotados como estratégias para compreensão da variação gênica e indicadores de possíveis sítios onde mutações poderiam causar danos funcionais às proteínas avaliadas. Foram testados diferentes métodos de extração de DNA a partir de amostras armazenadas a -20 °C e em bloco de parafina (FFPE). Como o genoma da espécie não é disponibilizado em bancos de dados online, *primers* cobrindo regiões gênicas de interesse foram desenhados com base em espécies filogeneticamente próximas, e sua amplificação foi testada com PCR. A filogenia dos genes analisados revelou padrões distintos de evolução de *TP53* dentro da superfamília Pinnipedia e uma alta conservação de *SF3B1* entre membros da ordem Carnivora. A avaliação de motivos proteicos mostrou importantes sítios conservados entre diferentes carnívoros, além de sítios exclusivos para algumas espécies. A amplificação dos *primers* desenhados foi desigual entre diferentes espécies de pinípedes, com dois pares de *primers* (*TP53-3* e *SF3B1*) mostrando resultado positivo para amostras não tumorais de *A. australis* e um (*TP53-1*) para *Lobodon carcinophaga*. Esses resultados corroboram a hipótese de que a evolução desses genes dentro de Pinnipedia não segue a filogenia taxonômica, e mutações podem estar presentes em *A. australis*. Como perspectivas futuras, novos estudos utilizando amostras tumorais mais adequadas para extração de DNA são necessários.

Palavras-chave: Pinípedes. Câncer. *TP53*. *NOTCH1*. *SF3B1*.

ABSTRACT

Fur seals (family Otariidae, subfamily Arctocephalinae) are an example of animal species that rarely develop cancer, with few reports of the disease in literature. Recently, an unusual case of small lymphocytic B-cell lymphoma (SLL) affecting a South American fur seal (*Arctocephalus australis*) stranded in Xangri-lá (RS) was described. Due to the rarity of cancer incidence in fur seals, it is likely that tumoral cells from these individuals carry mutations in cancer resistance related genes not seen in normal cell lineages from the same or related species. The genes *TP53*, *NOTCH1* and *SF3B1*, related to SLL in other animal species, were chosen to evaluate possible genetic aberrations involved in tumor growth and resistance in *A. australis*. Phylogenetic tree building and conserved protein motifs analysis were used as strategies to comprehend genic variation and indicate possible mutational hotspots. Different DNA extraction methods were evaluated for biological samples either stored at -20 °C or formalin fixed paraffin embedded (FFPE) were evaluated. Since the genome of the target species is not available in online databases, primers covering genic regions of interest were designed based on the genome of phylogenetically close species, and their amplification was tested in PCR. The phylogenetic analysis of the genes revealed distinct patterns of evolution for *TP53* inside the superfamily Pinnipedia and a strong conservation of *SF3B1* between the members of the order Carnivora. Motif analysis showed important conserved sites between different carnivores, besides exclusive sites for some species. The amplification of the primers designed was uneven between different pinnipeds, with two primers (TP53-3 and SF3B1) exhibiting positive results for non-tumoral samples of *A. australis* and one (TP53-1) for *Lobodon carcinophaga*. These results corroborate the hypothesis that the evolution of these genes is differential between pinnipeds, and mutations may be present in *A. australis*. For future perspectives, new studies using tumoral samples more suitable for DNA extraction are necessary.

Keywords: Pinnipeds. Cancer. *TP53*. *NOTCH1*. *SF3B1*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B-SLL - Linfoma linfocítico de pequenas células B

CERAM - Centro de Reabilitação de Animais Marinhos e Costeiros

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

FFPE - Formalin fixed paraffin embedded tissue (Tecido fixado em formalina e embebido em parafina)

LH - Linfomas de Hodgkin

LLC - Leucemia linfocítica crônica

LNH - Linfomas não-Hodgkin

MUCIN - Museu de Ciências Naturais

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

snRNPs - *Small nuclear ribonucleoproteins; ribonucleoproteínas nucleares pequenas*

SF3B1 - *Splicing factor 3b subunit 1*; Gene que codifica a proteína SF3B1

TP53 - *Tumor protein p53*; Gene que codifica a proteína p53

p53 - Proteína codificada pelo gene *TP53*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA MOLECULAR.....	18
3.2 DESCOBERTA DE MOTIVOS PROTEICOS.....	19
3.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	19
3.4 EXTRAÇÕES DE DNA.....	21
3.4.1 Tecidos não-tumorais.....	21
3.4.2 Tecido tumoral FFPE.....	22
3.4.2.1 Extração com base em xilol.....	22
3.4.2.2 Extração com base em óleo mineral.....	23
3.4.2.3 Extração por micro-ondas.....	23
3.5 VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DAS EXTRAÇÕES DE DNA.....	24
3.6 BUSCA DE SEQUÊNCIAS E DESENHO DE PRIMERS.....	25
3.7 REAÇÕES DE PCR.....	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 FILOGENIA MOLECULAR DOS GENES AVALIADOS.....	28
4.2 MOTIVOS PROTEICOS CONSERVADOS.....	31
4.2.1 Motivos de TP53.....	31
4.2.2 Motivos de NOTCH1.....	33
4.2.3 Motivos de SF3B1.....	33
4.3 QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA.....	34
4.4 AMPLIFICAÇÃO DOS PRIMERS GENE-ESPECÍFICOS.....	36
5 DISCUSSÃO.....	39
5.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	39
5.2 ANÁLISE DE MOTIVOS PROTEICOS.....	40
5.3 AMPLIFICAÇÃO DOS PRIMERS.....	42
6 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICE A - Script no R para produção de árvore filogenética.....	51
APÊNDICE B - Script no R para confecção de mapa.....	53
APÊNDICE C - Códigos das espécies utilizadas neste trabalho.....	55

1 INTRODUÇÃO

O que denominamos genericamente como “câncer” se refere, na realidade, a um conjunto de doenças com o denominador comum de serem causadas por alterações no DNA e caracterizadas pela proliferação celular anormal, capaz de originar metástases (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; TARIN, 2023). De acordo com a agência governamental americana *National Center for Health Statistics*, o câncer é considerado a segunda maior causa de mortes entre seres humanos nos Estados Unidos (XU et al., 2022). Longe de ser uma exclusividade humana, a doença assombra a existência dos mais variados grupos de animais, representando, inclusive, uma problemática para a conservação de algumas espécies (MCALOOSE; NEWTON, 2009). A habilidade de desenvolver tumores é uma propriedade intrínseca a todos os organismos multicelulares: virtualmente, todo e qualquer organismo multicelular que viva por tempo o suficiente poderia desenvolver câncer em algum estágio de sua vida. Porém, na prática, diferentes espécies apresentam diferentes taxas de formação de tumores, com espécies desenvolvendo tumores com frequência como os membros da ordem Dasyuromorphia, até o caso das espécies vegetais, que raramente desenvolvem a doença (DOONAN; SABLowski, 2010; VINCZE et al., 2022).

O advento do câncer em um organismo depende diretamente do surgimento de mutações no DNA das células afetadas, o que pode ocorrer a cada ciclo de divisão celular, a partir de erros de replicação. Logo, seria passível de se esperar que organismos maiores (com mais células) e com maior expectativa de vida (com mais eventos de replicação celular) estivessem mais suscetíveis à incidência da doença do que organismos menores e de vida curta. Contudo, essa correlação não é observada na natureza. Essa contradição é conhecida na ciência como Paradoxo de Peto, estipulado em 1977 pelo epidemiologista Richard Peto (*apud* CALLIER, 2019). A quebra no padrão de incidência esperada de câncer sugere que algumas espécies devem possuir mecanismos que evitem o surgimento da doença, especialmente animais que possuem maior tamanho corporal e vida longa e, portanto, intuitivamente estariam mais suscetíveis à formação de tumores.

Atualmente, sabemos que diversas espécies possuem aparatos moleculares utilizados na prevenção ao câncer. Os elefantes (*Loxodonta* sp. e *Elephas* sp.), que são os maiores animais terrestres da atualidade, possuem em seus genomas cópias

extras do gene supressor de tumor *TP53*, reduzindo drasticamente a incidência da doença na espécie (ABEGGLEN et al., 2015; SULAK et al., 2016). Já a baleia-da-Groenlândia (*Balaena mysticetus* Linnaeus, 1758), uma espécie que combina um dos maiores tamanhos corporais do mundo com uma expectativa de vida de surpreendentes 200 anos, dribla o câncer através de mutações em genes relacionados ao envelhecimento e à formação de tumores (KEANE et al., 2015). Outros animais utilizam mecanismos celulares como defesa anticâncer, como é o caso do rato-toupeira-pelado (*Heterocephalus glaber* Rüppell, 1942), um roedor com expectativa de vida de até 32 anos que exibe taxas muito baixas de formação de câncer graças a um mecanismo de inibição do contato celular. Quando as células desse animal atingem determinada densidade e entram em contato umas com as outras, um aparato que pausa o ciclo celular é ativado, impedindo a proliferação celular desordenada que é tipicamente relacionada com a formação de tumores (SELUANOV et al., 2009). Esses mecanismos (e a ausência deles) justificam as grandes diferenças nas taxas de câncer observadas entre diferentes grupos de animais.

Os lobos-marinhos (família Otariidae, subfamília *Arctocephalinae*) são um dos exemplos de animais com poucas indicações de incidência de câncer na literatura (DAGLEISH et al., 2013; DE AMORIM et al., 2023; LEAL, 2016; NEWMAN; SMITH, 2006; REISFELD et al., 2022) apesar de pertencerem à ordem Carnivora, que possui o maior risco de mortalidade por câncer na natureza (VINCZE et al., 2022). Contudo, o cenário é diferente para outros membros da família Otariidae, como *Zalophus californianus* Lesson, 1828, o leão-marinho-da-Califórnia (família Otariidae, subfamília *Otariinae*). Uma população dessa espécie da costa oeste dos Estados Unidos é conhecida por apresentar altos índices de carcinoma urogenital, com uma média de 26% dos adultos examinados *post mortem* apresentando a doença nas últimas décadas (BROWNING et al., 2015). As principais causas apontadas para a formação dos tumores nesses animais envolvem a associação de predisposição genética, exposição a contaminantes como os organoclorados e, principalmente, infecções pelo Otarine herpesvirus-1 (OTH-1) (BROWNING et al., 2014; GULLAND et al., 2020; YLITALO et al., 2005).

No litoral do Rio Grande do Sul, já foram registrados lobos-marinhos das espécies *Arctocephalus tropicalis* Gray, 1872, *Arctocephalus gazella* Peters, 1875 e *Arctocephalus australis* Zimmerman 1783, sendo a última a espécie com mais

encalhes registrados na região (TAVARES, 2021). A espécie possui distribuição geográfica contornando toda a região sul da América do Sul, com limite norte do Oceano Pacífico localizado na Isla Foca, no Peru, e limite norte do Oceano Atlântico localizado tipicamente na Ilha dos Lobos, em Torres (RS, Brasil) (CRESPO et al., 2015). Porém, duas populações distintas de *A. australis*, com diferenças genéticas e morfológicas entre si, ocorrem nesse território: uma peruana e uma uruguaia. Como a espécie não possui colônias reprodutivas no Brasil, os indivíduos observados no estado do Rio Grande do Sul são oriundos de colônias reprodutivas no Uruguai, pertencendo à população uruguaia e usando a costa brasileira apenas como área de descanso após o período reprodutivo (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Embora *A. australis* esteja classificada como “Pouco Preocupante” na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza (CARDENAS; OLIVEIRA; CRESPO, 2016), esses animais ocupam diferentes territórios abarcando legislações distintas, desafiando a adoção de práticas preservacionistas que poderiam ser necessárias no caso do surgimento de novas ameaças à integridade das populações. Ademais, sendo um mamífero marinho, a espécie compartilha fontes alimentares com humanos, possui capacidade de bioacumulação e utiliza habitats sujeitos à interferência humana, sendo viável seu uso como uma espécie sentinela (BOSSART, 2011).

A espécie habita áreas costeiras, mantendo proximidade com possíveis fontes antrópicas de contaminantes persistentes e emergentes, capazes de causar danos ao DNA que poderiam levar ao surgimento do câncer. Além disso, *A. australis* é um predador carnívoro generalista de topo de cadeia (NAYA; ARIM; VARGAS, 2002), maximizando a possibilidade de bioacumulação de poluentes. Adicionando à problemática, a espécie possui uma extensa camada de gordura corporal (*blubber*) utilizada como mecanismo de proteção térmica, como é característico em mamíferos marinhos. Porém, diversos poluentes, como os compostos organoclorados, possuem alta solubilidade em lipídios, transformando o *blubber* em um reservatório corporal para esses compostos (FILLMANN et al., 2007). Todos esses fatores poderiam contribuir para a formação de tumores na espécie. Portanto, o baixo número de relatos de ocorrência de câncer em *A. australis* é um indicativo de duas possibilidades: i) mecanismos moleculares de reparo ao dano celular e prevenção ao câncer são presentes na espécie; ou ii) as baixas taxas de câncer são resultado meramente de uma baixa notificação dos casos que acometem os indivíduos. Como

nenhum dos estudos que avaliam as principais *causa mortis* no gênero *Arctocephalus* relatam cânceres na espécie, a segunda possibilidade oferecida não parece a mais plausível (DE AMORIM, 2014; DUARTE-BENVENUTO et al., 2021; SEGUEL et al., 2011)

Recentemente, foi descrito o primeiro caso de câncer em um lobo-marinho da espécie *Arctocephalus australis*, em um indivíduo encalhado no município de Xangri-lá (RS) e resgatado pelo Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CERAM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (DE AMORIM et al., 2023). O indivíduo era um macho adulto de vida livre com idade entre 8 e 9 anos, que veio a óbito logo após o resgate. A necropsia do animal revelou achados como empalidecimento de membranas mucosas, redução do *blubber*, esplenomegalia, linfonodomegalia e nódulos no baço e intestino delgado, que, juntamente com a análise histopatológica, são compatíveis com o diagnóstico de linfoma linfocítico de pequenas células B. A análise de viroma não gerou resultados que corroboram o papel de agentes virais na formação tumoral. Assim, é possível que o indivíduo com a doença possua mutações em genes relacionados à resistência ao câncer, não encontradas em indivíduos saudáveis.

Os linfomas são um grupo de neoplasias hematológicas malignas relacionadas com o sistema linfóide. Essas neoplasias podem ser agrupadas em linfomas de Hodgkin (LH), que tendem a ser mais agressivos, e linfomas não-Hodgkin (LNH). Por sua vez, os LH podem ser subdivididos em forma clássica e não-clássica, enquanto os LNH se dividem em células B e células T e NK. Dentro desses compartimentos mais amplos, mais de 80 tipos de linfomas são classificados conforme suas características morfológicas, moleculares, clínicas e célula de origem (CHESON, 2004).

O indivíduo de *A. australis* encontrado no litoral do Rio Grande do Sul foi acometido com um linfoma não-Hodgkin de células B classificado como B-SLL (DE AMORIM et al., 2023). Essa categoria de linfoma ocorre como resultado do acúmulo de linfócitos B monoclonais na medula óssea, sangue periférico e tecidos linfáticos. Conforme a Organização Mundial da Saúde, o B-SLL é classificado juntamente com a leucemia linfocítica crônica (LLC) como uma mesma entidade,. Assim, apesar de as manifestações clínicas diferirem entre a LLC e o SLL, ambos são tratados como a mesma doença (YOUNES; COIFFIER, 2013).

O indivíduo foi o primeiro caso de linfoma registrado em literatura para o gênero *Arctocephalus* (DE AMORIM et al., 2023). Dada a proximidade filogenética entre *A. australis* e *Z. californianus*, é possível que os mesmos fatores que influenciam a tumorigênese do leão-marinho-da-Califórnia possam ser aplicados para a espécie da América do Sul. Assim, caso haja mutações em genes relacionados à tumorigênese, ou mesmo a predisposição para formação de tumores em *A. australis* quando em contato com esses fatores ambientais, a espécie pode seguir o infeliz caminho de seus familiares do gênero *Zalophus*. Desse modo, elucidar os mecanismos genéticos que podem estar envolvidos na formação e resistência a tumores em *A. australis* pode ser de grande relevância para a conservação da espécie. É necessário avaliar se a baixa taxa de incidência de câncer na literatura da espécie se dá por fatores genéticos de resistência, ausência de fatores ambientais estimulantes ou pela baixa notificação dos casos, para, assim, planejarmos medidas efetivas de prevenção dessa doença na espécie. Além disso, muito além da biologia animal, o estudo dos mecanismos relacionados ao câncer nas mais variadas espécies é fundamental para a compreensão da tumorigênese na própria espécie humana, auxiliando, inclusive, no desenvolvimento de terapias (CALLIER, 2019).

A regulação genética da formação de tumores é feita através de duas categorias de genes: i) os oncogenes, que atuam estimulando a formação do tumor através da produção de proteínas que promovem o crescimento celular desordenado; e ii) genes supressores de tumor, que atuam no caminho inverso, freando o crescimento células defeituosas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Na LLC/SLL em humanos, mutações observadas incluem os genes *IGVH*, *NOTCH1*, *TP53*, *BIRC3*, *SF3B1*, *ATM* e *MYD88* (SANTOS; O'BRIEN, 2012; TEES; FLINN, 2017).

Para avaliar possíveis alterações genéticas envolvidas na formação e resistência a tumores em *A. australis*, foram escolhidos os genes *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1*. Devido à falta de dados relacionados à genética da formação de linfomas em pinípedes, a escolha dos genes levou em conta sua contribuição na formação de linfomas linfocíticos de pequenas células B em outras espécies com literatura mais robusta, especialmente em humanos. Uma vez que a formação de tumores envolve vias bioquímicas basais relacionadas principalmente à proliferação celular, a conservação interespecífica de alterações em genes relacionados à tumorigênese é

vastamente observada na natureza, inclusive em linfomas acometendo diferentes espécies animais (SCHIFFMAN; BREEN, 2015). Desse modo, a conservação do papel desses genes entre pinípedes e outros mamíferos foi presumida.

TP53 é um dos genes supressores de tumor mais estudados no meio científico. A via do *TP53* é ativada em resposta a uma série de estresses celulares relacionados com dano ao DNA, como radiação, exposição a drogas genotóxicas e desnutrição. A proteína p53 é um fator de transcrição que regula uma série de genes relacionados com a apoptose, senescência celular e parada do ciclo celular. Desse modo, a p53 atua de forma a eliminar células defeituosas, que poderiam dar origem a tumores, ou freando a divisão celular enquanto o defeito é reparado (SULAK et al., 2016). Mutações nesse gene são encontradas na maioria dos cânceres em humanos e, quando ocorrem, inibem diversas proteínas incluindo a p53 selvagem, causando transformações celulares e colaborando para a metástase de tumores (GOH; COFFILL; LANE, 2011). Humanos possuem apenas uma cópia de *TP53*, e a ausência de um dos alelos dessa cópia causa a chamada Síndrome de Li-Fraumeni, que ocasiona um risco de desenvolvimento de câncer de 70% para homens e quase 100% para mulheres (CHOMPRET et al., 2000). A adoção de mais cópias de *TP53* é um dos mecanismos utilizados por algumas espécies para driblar o câncer (ABEGGLEN et al., 2015; SULAK et al., 2016). Em *Zalophus californianus*, *TP53* é localizado no cromossomo 16.

NOTCH1 é um dos membros da família NOTCH, que abriga genes que codificam produtos que atuam tanto como receptores de membrana quanto como reguladores da transcrição, e que, assim, são capazes de atuar como proto-oncogenes. Na leucemia linfocítica crônica, mutações em *NOTCH1* frequentemente resultam em ativação constitutiva da via de sinalização celular de *NOTCH1*, convertendo seu papel a um oncogene. Desse modo, alterações em *NOTCH1* são relacionadas à resistência à apoptose e maior sobrevivência celular, possibilitando ou facilitando o desenvolvimento tumoral (ARRUGA et al., 2014; GIANFELICI, 2012). Na grande maioria dos casos de leucemia linfocítica crônica em humanos, as mutações ocorrem apenas no éxon 34 e resultam em uma proteína com ausência do domínio C-terminal PEST, influenciando a degradação proteica (GIANFELICI, 2012). A ativação de *NOTCH1* também é maior em linfonodos do que em outros tecidos (ARRUGA et al., 2014). Em *Zalophus californianus*, *NOTCH1* é localizado no cromossomo 13.

SF3B1 é um gene que codifica produtos envolvidos na remoção de íntrons do RNA mensageiro, sendo uma parte essencial do snRNP do tipo U2 codificado que faz parte do spliceossomo, atuando na formação do *branching point* durante o *splicing* (CILLONI et al., 2022). Mutações em *SF3B1* são comuns em muitos tipos de câncer, incluindo alguns subtipos de leucemia linfocítica em humanos, e são associadas com prognósticos mais graves (ZHOU et al., 2020). Essas mutações usualmente ocorrem em regiões extremamente bem conservadas entre diferentes filos, evidenciando, novamente, o potencial de estudo das mesmas mutações em espécies variadas (WAN; WU, 2013). Em *Zalophus californianus*, *SF3B1* é localizado no cromossomo 3.

Nesse contexto, o trabalho desenvolvido buscou fundamentar bases para o futuro estudo de mutações nucleotídicas possivelmente envolvidas na formação de tumores em *Arctocephalus australis*, através de duas estratégias iniciais: (i) análise *in silico* de sequências destes genes em espécies relacionadas, para verificar possíveis mutações mais comuns; e (ii) identificação de potenciais marcadores moleculares específicos através do sequenciamento de segmentos dos genes *TP53*, *SF3B1* e *NOTCH1* em amostras de linfonodos tumorais de *Arctocephalus australis* e sua comparação com o DNA de tecidos não tumorais. Espera-se, com isso, ampliar o entendimento do processo de tumorigênese em *A. australis*.

2 OBJETIVOS

Os objetivos fundamentais norteadores do presente trabalho são apresentados a seguir.

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o sequenciamento de segmentos dos genes *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1* em amostras tumorais e não tumorais de indivíduos de *Arctocephalus australis*, buscando a identificação de marcadores moleculares indicativos de predisposição ao câncer.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Padronizar a extração de DNA a partir de amostras de linfonodo de *Arctocephalus australis* congeladas;
- b. Padronizar a extração de DNA a partir de amostras de linfonodo tumoral de *Arctocephalus australis* fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE);
- c. Desenhar *primers* para os genes *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1* com base em sequências dos mesmos genes em espécies filogeneticamente próximas disponíveis em bancos de dados online;
- d. Analisar a filogenia e motivos proteicos conservados nos genes *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1* entre espécies da ordem Carnivora;
- e. Sequenciar segmentos ou a totalidade da extensão dos genes *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1* identificados e avaliar possíveis mutações nestes genes através da comparação entre os genes sequenciados em amostras tumorais e não tumorais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA MOLECULAR

A abordagem de avaliação de mutações em espécies com genoma desconhecido depende diretamente do uso de informações genéticas de espécies filogeneticamente próximas. Para tanto, a construção de árvores filogenéticas foi uma das estratégias adotadas para compreensão da variação gênica em espécies aparentadas à *A. australis*. A análise filogenética molecular dos genes de interesse foi feita utilizando sequências disponíveis no banco de dados online do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para as análises, sequências de aminoácidos da proteína completa foram extraídas para diversas espécies. Foram reunidas todas as sequências disponíveis para os genes *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1* dentro da ordem Carnivora. Para avaliar as sequências disponíveis, a pesquisa foi feita utilizando o nome do gene seguido do nome de cada uma das famílias atuais da ordem Carnivora conforme a classificação de Wozencraft (2005): Mustelidae, Procyonidae, Mephitidae, Ailuridae, Odobenidae, Otariidae, Phocidae, Ursidae, Canidae, Eupleridae, Herpestidae, Hyaenidae, Viverridae, Felidae, Prionodontidae e Nandiniidae (WOZENCRAFT, 2005). Para as famílias em que a busca gerou resultados, todas as espécies disponíveis foram utilizadas. A lista com as espécies utilizadas e seus respectivos *Gene IDs* está disponível no apêndice C.

As sequências foram alinhadas usando o pacote DECIPHER (WRIGHT, 2016). Após o alinhamento, foram submetidas à reconstrução filogenética. Neste processo, primeiramente, o melhor modelo de substituição nucleotídica foi buscado a partir de critérios Bayesiano (*Bayesian information criterion* - BIC). Através da busca, utilizou-se o modelo JTT (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992) e variações em função de ajustes à distribuição gama e sítios invariáveis para reconstrução filogenética através do método de máxima verossimilhança, com 500 repetições *bootstrap*. Os procedimentos de reconstrução filogenética envolveram os pacotes de R *phangorn* (SCHLIEP, 2011) e *ape* (PARADIS et al., 2019). O desenho da árvore foi conduzido com os pacotes *ggplot2* (WICKHAM, 2011) e *ggtree* (YU, 2020). As linhas de comando utilizadas estão disponibilizadas no apêndice A.

3.2 DESCOBERTA DE MOTIVOS PROTEICOS

A avaliação de motivos proteicos conservados foi realizada como mais uma estratégia de compreensão da variação gênica na ordem Carnivora, além de indicar possíveis sítios de mutações que poderiam levar ao desenvolvimento do câncer. A descoberta de motivos proteicos conservados nos genes *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1* foi feita com auxílio da ferramenta online *Multiple Expectation maximizations for Motif Elicitation* - MEME Suite (BAILEY et al., 2009). Para tanto, foram selecionadas sequências das proteínas p53, Notch1 e SF3B1, codificadas pelos genes de interesse, de ao menos uma espécie representante para cada uma das famílias da ordem Carnivora com sequências disponíveis no NCBI. Desse modo, foram utilizadas as espécies *Zalophus californianus*, *Eumetopias jubatus*, *Callorhinus ursinus* (Otariidae), *Phoca vitulina* (Phocidae), *Odobenus rosmarus divergens* (Odobenidae), *Mustela putorius furo* (Mustelidae), *Ursus americanus* (Ursidae), *Canis lupus familiaris* (Canidae), *Felis catus* (Felidae), *Hyaena hyaena* (Hyaenidae) e *Suricata suricatta* (Herpestidae). As espécies e seus *Gene IDs* estão disponíveis no apêndice C. Para a pesquisa, foi selecionada a opção “anr” (para pesquisa de qualquer número de repetições) e a busca foi limitada a 20 motivos. A função dos motivos descobertos foi presumida através do banco de dados *Conserved Domain Database* (CDD) do NCBI.

3.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Amostras tumorais oriundas do indivíduo diagnosticado com linfoma linfocítico de pequenas células B foram coletadas durante a necropsia do indivíduo, restando duas amostras disponíveis para este trabalho: uma fixada em formol e conservada em bloco de parafina (FFPE) e outra armazenada a -20 °C. Devido a uma falha no freezer de armazenamento, esta última amostra precisou ser descartada. Portanto, a amostra armazenada em bloco de parafina (FFPE) foi utilizada para as extrações de DNA de tecido tumoral. Uma alíquota de DNA extraído a partir de uma amostra tumoral armazenada a -20 °C foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia da Federação dos Estabelecimentos de Ensino Superior em Novo Hamburgo (FEEVALE).

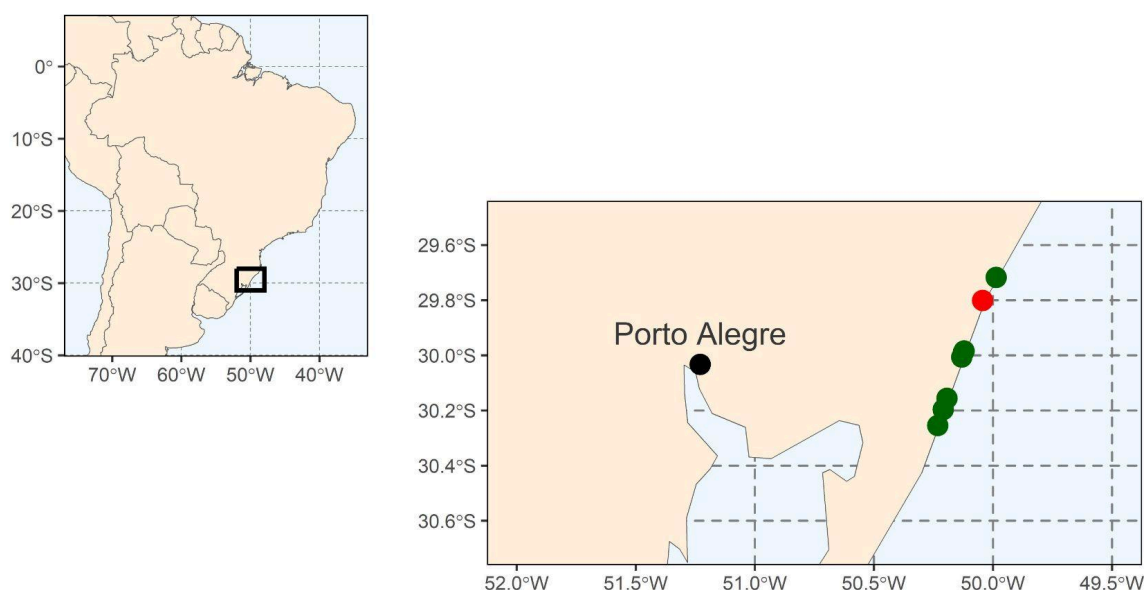
Os linfonodos não-tumorais, por sua vez, foram coletados *post mortem* de seis indivíduos de *Arctocephalus australis* e um indivíduo de *Lobodon carcinophagus* (Tabela 01). Os tecidos coletados pertencem a indivíduos encalhados ao longo de praias do litoral gaúcho ou atendidos pelo Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CERAM/UFRGS) (Figura 01 - *script* para construção do mapa disponível no apêndice B) e as coletas foram realizadas em parceria com o Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CERAM) e o Setor de Coleção do Museu de Ciências Naturais da UFRGS (MUCIN), através do projeto de monitoramento de praias e do banco de tecidos do Ceclimar. Todas as amostras foram armazenadas em tubos de microcentrífuga e mantidas sob refrigeração a -20°C.

Tabela 01 - Descrição das amostras não-tumorais utilizadas

Amostra	Espécie	Data de coleta
1	<i>Arctocephalus australis</i>	13/09/2022
2	<i>Arctocephalus australis</i>	08/08/2023
3	<i>Arctocephalus australis</i>	22/08/2023
4	<i>Arctocephalus australis</i>	21/09/2022
5	<i>Arctocephalus australis</i>	12/08/2022
6	<i>Arctocephalus australis</i>	06/08/2018
7	<i>Lobodon carcinophaga</i>	08/06/2022

Fonte: Autora (2024)

Figura 01 - Mapa das origens das amostras biológicas utilizadas



Fonte: Autora (2024)

Legenda: Os pontos marcados em verde correspondem às amostras não-tumorais; o ponto destacado em vermelho corresponde à amostra tumoral.

3.4 EXTRAÇÕES DE DNA

Diferentes métodos de extração de DNA foram aplicados conforme a natureza das amostras biológicas utilizadas.

3.4.1 Tecidos não-tumorais

Primeiramente, as amostras congeladas foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido até a formação de um pó fino. Posteriormente, a extração do DNA de tecidos não-tumorais foi realizada com o kit de extração por coluna *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante, com adaptações.

Para a extração do DNA, cerca de 25 mg de tecido macerado de cada amostra foram colocados em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 180 µL de tampão de digestão. A seguir, o fabricante indica o uso de 20 µL de proteinase K. Uma alíquota de tecido do indivíduo 1 foi submetida ao tratamento com proteinase K, enquanto o restante das amostras não sofreu o mesmo tratamento.

A solução foi incubada em banho maria a 55 °C por 1 hora para todas as amostras, aumentando o tempo de incubação para até 4 horas no caso de amostras onde a extração não foi bem sucedida. Após, o lisado foi centrifugado por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde recebeu a adição de 20 µL de RNase A, foi agitado em vórtex e incubado em temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, 200 µL de tampão de lise e 200 µL de etanol 100% foram adicionados, agitando o lisado em vórtex após a adição de cada reagente.

Posteriormente, realizou-se o protocolo de purificação. Para tal, cerca de 640 µL do lisado foram adicionados a uma coluna em um tubo de coleta e centrifugado por 1 minuto. Após, o tubo foi descartado e substituído e 500 µL do tampão de limpeza I misturado com etanol 100% foram adicionados à coluna, o que foi seguido de centrifugação por 1 minuto. Novamente o tubo de coleta foi descartado e substituído. Posteriormente, 500 µL do tampão de limpeza II misturado com etanol 100% foram adicionados à coluna, que novamente foi centrifugada por 3 minutos. O tubo de coleta foi descartado e substituído por um tubo de microcentrífuga esterilizado de 1,5 mL.

Para a primeira eluição, 30-50 μ L do tampão de eluição foram adicionados à coluna, incubando o sistema por 1 minuto e centrifugando por mais 1 minuto. Para recuperação de maior quantidade de DNA, a eluição foi repetida uma segunda vez, centrifugando o sistema por 1,5 minuto posteriormente. O DNA foi, então, armazenado sob refrigeração a -20°C .

3.4.2 Tecido tumoral FFPE

A extração de DNA de amostras teciduais conservadas em FFPE tendem a ser desafiadoras, uma vez que o formaldeído promove a formação de *crosslinks* de DNA com outras biomoléculas, como proteínas, e facilita a fragmentação e degradação do material genético, além de atuar como inibidor da PCR (ARREAZA et al., 2016). Para contornar este fato, foram utilizados protocolos específicos para remoção da parafina e de inibidores da PCR. Três diferentes protocolos de extração de tecidos armazenados em FFPE foram testados, com adaptações: i) extração com base em xilol (GOUVEIA et al., 2011; KOVACS et al., 2019); ii) extração com base em óleo mineral (LIN et al., 2009); e iii) extração por micro-ondas (SATO et al., 2001). O tecido tumoral armazenado em FFPE foi seccionado em fatias de 20 μm de espessura e o material resultante foi utilizado como base para as extrações. Para o teste de cada método de extração, duas fatias de 20 μm de tecido tumoral foram utilizadas.

3.4.2.1 Extração com base em xilol

Para o método de extração de DNA com base em xilol, o protocolo descrito por Gouveia (2011) foi utilizado, com adaptações. As fatias foram dispostas em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. O material foi submetido a um banho com 1 mL de xilol, por 5 minutos a 50°C e, posteriormente, foi centrifugado por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Após, duas lavagens com 1 mL de álcool absoluto em temperatura ambiente foram feitas para ressuspensão da amostra. O restante da extração foi feita com protocolo de Kovacs (2019) utilizando o kit de extração por coluna *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific).

A degradação proteica foi feita através da adição de 200 μ L de tampão de digestão e 5 μ L de proteinase K, incubando em banho-maria por 15 minutos a 50°C

e 15 minutos a 80 °C. O lisado foi centrifugado por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde recebeu a adição de 20 µL de RNase A, foi agitado em vórtex e incubado em temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, 200 µL de tampão de lise e 200 µL de etanol 100% foram adicionados, agitando o lisado em vórtex após a adição de cada reagente. Após, o protocolo de purificação foi realizado conforme as instruções do fabricante descritas no item 3.4.1, mas utilizando 30 µL de tampão de eluição. A amostra final (T3) foi armazenada sob refrigeração a -20 °C.

3.4.2.2 *Extração com base em óleo mineral*

Para extração com base em óleo mineral, 500 µL de óleo mineral foram adicionados ao microtubo contendo as amostras de tecido tumoral. O material foi incubado a 80 °C por 1 minuto e misturado com vórtex. Após, 200 µL do tampão de lise do kit de extração de DNA *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific) foram adicionados e o material foi centrifugado por 15 segundos. Em seguida, 20 µL de proteinase K foram adicionados à fase líquida, incubando a 56 °C por 1 hora e a 80 °C por mais 1 hora. Terminados os ciclos de incubação, a amostra foi armazenada a 4 °C *overnight*.

Após o armazenamento *overnight*, a amostra foi centrifugada rapidamente e 10 µL de RNase A foram adicionados à fase líquida, incubando por 5 minutos. Em seguida, 200 µL do tampão de lise foram novamente adicionados, além de 200 µL de etanol 100%, misturando com auxílio de vortex. Após, o protocolo de purificação foi feito conforme descrito no item 3.4.1. A amostra final (T4) foi armazenada sob refrigeração a -20 °C.

3.4.2.3 *Extração por micro-ondas*

A extração de DNA com auxílio de radiação de micro-ondas foi realizada seguindo protocolo descrito por Sato (2001) com adaptações. Duas fatias de 20 µM de tecido tumoral conservado em bloco de parafina foram dispostas em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. Posteriormente, 200 µL do tampão de digestão fornecido com o *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific) foram adicionados, e as seções foram suavemente trituradas na solução com auxílio de

ponteiras estéreis. O microtubo com a tampa aberta foi disposto em um béquer de vidro de 50 mL, apoiado sobre papel toalha. Após, o béquer contendo o microtubo foi disposto em aparelho de micro-ondas por um período de 40 segundos, dividido em ciclos de 10 segundos e permitindo o resfriamento entre os ciclos. O microtubo foi centrifugado por 10 minutos para separação da parafina, e o conteúdo na fase líquida e o pellet de tecido foram transferidos para um novo microtubo. Posteriormente, 5 µL de proteinase K foram adicionados, seguidos por incubação em banho maria a 48 °C *overnight*. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado e submetido à fervura por 10 minutos. A amostra (T1) foi mantida sob refrigeração a -20 °C.

Posteriormente, a purificação da amostra foi feita através da adição de clorofórmio-álcool na mesma proporção do produto final da extração. A amostra foi agitada em vórtex e centrifugada por 8 minutos. O sobrenadante foi disposto em um novo tubo de microcentrífuga, onde foi adicionado isopropanol gelado na mesma proporção, misturando gentilmente por inversão. A amostra foi centrifugada por 8 minutos e o precipitado foi dissolvido em 10 µL de água ultra-pura. A amostra (T2) foi mantida sob refrigeração a -20 °C.

3.5 VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DAS EXTRAÇÕES DE DNA

A qualidade do DNA extraído foi verificada utilizando duas estratégias: (i) eletroforese em gel de agarose 1%, para verificação da integridade visual do DNA; e (ii) razão 260/280, verificada por espectrofotometria (*NanoDrop™ Lite Spectrophotometer*).

O preparo do gel para a eletroforese em gel de agarose foi feito utilizando 50 mL de tampão TBE, 0,5 gramas de agarose e 2 µL de brometo de etídio. Nas canaletas foram depositados 3 µL das amostras de DNA e 2 µL de tampão de carregamento. Como marcador de peso molecular foi utilizado *100 bp DNA ladder* (Ludwig biotecnologia). A corrida do gel foi realizada a 60 W por um período de cerca de 1 hora.

A avaliação por espectrofotometria foi feita utilizando *NanoDrop™ Lite Spectrophotometer*. Com isso, foram obtidos dados da pureza das amostras e quantificação do DNA total a A260 nm.

3.6 BUSCA DE SEQUÊNCIAS E DESENHO DE *PRIMERS*

O genoma de *Arctocephalus australis* não está ainda disponível em bancos de dados públicos. Assim, para o desenho dos *primers* foram utilizadas sequências conhecidas dos genes de interesse em espécies tão filogeneticamente próximas quanto possível. As sequências nucleotídicas foram obtidas através do *GenBank* do NCBI. Para a pesquisa, na opção “gene” foram utilizados o nome de cada gene seguido do termo “Otariidae”, buscando filtrar resultados de espécies da mesma família de *A. australis* com sequenciamento disponível, e o nome do gene seguido do termo “Phocidae”, buscando selecionar sequências de um grupo externo. Como resultado, foram selecionadas as espécies *Zalophus californianus* (leão-marinho-da-Califórnia), *Eumetopias jubatus* (leão-marinho-de-steller) e *Callorhinus ursinus* (lobo-marinho-do-norte) (pertencentes à família Otariidae), e *Phoca vitulina* (foca-comum) (pertencente à família Phocidae).

Com o intuito de evitar possíveis áreas de divergência filogenética nas sequências no desenho dos *primers*, o alinhamento entre os genes *TP53*, *SF3B1* e *NOTCH1* das quatro espécies foi feito utilizando o software BioEdit (Figura 02). As sequências apresentaram alto grau de conservação interespecífica, e, assim, as sequências-alvo escolhidas mostraram similaridade entre todos os táxons utilizados como referência.

Figura 02 - Alinhamento das regiões de anelamento dos *primers* entre diferentes espécies

TP53-1

Zalophus californianus CGATGCAGGACCCACAGTCAGAGSC AAGTCCGAGTTCGTGACAGAGGTT
 Eumetopias jubatus
 Callorhinus ursinus
 Phoca vitulinaG.....G

TP53-2

Zalophus californianus CCTCAACAAGCTGTTTTGCCAGCT GCAGTGGTAATGTGCTGGGACGGA
 Eumetopias jubatus
 Callorhinus ursinusT.....C.....
 Phoca vitulinaT.....C.....G.....

TP53-3

Zalophus californianus AGTATGGTTGGGAGTTAGGGGGC CTAGTTTCCTCGCTGTCCGAC
 Eumetopias jubatus
 Callorhinus ursinus
 Phoca vitulinaGG.....T.....

TP53-4

Zalophus californianus AGTATTGGACATGGCGAGGTTGGG GCCCTCCCTCTCTCCCTTTTA
 Eumetopias jubatus
 Callorhinus ursinus
 Phoca vitulinaC.....G.....

NOTCH1-1

Zalophus californianus TAAGGCATCAGGCTCACTTGGGG CCTTGAGGCAGGACCACCGCGSC
 Eumetopias jubatus
 Callorhinus ursinus
 Phoca vitulinaG.....

NOTCH1-2

Zalophus californianus CATTCCAGCAGTCCCCGTCC GCTTCCTTTCCCAAGCCCTGCT
 Eumetopias jubatus
 Callorhinus ursinus
 Phoca vitulina
 Phoca vitulina
 Phoca vitulina

SF3B1

Zalophus californianus GTCCCTTGATTAAGAGAGTCCTGGTG PATAGGGTCTGGCTGCTTTCTTAA
 Eumetopias jubatusA.....
 Callorhinus ursinusT.....C.....A.....
 Phoca vitulinaC.....A.....

Fonte: Autora (2024)

Os *primers* foram desenhados manualmente, de modo a cobrir todos os fragmentos pretendidos (éxon 34 para *NOTCH1*, éxons 14 a 16 para *SF3B1* e éxons 2 a 11 para *TP53*). Sua qualidade *in silico* foi avaliada no aplicativo online NetPrimer Premier Biosoft, priorizando sequências de 17 a 30 nucleotídeos, GC de 40 a 60% e Tm de ~57°C. Os *primers* foram desenhados nos sentidos *forward* (F) e *reverse* (R), buscando cobrir as áreas de interesse gênico na sua integralidade e regiões flangeadoras, quando possível. As sequências dos *primers* são apresentadas na Tabela 02.

Tabela 02 - Sequências dos *primers* utilizados e tamanho dos respectivos amplicons

<i>Primer</i>	F/R	Sequência (5' → 3')	Amplicon
NOTCH1-1	F	AGGCATCAGGCTCACTTGG	1026 nt
	R	CGGTGGTCTGCCTCAAA	
NOTCH1-2	F	ATTCCAGCAGTCCCCGTC	1086 nt
	R	CAGGGCTTGGGAAAGGAA	
SF3B1	F	TCCCTTGATTAAGAGAGTCCTGG	1190 nt
	R	TAAGAAAGCAGCCAGACCCTAT	
TP53-1	F	ATGCAGGACCCACAGTCAGA	1077 nt
	R	CCTCTGTCACGAACTCGGAC	
TP53-2	F	TCAACAAGCTGTTTTGCCAG	1008 nt
	R	CGTCCCAGCACATTACCACT	
TP53-3	F	TATGGTTGGGAGTTAGGGGG	1244 nt
	R	CGGACAAGCGAGGAAACTG	
TP53-4	F	TATTGGACATGGCGAGGTTG	1190 nt
	R	AAAAGGGAAGAGAGGGAGGG	

Fonte: Autora (2024)

3.7 REAÇÕES DE PCR

A amplificação do material genético extraído foi feita utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Para cada gene extraído, as PCRs foram feitas utilizando 1x o tampão de reação, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,2 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 1 U de Taq Polimerase. Testes foram feitos usando 20 e 40 ng de DNA. As reações foram feitas utilizando somente a eluição com maior qualidade para cada uma das amostras. Além das amostras, foram utilizados controles contendo a mesma solução de reação, porém sem a adição de DNA. Nesses casos, a quantidade que seria equivalente ao DNA foi substituída por água ultrapura.

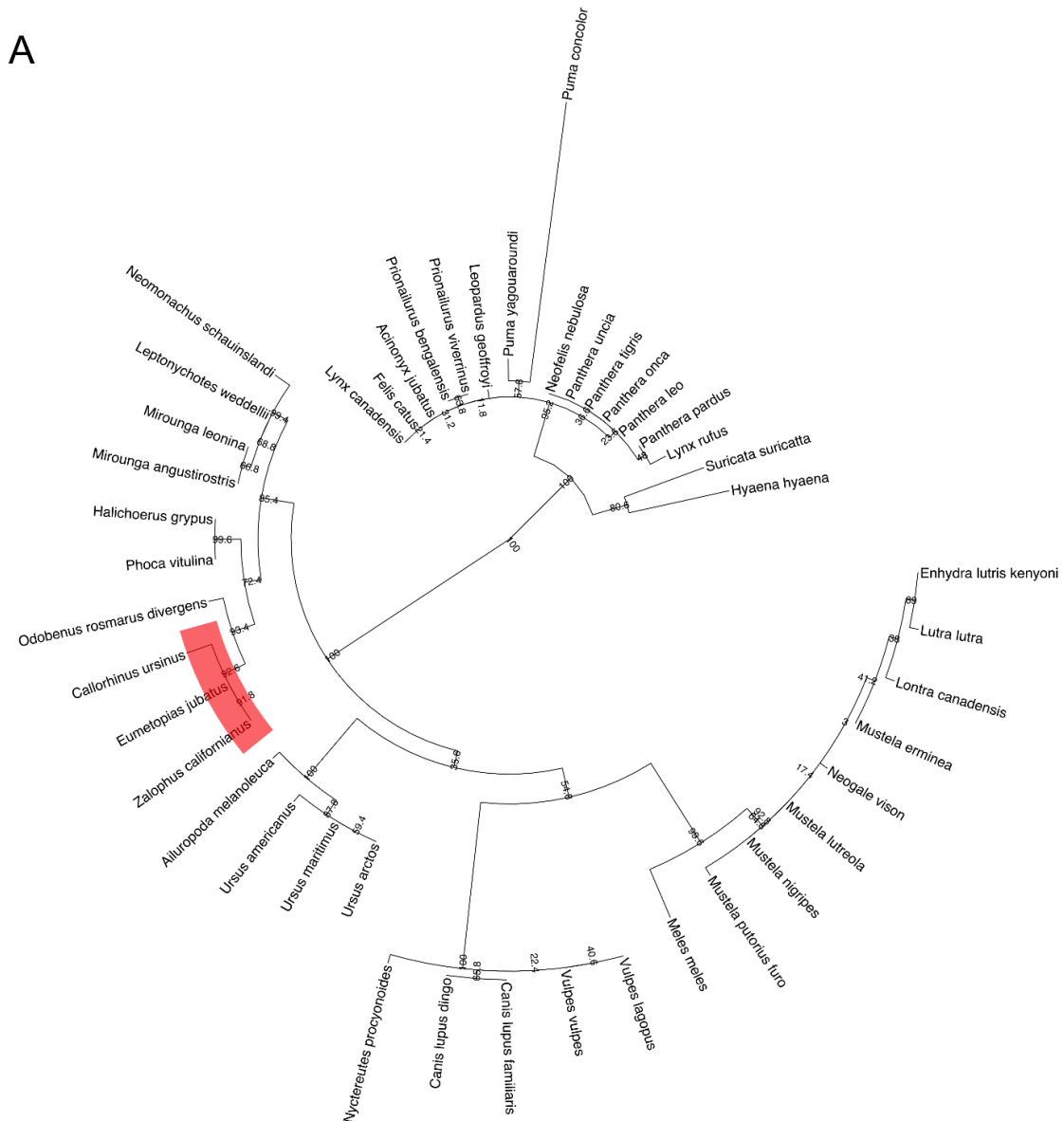
Primeiramente, uma PCR com gradiente de temperatura foi realizada com a amostra não-tumoral 1 com o intuito de avaliar a temperatura de anelamento ideal para cada *primer*. A partir disso, a amplificação das amostras foi feita com PCR convencional em termociclador com 94 °C durante 2 minutos para desnaturação inicial, seguidos por 38 ciclos intercalando 94 °C por 30 segundos, 55 a 65 °C (temperatura de anelamento, a depender do *primer* utilizado) por 30 segundos e 72 °C por 40 segundos. Ao final do último ciclo, as amostras ficaram por 7 minutos finais a 72 °C. Para análise dos fragmentos finais obtidos, os produtos finais da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1.2%, corado com brometo de etídio e com marcador de peso molecular 100 bp DNA *ladder* (Ludwig biotecnologia).

4 RESULTADOS

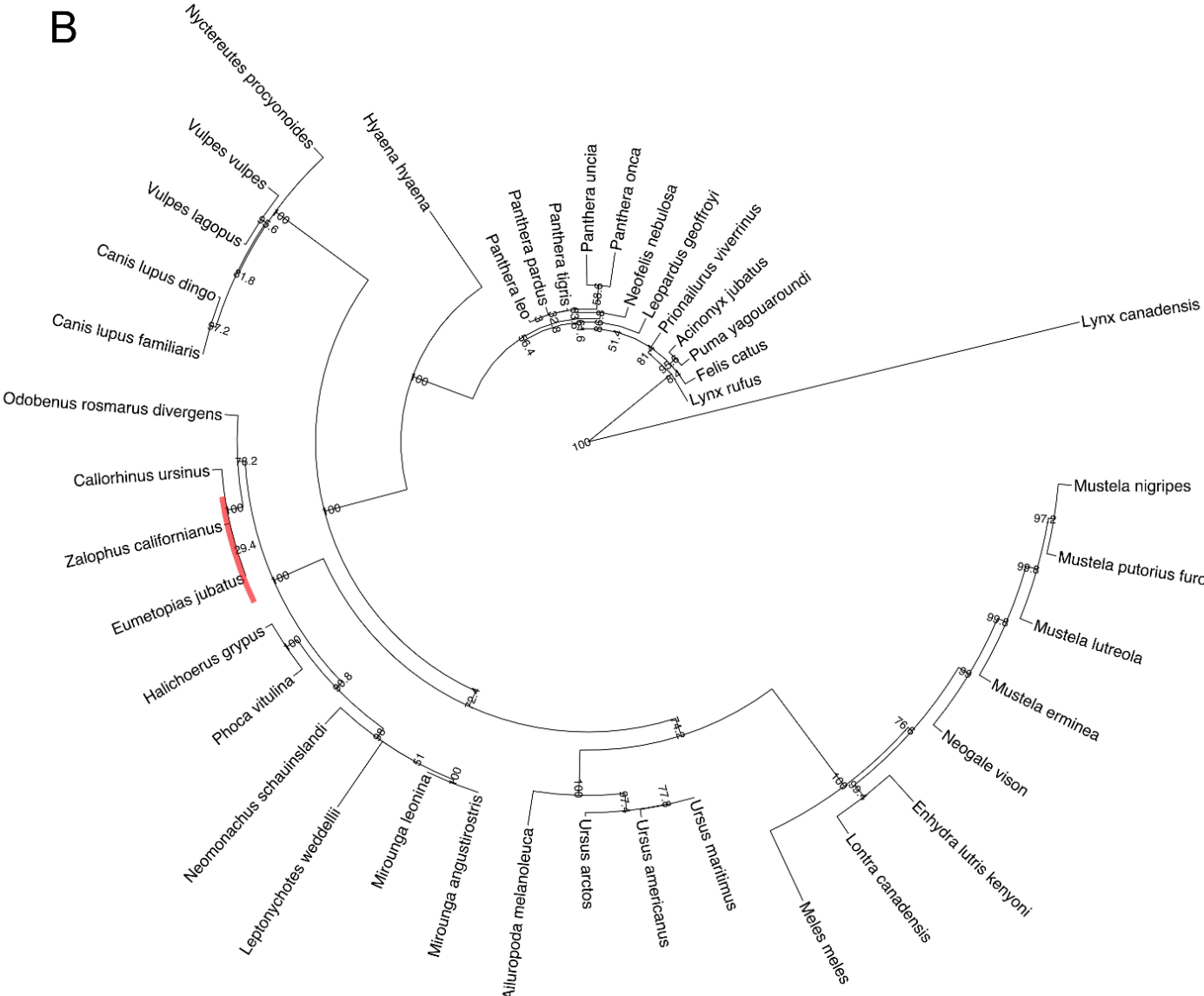
4.1 FILOGENIA MOLECULAR DOS GENES AVALIADOS

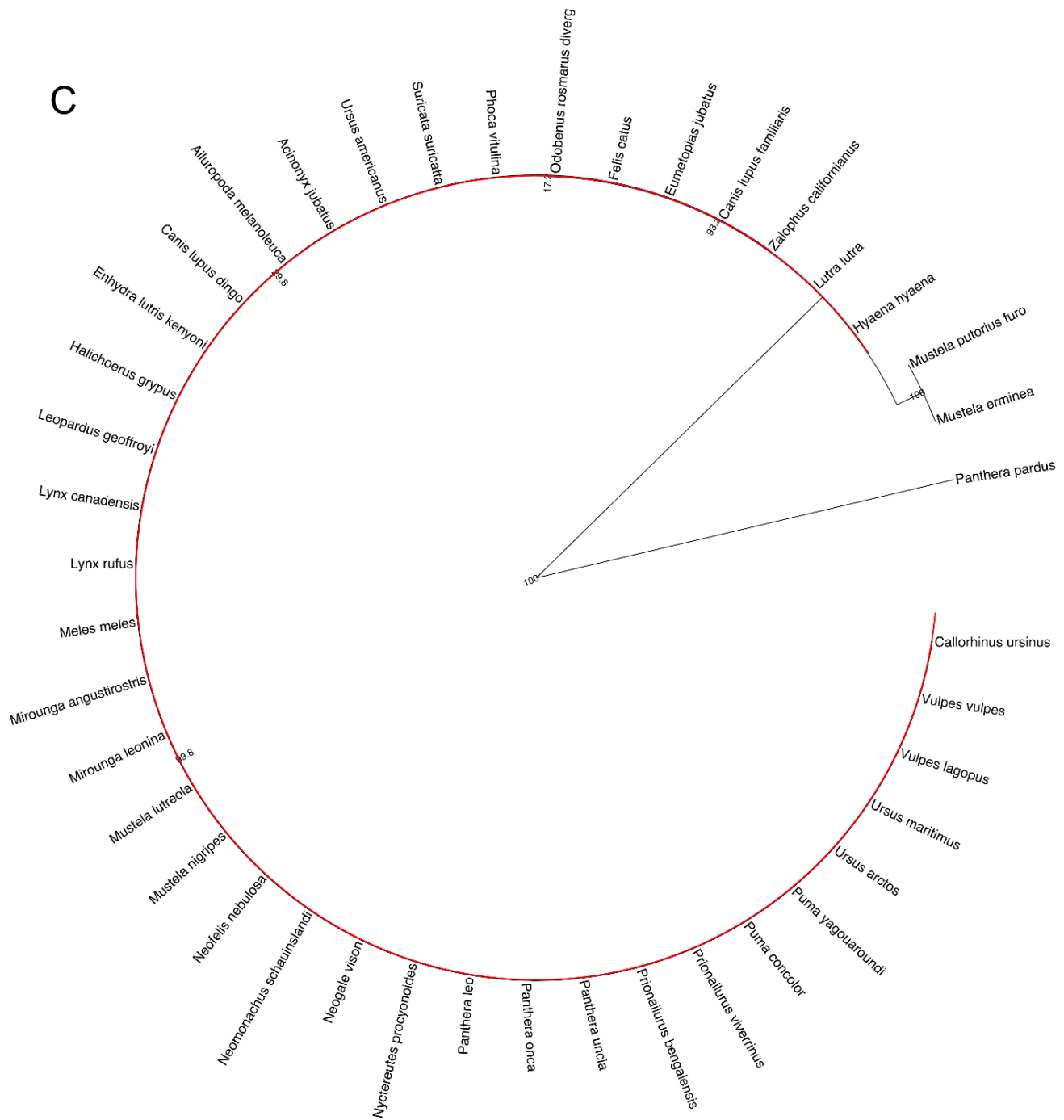
De modo geral, as filogenias de *TP53* (Figura 03-A) e *NOTCH1* (Figura 03-B) exibiram grandes similaridades. Porém, a filogenia de *SF3B1* (Figura 03-C) se destacou do padrão observado para os dois outros genes, exibindo pouca variação interespecífica.

Figura 03 - Árvores filogenéticas dos produtos dos genes *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1* na ordem Carnivora.



B





Fonte: Autora (2024)

Legenda: A = árvore filogenética para *TP53*; B = árvore filogenética para *NOTCH1*; C = árvore filogenética para *SF3B1*. Em vermelho são destacados os grupos que envolvem as espécies mais filogeneticamente próximas de *A. australis*.

4.2 MOTIVOS PROTEICOS CONSERVADOS

Devido à alta importância biológica relacionada aos motivos, usualmente esses conjuntos de aminoácidos são conservados entre diferentes grupos taxonômicos. A avaliação de motivos de representantes da ordem Carnivora para os genes *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1* (Figura 04) não foi exceção a esse padrão, com conservação de motivos entre táxons filogeneticamente próximos.

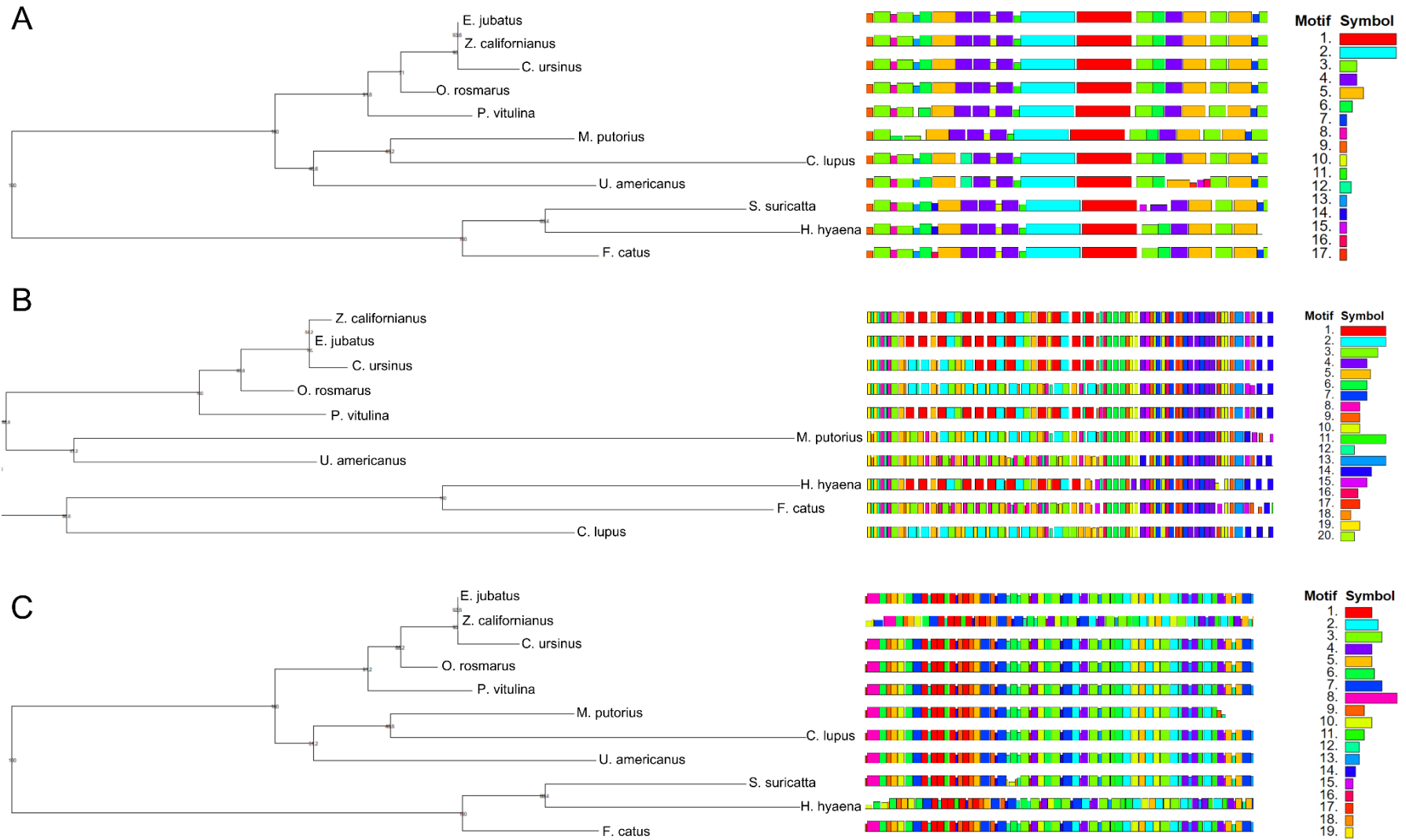
4.2.1 Motivos de *TP53*

Ao todo 17 motivos foram identificados para *TP53* na ordem Carnivora (Figura 04-A). Os motivos TP1 (DDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTVHYNMYMCNSSCMG GMNRRPILTIIT), TP2 (CVRAMAIYKKSEFVTEVRRCPHHERCPDNSDGLAPPQH LIRVEGNLRAK), TP3 (LQILGRESFEMFSEL), TP4 (FLQSGKTC PVTLYS), TP5 (ALELKPAPSGPEPGGSRPLSS), TP6 (CPGLDRRTEEE), TP9 (MQDPQS), TP10 (PSLNKL) e TP11 (PPPPDT) foram presentes em todas as espécies. O motivo TP4 foi presente em várias cópias em todas as espécies avaliadas, embora *Ursus americanus* (Ursidae) apresente menos cópias do que os demais. O motivo TP3 também foi presente em várias cópias em todas as espécies, embora com menos cópias em *Hyaena hyaena* (Hyaenidae).

O motivo TP8 (WNLLPE) foi presente em todas as espécies, com exceção de *Mustela putorius furo* (Mustelidae). TP13 (LLSEGV) foi ausente apenas em *Phoca vitulina* (Phocidae) e *Mustela putorius furo* (Mustelidae). Por sua vez, TP7 (HLKAKK) foi ausente somente em *Hyaena hyaena*.

Alguns motivos foram observados apenas em algumas espécies ou grupos taxonômicos da ordem Carnivora. O motivo TP12 (KTYPGTYGFR) foi presente apenas em *Ursus americanus* e *Canis lupus* (Canidae), enquanto TP14 (SRMSAA) foi presente apenas em *Suricata suricatta* (Herpestidae) e *Hyaena hyaena*. Já TP15 (QKGKPL) foi presente apenas em *Ursus americanus* e *Suricata suricatta*, enquanto TP16 (DGEYFV) foi presente apenas em *Ursus americanus* e *Felis catus* (Felidae). Por fim, o motivo TP17 (LMFCRP) foi exclusivo de *Ursus americanus*.

Figura 04 - Motivos proteicos conservados em p53, Notch1 e Sf3b1



Fonte: Autora (2024)

Legenda: A = motivos conservados de *TP53*; B = motivos conservados de *NOTCH1*; C = motivos conservados de *SF3B1*.

4.2.2 Motivos de *NOTCH1*

Um total de 20 motivos proteicos conservados foram identificados na ordem Carnivora para o gene *NOTCH1* (Figura 04-B). Os motivos N3 (ECASNPCANGGTC LDGVNSYTCGCPPGFTGPHCEVBVBECs), N4 (AGANRDIQDNMDRLPLFJAVEEM HQDVVQ), N5 (NGGTCHBGVGSYTCTCPPGYTGPHCEQDVDECS), N6 (ECKEYF GBGHCDLGCNSAECEWDGLDCAE), N7 (ALLNQTDRRGKTALHLAAAYKRSEAAK KL), N8 (LTDYKCECPPGWTGPLCETPD), N9 (LEAGASELVELAPPPQLHFMY), N10 (KEAELGKKPRKNAVDGKACDG), N11 (LAPPMTTAQFLTTPPSQHSYSSSPADNTP SHQLQVPEHPFLTPSPESPDQW), N12 (NACLSAPCRNGGTCH), N13 (HLPGMPD AHLGVGHLSVAAKPEMAALGAGGRLAFEAGPPRLSHLPVASST), N14 (SSSAAYGH LGRTFLGGZPSQADVQPLGPVQQQVH), N15 (SSQSDWSAGISAPPLGTQASLAS LPEALK), N16 (GDEDLEAPPPRIEELVPELP), N17 (VNVVRGPDGFTPLMIASCSGGG), N18 (PNPCRNGGTCE), N19 (PPPTESCLCLAAAFPGQRCQAL) e N20 (VAVAA FVLLFFVGCG) são presentes em todas as espécies avaliadas.

Diferindo desse padrão, o motivo N1 (CSDSVGGYECTCPPGYTG SNCEVBVBECASNPCKNGGTCQDGVGGYRCEC) é presente apenas em *Callorhinus ursinus*, *Eumetopias jubatus*, *Zalophus californianus*, *Phoca vitulina* e *Hyaena hyaena*, enquanto N2 (GYTGPNCEEBIBECASNPCQNGGTCIDGVNGYKCE CPPGFTGVHCEVBVB) é ausente em *Ursus americanus* e *Felis catus*. De modo geral, a maioria dos motivos é repetida várias vezes ao longo dos genomas das espécies.

4.2.3 Motivos de *SF3B1*

Ao todo 19 motivos proteicos conservados foram observados na ordem Carnivora para o gene *SF3B1* (Figura 04-C). Os motivos SF1 (TPGASKR KKRWDETPDRTPGG), SF2 (LKBKEEKVREIAABLIAAJAEYAAEY), SF3 (KAIAGAD AVVANYIGIEVMLPFJKDFLKH), SF4 (ELLKKLKKAIRQHRVKTVAI), SF5 (NALLNY VPPSLFQITPEVLQR), SF6 (AKKAGKATKISKTRLDIDBMDEQ), SF7 (LIKIEER IRILSNEALLAHLPKLVNDDEA), SF8 (HEDIEAQIREIQGKKAALDEAQQVGLDSTG YYDQEIYGGSD), SF9 (STPLLTPGKDSIGTP), SF10 (KILIDEDEYTKERTMIISPE), SF11 (AJYARTYTPLDALPA), SF12 (TAKELLRIITE), SF13 (EEAKKPVDKVV), SF14

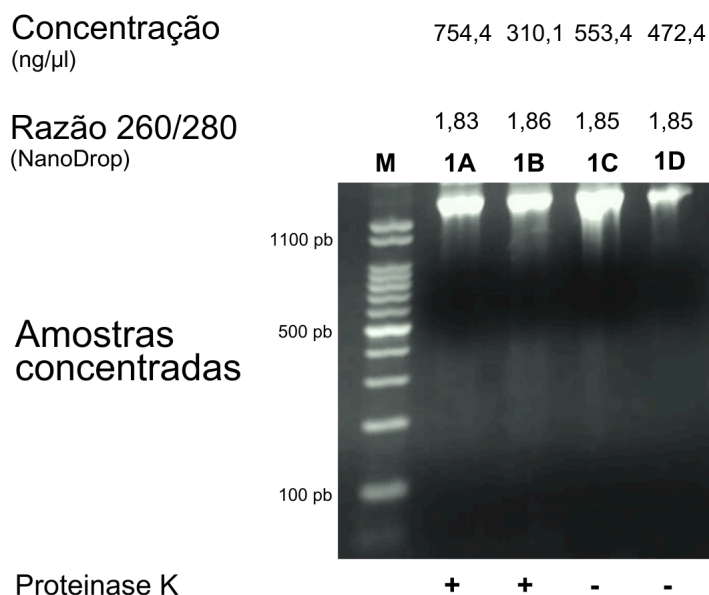
(PSGGAGGA), SF15 (GIESFD) e SF16 (LVKVID) foram presentes em todas as espécies avaliadas.

Alguns motivos analisados diferiram desse padrão, sendo ausentes em algumas espécies. O motivo SF17 (MAKIAK) é ausente apenas em *Hyaena hyaena* e *Zalophus californianus*. Já SF18 (IKGGSD) é presente apenas em *Suricata suricatta* e *Hyaena hyaena*, enquanto SF19 (CFEKJP) é visto apenas em *Suricata suricatta* e *Zalophus californianus*. De modo geral, a maioria dos motivos é repetida várias vezes ao longo do genoma das espécies.

4.3 QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA

Na avaliação por eletroforese em gel de agarose a 1% e na espectrofotometria com *NanoDrop™ Lite Spectrophotometer* (Figura 05) não foi observada diferença significativa na pureza das amostras extraídas com uso de proteinase K (1A e 1B) e sem o reagente (1C e 1D).

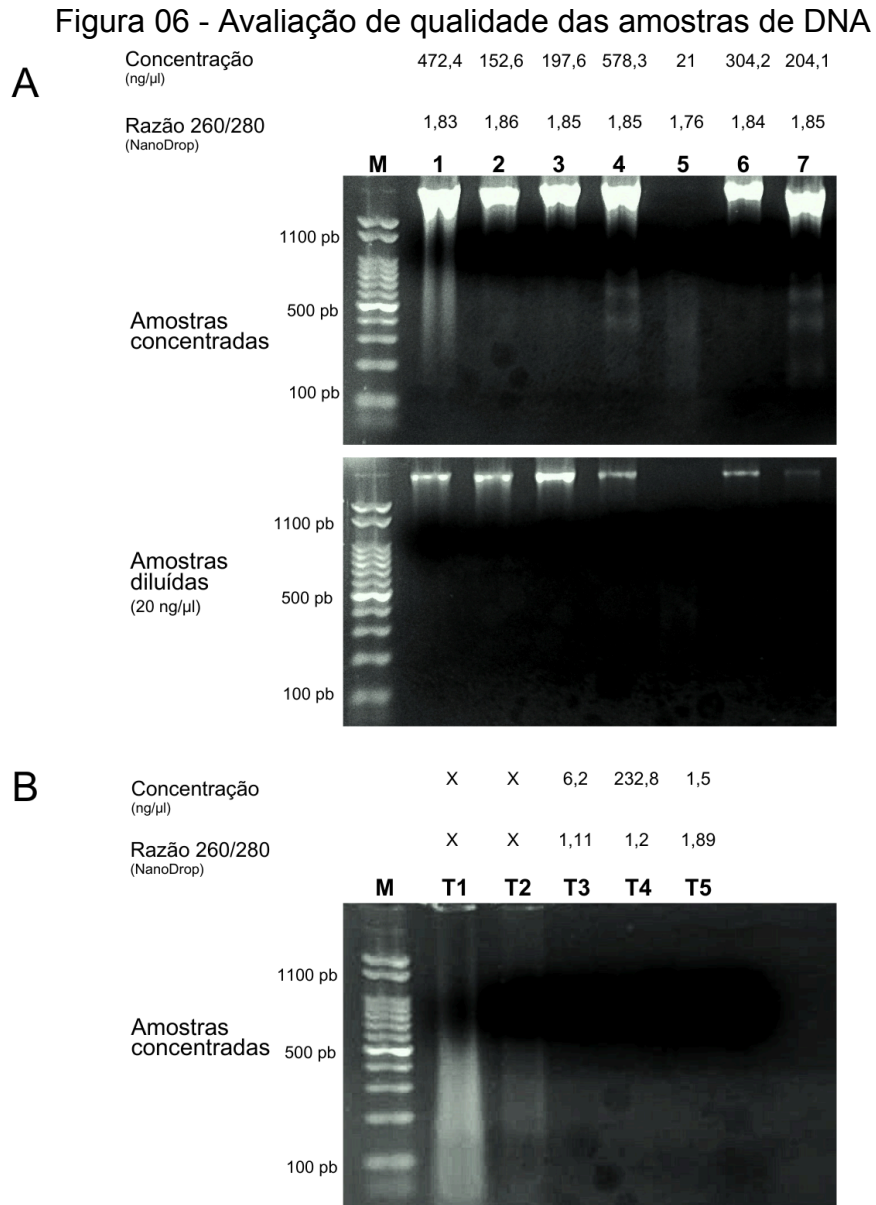
Figura 05 - Efeitos do tratamento com proteinase K na extração de amostras não-tumorais



Fonte: Autora (2024)

Legenda: 1A e 1B equivalem a amostras com tratamento de proteinase K, correspondendo, respectivamente, à primeira e segunda eluição da extração. 1C e 1D equivalem a amostras sem tratamento de proteinase K, correspondendo, respectivamente, à primeira e segunda eluição da extração. Todas as extrações foram feitas a partir da amostra não-tumoral 1, armazenada a -20 °C. M = marcador 100 pb.

Para a maioria das amostras não-tumorais avaliadas, a eletroforese em gel de agarose mostrou a formação de bandas únicas com peso molecular condizente com DNA genômico total (Figura 06), com exceção da amostra não-tumoral 5 (Figura 06-A). Na avaliação por espectrofotometria as amostras não-tumorais apresentaram quantificação de DNA dentro do esperado e razão 260/280 próxima a 1,8.



Fonte: Autora (2024)

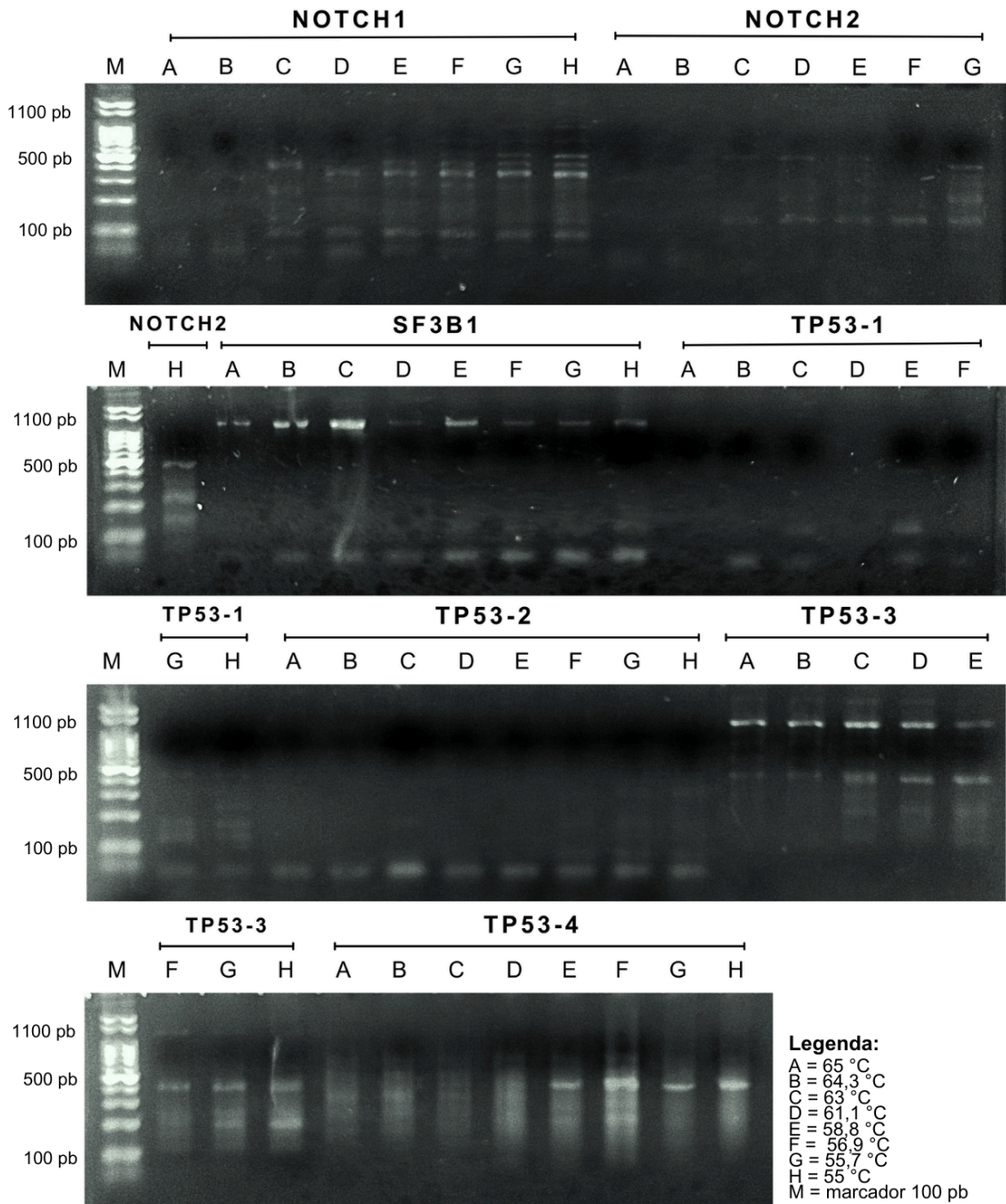
Legenda: A) Amostras não tumorais 1 a 7: DNA oriundo de linfonodos não tumorais de diferentes indivíduos, mantidos sob refrigeração a -20 °C. B) Amostras de linfonodo tumoral de um mesmo indivíduo armazenada em FFPE e submetidas a diferentes protocolos de extração de DNA. T1 = extração por micro-ondas sem purificação; T2 = extração por micro-ondas com purificação; T3 = extração por xilol; T4 = extração por óleo mineral; T5 = amostra cedida pela FEEVALE. M = marcador 100 pb.

A amostra tumoral extraída através do método de micro-ondas (T1) exibiu banda com arraste na avaliação em eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 06-B), que foi reduzida após o protocolo de purificação (T2). A quantificação por NanoDrop não foi possível para essa amostra. As demais amostras tumorais não exibiram banda no gel de agarose, além de demonstrarem baixa concentração de DNA e razão 260/280 distante de 1,8 na avaliação por espectrofotometria.

4.4 AMPLIFICAÇÃO DOS *PRIMERS* GENE-ESPECÍFICOS

Na PCR de gradiente realizada com a amostra não-tumoral 1, os *primers* SF3B1 e TP53-3 mostraram amplificação com fragmentos com tamanho condizente com o esperado (~1200 pb). A melhor temperatura de anelamento para esses *primers* foi, respectivamente, de 63 °C e 65 °C. Os *primers* NOTCH1, NOTCH2, TP53-1, TP53-2 e TP53-4 não apresentaram amplificação de fragmentos no tamanho esperado em amostras de *A. australis*. Já os *primers* TP53-1 apresentaram amplificação somente na amostra de *L. carcinophaga*. Os resultados da PCR de gradiente são exibidos na Figura 07.

Figura 07 - Amplificação dos *primers* gene-específicos conforme gradiente de temperatura



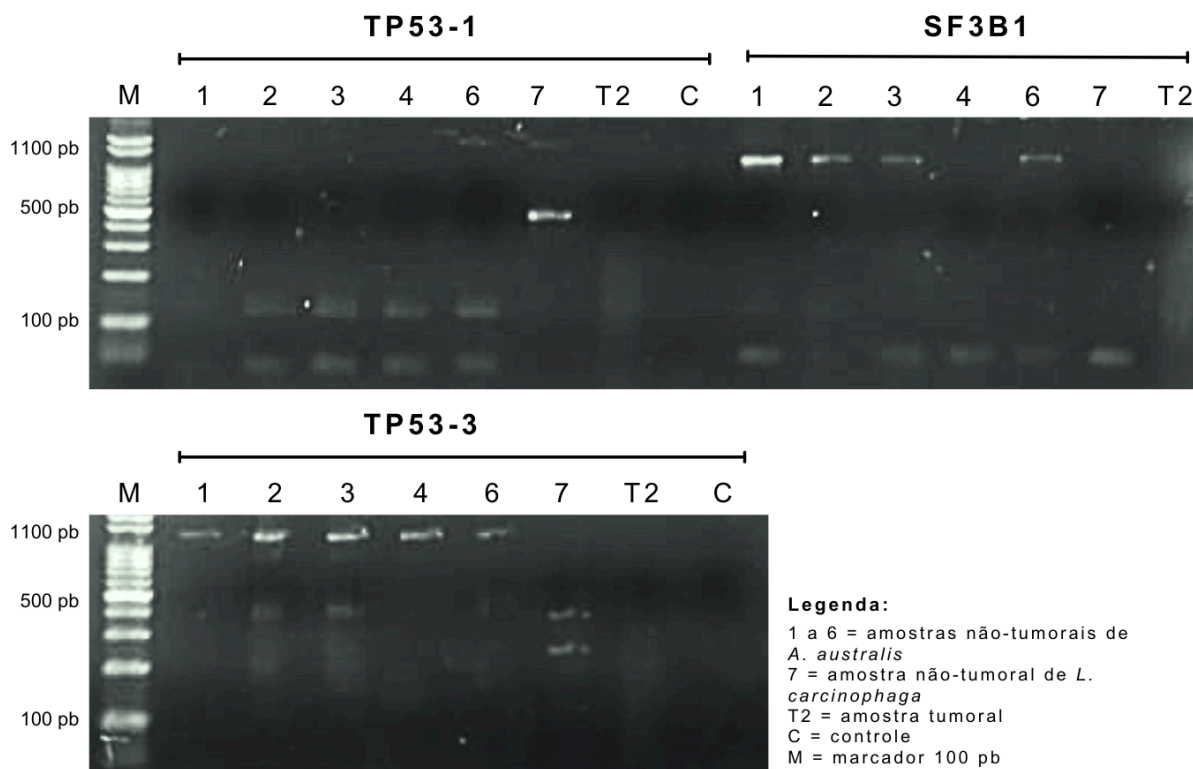
Fonte: Autora (2024)

Nota: PCR de gradiente de temperatura realizado com a amostra não-tumoral 1.

Após a identificação das temperaturas de anelamento com melhor resultado para cada par de *primers*, as PCRs foram realizadas com todas as amostras não-tumorais e tumorais disponíveis. Novamente, a amplificação de fragmentos dentro do tamanho esperado em amostras não-tumorais de *A. australis* pode ser confirmada com os *primers* TP53-3 e SF3B1, e o *primer* TP53-1 manteve

amplificação apenas em amostras não-tumorais de *Lobodon carcinophaga* (amostra 7). Nenhuma das amostras tumorais exibiu amplificação com os *primers* utilizados. Os resultados das amplificações são exibidos na Figura 08.

Figura 08 - Amplificação dos *primers* gene-específicos TP53-1, SF3B1 e TP53-3



Fonte: Autora (2024)

5 DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Dentre as espécies avaliadas, aquelas filogeneticamente mais próximas à *A. australis* seguindo a classificação de Wozencraft (2005) são *Callorhinus ursinus*, *Zalophus californianus*, *Eumetopias jubatus*, *Phoca vitulina* e *Odobenus rosmarus divergens*, nessa ordem. Todas essas espécies compartilham a superfamília Pinnipedia em comum com *A. australis*, mas *C. ursinus*, *Z. californianus* e *E. jubatus* também são abrigados dentro da família Otariidae. Porém, de todas as espécies avaliadas, *C. ursinus* é a única que também compartilha a subfamília Arctocephalinae em comum com *A. australis*.

Entretanto, a evolução dos genes não necessariamente representa a evolução do genoma e, portanto, das espécies, como um todo. Espécies acumulam variações nas sequências nucleotídicas como resposta a pressões evolutivas, mas os genes, de forma individual, podem traçar trajetórias evolutivas próprias e independentes da evolução da espécie (LOPES; CRUZ, 2011). A avaliação dos genes *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1* retratou padrões condizentes com essa evolução independente.

A árvore para o gene *TP53* exibiu relativa uniformidade com a evolução das espécies da ordem Carnivora. Dois ramos principais foram formados, coincidindo com as subordens Feliformia e Caniformia. Dentro de Feliformia, um ramo correspondente com a família Felidae e outro agrupando as famílias Herpestidae e Hyaenidae foram formados. Dentro de Felidae, espécies do mesmo gênero foram agregadas em ramos conjuntos, com exceção de *Lynx rufus* e *Panthera pardus*, que aparentam algum grau de divergência em relação aos demais. Já nos Caniformes, *C. ursinus*, *E. jubatus* e *Z. californianus* foram separados em um ramo próprio, condizente com a família Otariidae. Porém, merece atenção a separação de membros de Phocidae entre diferentes ramos, com *P. vitulina* e *Halichoerus gryphus* mais próximos de Odobenidae do que o restante dos membros da família, sugerindo alterações em *TP53* entre espécies relativamente próximas de Phocidae. Os demais ramos da árvore foram condizentes com as famílias Ursidae, Canidae e Mustelidae.

Relativamente, o gene *NOTCH1* exibiu a maior proximidade com o padrão de evolução das espécies dentro da ordem Carnivora. Para esse gene, novamente os

membros de Otariidae foram reunidos em um ramo único, e as demais espécies também foram reunidas em ramos correspondentes com suas famílias.

O gene *SF3B1* apresentou elevado grau de conservação entre as espécies avaliadas, impossibilitando a construção de uma árvore propriamente dita. O alto grau de preservação das sequências nucleotídicas do gene são um indicativo de que sua função é essencial para manutenção do organismo, sugerindo que mutações nesse sistema são deletérias e, portanto, sofrem seleção negativa. Corroborando essa hipótese, diversos estudos recentes têm mostrado a presença de mutações somáticas no gene *SF3B1* em síndrome mielodisplásica e tumores hematológicos, incluindo linfomas (SAMY; OZDEMIR; ALHAJJ, 2023). *SF3B1* já representa um promissor alvo como marcador de prognóstico do câncer e a modulação farmacológica para correção do spliceossomo poderá ser uma estratégia terapêutica futura em humanos (ZHOU et al., 2020).

5.2 ANÁLISE DE MOTIVOS PROTEICOS

Os motivos são sequências proteicas curtas que possuem um papel-chave na atuação da proteína. Pela sua importância, tendem a ser mantidos pela seleção natural, resultando na conservação de motivos através de diferentes táxons (D'HAESELEER, 2006). Essa conservação pôde ser observada em motivos variados em *TP53*, *SF3B1* e *NOTCH1* dentro de Carnivora, apesar do uso de espécies pertencentes a uma categoria filogenética relativamente abrangente, como é o caso de uma ordem.

Entre os diversos motivos de *TP53* que são conservados entre todos os táxons da ordem Carnivora, aqueles com maior extensão são TP1 e TP2, que correspondem justamente ao domínio de ligação ao DNA da proteína p53. No SLL, 95% das mutações em *TP53* ocorrem nessa região, afetando drasticamente a atuação da proteína (SUTTON; ROSENQUIST, 2015). Como p53 atua como um fator de transcrição, o domínio de ligação ao DNA presente nesses motivos é fundamental para a atuação da proteína, justificando sua conservação entre os táxons variados. A espécie *U. americanus* exibe diversos motivos proteicos exclusivos, como TP12, TP15 e TP16, demonstrando prováveis adaptações evolutivas da espécie. Os motivos proteicos se mostraram bem conservados entre diferentes pinípedes.

Já em *NOTCH1*, a análise de função dos motivos feita com o *Conserved Domain Database* do NCBI revelou que o motivo N6, conservado entre todas as espécies de carnívoros, se relaciona com o domínio LNR, responsável pela efetiva ativação da proteína Notch1. Do mesmo modo, os motivos N1, N2, N3 e N5 se relacionam com o domínio de ligação ao cálcio EGF-like, fundamental para a proteína Notch1, que é um receptor transmembrana dependente de cálcio. Mutações no domínio EGF-like são relacionadas com maior incidência e pior prognóstico em alguns tipos de câncer (LIU et al., 2016). A importância da função desses motivos também se relaciona com a grande repetição em tandem que eles exibem nas espécies em que estão presentes, especialmente N1. Apesar de sua importância, N1 é presente apenas nos pinípedes e em *Hyaena hyaena*. Seguindo o padrão filogenético de motivos proteicos em pinípedes, é provável que *A. australis* também possua o motivo N1.

Em *SF3B1*, um dos domínios mais importantes é o HEAT, que é fundamental para a atuação do snRNP U2. Em humanos, mutações associadas com tumores normalmente são observadas nas repetições HEAT entre os éxons 14 e 16 (WAN; WU, 2013). Nas espécies da ordem Carnivora, uma busca através da ferramenta *Conserved Domain* do NCBI permite identificar que o domínio HEAT é relacionado ao motivo 12, que possui várias repetições em todas as espécies avaliadas. Ainda em *SF3B1*, *Zalophus californianus*, um pinípede filogeneticamente próximo à *A. australis*, exibiu ausência do motivo SF17 e presença do motivo SF19, apesar de esse padrão não ser exibido entre os demais pinípedes avaliados. Desse modo, as variações exibidas em *Z. californianus* podem ser um indicativo de que a evolução de *SF3B1* exibe variações entre os membros de Otariidae.

A conservação desses motivos até mesmo ao longo de espécies filogeneticamente mais distantes é um retrato da importância que a estrutura codificada por eles possui na atuação proteica, indicando uma possível manutenção da função do motivo entre diferentes táxons. Do mesmo modo, é possível que a presença de motivos exclusivos em determinados grupos taxonômicos, como é o caso do motivo N1 de Notch1 para pinípedes, seja um indicador de alguma vantagem adaptativa relacionada com essas espécies. Porém, mais estudos são necessários para entender o papel real de cada um desses motivos na atuação proteica.

5.3 AMPLIFICAÇÃO DOS *PRIMERS*

O genoma de *A. australis* não é conhecido na literatura ou disponibilizado em bancos de dados genômicos. Assim, análises genéticas de baixo custo, que envolvem desenho de *primers*, ampliações, e sequenciamento de fragmentos únicos são desafiadoras, mais do que seria uma análise em escala genômica com os devidos recursos disponíveis. No entanto, mesmo utilizando métodos simples e de baixo custo, resultados importantes foram obtidos. Somando-se a isso, o uso de amostras FFPE dificulta a extração de DNA com qualidade necessária para amplificação em PCR.

Nas espécies de referência, os genes escolhidos para análise são relativamente extensos: em *Zalophus californianus*, por exemplo, *TP53* possui ~12.879 pb, *NOTCH1* possui ~ 44.387 pb e *SF3B1* possui ~ 53,055 pb. Assim, a confecção de *primers* que cobrissem toda a extensão dos genes se mostrou inviável, considerando os recursos financeiros disponíveis, assim como pela metodologia adotada, pois seria mais adequado um sequenciamento de alta performance para tal. Foram escolhidos éxons de maior interesse de acordo com a literatura para linfomas linfocíticos de pequenas células B. Assim, para *NOTCH1* foi utilizada a região compreendendo o éxon 34 (GIANFELICI, 2012); para *SF3B1*, foi utilizada a região compreendendo os éxons 14 a 16 (WAN; WU, 2013); e para *TP53*, foi utilizada a região codificante completa (éxons 2 a 11).

Os *primers* que exibiram amplificação de fragmentos foram *SF3B1* (anelamento a 63 °C), *TP53-1* (anelamento a 59 °C) e *TP53-3* (anelamento a 65 °C). O par de *primers* para *SF3B1* exibiu fragmento único com tamanho condizente com o esperado (~1200 pb), estando apto para futuros sequenciamentos. É possível que a ausência de amplificação com o *primer* de *SF3B1* para a amostra 4 tenha ocorrido em decorrência de falhas operacionais na realização da PCR. A melhor compreensão das causas para ausência de amplificação nessa amostra dependem da repetição da reação de PCR.

Já o par de *primers* *TP53-3* exibiu fragmentos com tamanho próximo ao esperado (~1200 pb), mas concomitantemente a fragmentos inespecíficos. Uma estratégia que poderia ser adotada para sequenciamento desse trecho gênico amplificado por *TP53-3* seria a purificação de DNA a partir do gel de agarose,

possibilitando a separação apenas do fragmento com tamanho de interesse (VOGELSTEIN; GILLESPIE, 1979).

O par de *primers* TP53-1 exibiu fragmentos apenas em indivíduos de *Lobodon carcinophaga*, sendo incompatível com as amostras de *A. australis*. Apesar disso, o fragmento produzido (~700 pb) em *L. carcinophaga* foi menor do que o esperado (~1000 pb). Um dos motivos para isso pode ser a evolução diferencial de *TP53* dentro da família Phocidae, como exemplificado na árvore filogenética do gene em Carnivora (item 5.1). Portanto, é provável que o tamanho do segmento gênico coberto por esse *primer* exiba variação interespecífica.

A ausência de amplificação em *A. australis* para os *primers* NOTCH1, NOTCH2, TP53-1, TP53-2 e TP53-4 pode ter ocorrido como resultado de diversos fatores: i) fatores interferentes nas amostras de DNA, nos primers ou nas reações de PCR; ii) quantificação errônea do DNA na avaliação por espectrofotometria; iii) mau funcionamento dos *primers*; ou iv) presença de mutações nos sítios de anelamento dos *primers* em *A. australis*. Estas últimas podem provocar *mismatches*, impedindo a amplificação. Embora o alinhamento das sequências, a construção de árvores filogenéticas e a análise de motivos de *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1* em espécies filogeneticamente próximas tenha demonstrado alto grau de conservação interespecífica desses genes, é possível que *A. australis* possua mutações que impeçam o uso do genoma de espécies aparentadas como referência. A amplificação de TP53-1 somente em amostras de *L. carcinophaga* e a amplificação de TP53-3 somente em amostras de *A. australis* são fatores que corroboram com essa hipótese. Desse modo, outras estratégias para sequenciamento devem ser adotadas na espécie.

O uso de amostras FFPE dificulta a extração de DNA com qualidade necessária para amplificação em PCR e posterior sequenciamento. Assim, a falta de acesso a amostras tumorais mantidas sob outros métodos de preservação que não utilizem formalina foi um dos obstáculos para a realização deste trabalho. Diferentes processos de extração de DNA do material tumoral foram testadas, mas pouco material genético pode ser obtido, ao contrário do observado com as amostras não-tumorais armazenadas a -20 °C, nas quais o método de extração utilizado se mostrou muito efetivo. Desse modo, novos estudos com amostras tumorais armazenadas de forma adequada para extração de DNA devem ser realizados para aprimorar a compreensão da tumorigênese em *A. australis*.

6 CONCLUSÃO

Os resultados das PCRs realizadas indicam o potencial uso dos *primers* TP53-1 como identificador de marcadores para *Lobodon carcinophaga* e SF3B1 para *Arctocephalus australis*. Futuramente, o sequenciamento desses fragmentos deverá ser realizado para elucidar a composição desses trechos gênicos na espécie. O par de *primers* TP53-3 apresentou fragmentos inespecíficos junto ao fragmento de tamanho esperado em *A. australis*, apesar dos esforços em otimização da temperatura de anelamento dos *primers*. Assim, em projetos futuros, a perspectiva é realizar o sequenciamento do material a partir de fragmentos purificados diretamente do gel de agarose.

A amplificação interespecífica diferencial dos *primers* desenhados sugere que alterações genéticas podem estar em vigor para os genes *TP53*, *NOTCH1* e *SF3B1* dentro de indivíduos da superfamília Pinnipedia, possivelmente impedindo o uso de *primers* desenhados para espécies filogeneticamente próximas. A ausência do motivo TP13, conservado entre todos os membros de Carnivora, em *Phoca vitulina*, a presença do motivo N1 quase de forma exclusiva entre todos os membros de Otariidae e a ausência de SF17 e presença de SF18 em *Zalophus californianus*, além da evolução diferencial de TP53 entre membros de Pinnipedia, são indicativos que corroboram com essa hipótese. Porém, esse resultado difere do esperado, uma vez que as sequências desses genes demonstraram conservação entre os pinípedes avaliados. É possível que isso seja reflexo de um banco de dados genéticos ainda em formação para esses animais, onde as poucas sequências disponíveis não são representativas do *pool* gênico dessas populações. Por outro lado, sem o genoma da espécie, não se pode descartar a hipótese de que *A. australis* possua mutações exclusivas que se relacionem com o câncer.

A disponibilidade apenas de amostras tumorais armazenadas em bloco de parafina foi um grande desafio para o desenvolvimento do trabalho, já que os métodos de extração de DNA de tecidos nessa forma de armazenamento é desafiador. A avaliação completa de mutações relacionadas ao câncer na espécie será mais fidedigna uma vez que o material genético de células tumorais possa ser utilizado. Como perspectivas futuras para a compreensão do papel dos genes *TP53* e *SF3B1* na tumorigênese em *A. australis*, espera-se que, além do sequenciamento dos fragmentos mencionados, seja realizada a análise de expressão das proteínas

p53 e SF3B1 nas amostras parafinizadas do linfonodo tumoral e de linfonodos não tumorais da mesma espécie.

REFERÊNCIAS

- ABEGGLEN, L. M. et al. Potential Mechanisms for Cancer Resistance in Elephants and Comparative Cellular Response to DNA Damage in Humans. **JAMA**, v. 314, n. 17, p. 1850–1860, 3 nov. 2015.
- ARREAZA, G. et al. Pre-Analytical Considerations for Successful Next-Generation Sequencing (NGS): Challenges and Opportunities for Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Tissue (FFPE) Samples. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1579, set. 2016.
- ARRUGA, F. et al. Functional impact of *NOTCH1* mutations in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, v. 28, n. 5, p. 1060–1070, maio 2014.
- BAILEY, T. L. et al. MEME Suite: tools for motif discovery and searching. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. suppl_2, p. W202–W208, 1 jul. 2009.
- BOSSART, G. D. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 3, p. 676–690, maio 2011.
- BROWNING, H. M. et al. Evidence for a genetic basis of urogenital carcinoma in the wild California sea lion. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1796, p. 20140240, 7 dez. 2014.
- BROWNING, H. M. et al. Common cancer in a wild animal: the California sea lion (*Zalophus californianus*) as an emerging model for carcinogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1673, p. 20140228, 19 jul. 2015.
- CALLIER, V. Solving Peto's Paradox to better understand cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 6, p. 1825–1828, 5 fev. 2019.
- CARDENAS, S.; OLIVEIRA, L.; CRESPO, E. **Arctocephalus australis (South American fur seal)**. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**. [s.l.: s.n.].
- CHESON, B. D. What Is New in Lymphoma? **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 54, n. 5, p. 260–272, 1 set. 2004.
- CHOMPRET, A. et al. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 12, p. 1932–1937, jun. 2000.
- CILLONI, D. et al. SF3B1 Mutations in Hematological Malignancies. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4927, jan. 2022.
- CRESPO, E. A. et al. Status, population trend and genetic structure of South American fur seals, *Arctocephalus australis*, in southwestern Atlantic waters. **Marine Mammal Science**, v. 31, n. 3, p. 866–890, 2015.

DAGLEISH, M. P. et al. The First Report of Otarine Herpesvirus-1-Associated Urogenital Carcinoma in a South American Fur Seal (*Arctocephalus australis*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 149, n. 1, p. 119–125, 1 jul. 2013.

DE AMORIM, D. et al. B-cell small lymphocytic lymphoma in a free-ranging South American fur seal (*Arctocephalus australis*). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 156, p. 1–6, 12 out. 2023.

DE AMORIM, D. B. **Estudo de causa mortis de *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783) (lobo-marinho-sul-americano) no litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

DE OLIVEIRA, L. R. et al. Morphological and genetic evidence for two evolutionarily significant units (ESUs) in the South American fur seal, *Arctocephalus gazella*. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 6, p. 1451–1466, 1 dez. 2008.

D'HAESELEER, P. What are DNA sequence motifs? **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 423–425, abr. 2006.

DOONAN, J. H.; SABLowski, R. Walls around tumours — why plants do not develop cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 11, p. 794–802, nov. 2010.

DUARTE-BENVENUTO, A. et al. CLINICO-PATHOLOGIC FINDINGS AND PATHOGEN SCREENING IN FUR SEALS (*ARCTOCEPHALUS AUSTRALIS* AND *ARCTOCEPHALUS TROPICALIS*) STRANDED IN SOUTHEASTERN BRAZIL, 2018. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 58, n. 1, p. 86–99, 1 nov. 2021.

FILLMANN, G. et al. Accumulation patterns of organochlorines in juveniles of *Arctocephalus australis* found stranded along the coast of Southern Brazil. **Environmental Pollution**, v. 146, n. 1, p. 262–267, 1 mar. 2007.

GIANFELICI, V. Activation of the *NOTCH1* pathway in chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica**, v. 97, n. 3, p. 328–330, mar. 2012.

GOH, A. M.; COFFILL, C. R.; LANE, D. P. The role of mutant p53 in human cancer. **The Journal of Pathology**, v. 223, n. 2, p. 116–126, 2011.

GOUVEIA, G. R. et al. Comparação de três protocolos distintos para extração de RNA de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, p. 649–654, dez. 2011.

GULLAND, F. M. D. et al. Persistent Contaminants and Herpesvirus OtHV1 Are Positively Associated With Cancer in Wild California Sea Lions (*Zalophus californianus*). **Frontiers in Marine Science**, v. 7, 2020.

JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Bioinformatics**, v. 8, n. 3, p. 275–282, 1 jun. 1992.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KEANE, M. et al. Insights into the evolution of longevity from the bowhead whale genome. **Cell Reports**, v. 10, n. 1, p. 112–122, 6 jan. 2015.

KOVACS, Z. et al. DNA extraction from paraffin embedded colorectal carcinoma samples: A comparison study of manual vs automated methods, using four commercially kits. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 10, n. 9, p. 307–317, 24 set. 2019.

LEAL, M. O. **Descrição da doença oncológica em *Arctocephalus pusillus pusillus*- estudo realizado num parque zoológico**. Lisboa: Centro Universitário de Lisboa, 2016.

LIN, J. et al. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. **Analytical Biochemistry**, v. 395, n. 2, p. 265–267, 15 dez. 2009.

LIU, Y.-F. et al. Somatic Mutations and Genetic Variants of *NOTCH1* in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Occurrence and Development. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24014, 1 abr. 2016.

LOPES, H.; CRUZ, L. M. **Computational Biology and Applied Bioinformatics**. [s.l.] BoD – Books on Demand, 2011.

MCALOOSE, D.; NEWTON, A. L. Wildlife cancer: a conservation perspective. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 7, p. 517–526, jul. 2009.

NAYA, D. E.; ARIM, M.; VARGAS, R. Diet of South American Fur Seals (*Arctocephalus australis*) in Isla De Lobos, Uruguay. **Marine Mammal Science**, v. 18, n. 3, p. 734–745, 2002.

NEWMAN, S. J.; SMITH, S. A. Marine Mammal Neoplasia: A Review. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 6, p. 865–880, 1 nov. 2006.

PARADIS, E. et al. Package ‘ape’. **Analyses of phylogenetics and evolution, version 2.4**, v. 2, n. 4, 2019.

REISFELD, L. et al. Myeloid and histiocytic sarcomas in subantarctic fur seals *Arctocephalus tropicalis*, Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 148, p. 13–18, 10 fev. 2022.

SAMY, A.; OZDEMIR, M. K.; ALHAJJ, R. Studying the connection between SF3B1 and four types of cancer by analyzing networks constructed based on published research. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 2704, 15 fev. 2023.

SANTOS, F. P. S.; O'BRIEN, S. Small Lymphocytic Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia: Are They the Same Disease? **The Cancer Journal**, v. 18, n. 5, p. 396–403, set. 2012.

SATO, Y. et al. Comparison of the DNA Extraction Methods for Polymerase Chain Reaction Amplification from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues: **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 10, n. 4, p. 265–271, dez. 2001.

SCHIFFMAN, J. D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1673, p. 20140231, 19 jul. 2015.

SCHLIEP, K. P. phangorn: phylogenetic analysis in R. **Bioinformatics**, v. 27, n. 4, p. 592–593, 15 fev. 2011.

SEGUEL, M. et al. Pathological Findings in South American Fur Seal Pups (*Arctocephalus australis gracilis*) found Dead at Guafo Island, Chile. **Journal of Comparative Pathology**, v. 145, n. 2, p. 308–317, 1 ago. 2011.

SELUANOV, A. et al. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 46, p. 19352–19357, 17 nov. 2009.

SULAK, M. et al. *TP53* copy number expansion is associated with the evolution of increased body size and an enhanced DNA damage response in elephants. **eLife**, v. 5, p. e11994, 19 set. 2016.

SUTTON, L.-A.; ROSENQUIST, R. Deciphering the molecular landscape in chronic lymphocytic leukemia: time frame of disease evolution. **Haematologica**, v. 100, n. 1, p. 7–16, jan. 2015.

TARIN, D. **Understanding Cancer: The Molecular Mechanisms, Biology, Pathology and Clinical Implications of Malignant Neoplasia**. Cham: Springer International Publishing, 2023.

TAVARES, M. Padrões de deriva, enalhe e persistência de carcaças de tetrápodes marinhos na costa sul brasileira. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2021.

TEES, M. T.; FLINN, I. W. Chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: two faces of the same disease. **Expert Review of Hematology**, v. 10, n. 2, p. 137–146, fev. 2017.

VINCZE, O. et al. Cancer risk across mammals. **Nature**, v. 601, n. 7892, p. 263–267, jan. 2022.

VOGELSTEIN, B.; GILLESPIE, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 2, p. 615–619, fev. 1979.

WAN, Y.; WU, C. J. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 121, n. 23, p. 4627–4634, 6 jun. 2013.

WICKHAM, H. ggplot2. **WIREs Computational Statistics**, v. 3, n. 2, p. 180–185, mar. 2011.

WOZENCRAFT, W. C. Order Carnivora. Em: WILSON, DON. E.; REEDER, D. M. (Eds.). **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**. Baltimore: JHU Press, 2005. p. 532–628.

WRIGHT, E. S. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. **The R Journal**, v. 8, n. 1, p. 352–359, 2016.

XU, J. et al. **Mortality in the United States, 2021**. [s.l.] National Center for Health Statistics (U.S.), 22 dez. 2022. Disponível em: <<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/122516>>. Acesso em: 26 mar. 2023.

YLITALO, G. M. et al. The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (*Zalophus californianus*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 1, p. 30–39, 1 jan. 2005.

YOUNES, A.; COIFFIER, B. (EDS.). **Lymphoma: Diagnosis and Treatment**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013.

YU, G. Using ggtree to Visualize Data on Tree-Like Structures. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 69, n. 1, p. e96, mar. 2020.

ZHOU, Z. et al. The biological function and clinical significance of *SF3B1* mutations in cancer. **Biomarker Research**, v. 8, n. 1, p. 38, dez. 2020.

APÊNDICE A - Script no R para produção de árvore filogenética

```
#GENE SF3B1

#ABRINDO OS PACOTES NECESSÁRIOS
library(DECIPHER)
require(phangorn)
library(rhierbaps)
library(phytools)
library(ape)
library(ggtree)

#ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS
fas3 <- "/Users/beatr/Documents/sf3b1/protein_sf3b1.txt"
fas3
dna <- readAAStringSet(fas3)
dna
alinhamentoSF3B1 <- AlignSeqs(dna)
BrowseSeqs(alinhamentoSF3B1)
writeXStringSet(alinhamentoSF3B1,
file="/Users/beatr/Documents/sf3b1/alinhaSF3B1.fas") #cria e salva o
arquivo de alinhamento na pasta

#ABRIR O ARQUIVO
#Escolher o diretorio primeiro e ler o arquivo
wilds3 <- read.phyDat(file = "alinhaSF3B1.fas", format = "fas", type =
"AA")
wilds3
class(wilds3)

#Metodo de distancias
dm = dist.ml(wilds3, model="JTT")
treeNJ <- NJ(dm)
plot(treeNJ)

# run all available amino acid models
(mt3 <- modelTest(wilds3, model="JTT", multicore=TRUE))

env <- attr(mt3, "env")
ls(envir=env)
View(mt3)
```

```

#FIT MAXIMUM LIKELIHOOD TREE WITH EVOLUTION MODEL
fit_ML <- eval(get("JTT+G(4)+I", env), env)
tree_ML= optim.pml(fit_ML, rearrangement = "stochastic",
                  optGamma=TRUE, optInv=TRUE, model="JTT")

#Analise de bootstrap
bs <- bootstrap.pml(tree_ML, bs=500, optNni=TRUE, control =
pml.control(trace = 0))
bs

#Desenho da arvore
par(mar=c(0.001, 0.001, 0.001, 0.001))
MLtree = plot(tree_ML, type="fan")

tree = plotBS(midpoint(tree_ML$tree), bs, p = 70, type="phylogram",
tiplabels(pch=19))

#Combining structure and phylogenetic tree
par(mar = c(0.001, 0.4, 0.001, 0.001))
gg <- ggtree(tree, layout = "circular")
gg <- gg + geom_tiplab(size = 7, offset = FALSE)#Se n?o desNULLgg <- gg
+ geom_tiplab(size = 3, offset = FALSE)#Se n?o desejar que apare?a, n?o
rodar
gg <- gg + geom_nodelab(geom = "text",
                      hjust = 1, size = 5)
gg = gg + geom_highlight(node = 44, fill = "red", alpha = 2)

gg

#PARA IDENTIFICAR OS NÚMEROS DOS NÓS
require(tidytree)
as.treedata(gg)
gg %>% as.treedata %>% as_tibble
print(gg)

tiff('arvoresSFparaTCC.tiff', units="in", width=22, height=23, res=600,
compression = 'lzw')
gg
dev.off()

```

APÊNDICE B - *Script* no R para confecção de mapa

```
#MAP IN GGLOT - https://r-spatial.org/r/2018/10/25/ggplot2-sf-3.html

library("ggplot2")
library("sf")
library("rnaturalearth")
library("rnaturalearthdata")

world <- ne_countries(scale='medium',returnclass = 'sf')

#BRAZIL, HIGHLIGHTING THE SAMPLED AREAS
(BRAZIL <- ggplot(data = world) +
  geom_sf(fill = "antiquewhite1") +
  geom_rect(xmin = -52, xmax = -48, ymin = -31, ymax = -28,
    fill = NA, colour = "black", size = 1) +
  coord_sf(xlim = c(-75, -35), ylim = c(5, -38), label_axes =
waiver())+
  # xlab("Longitude")+ ylab("Latitude")
  theme(panel.grid.major = element_line(colour = gray(0.5), linetype
= "dashed", size = 0.2),
panel.background = element_rect(fill = "aliceblue"),
panel.border = element_rect(fill = NA)))

#THE MAIN SITES
sites <- st_as_sf(data.frame(longitude = c(-51.230000, -50.209742,
-50.122169, -50.124778, -50.131754, -49.986827, -50.263792, -50.193700,
-50.043888),
latitude = c(-30.033056, -30.196328,
-29.983784, -29.989778, -30.006538, -29.417257, -30.333436, -30.155500,
-29.800833)), coords = c("longitude", "latitude"), crs = 4326, agr =
"constant")

(locals <- ggplot(data = world) +
  geom_sf(fill = "antiquewhite1") +
  geom_sf(data = sites, size = 6, shape = 19, fill = "darkred", col =
c("black", "darkgreen", "darkgreen", "darkgreen",
"darkgreen", "darkgreen", "darkgreen", "darkgreen", "darkgreen"))+

```


APÊNDICE C - Códigos das espécies utilizadas neste trabalho

Espécie	Gene	Gene ID
<i>Acinonyx jubatus</i>	TP53	106972437
<i>Acinonyx jubatus</i>	NOTCH1	106989563
<i>Acinonyx jubatus</i>	SF3B1	106979985
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	TP53	100468516
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	NOTCH1	100468934
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	SF3B1	100477819
<i>Callorhinus ursinus</i>	TP53	112817082
<i>Callorhinus ursinus</i>	NOTCH1	112814602
<i>Callorhinus ursinus</i>	SF3B1	112840713
<i>Canis lupus dingo</i>	TP53	112647438
<i>Canis lupus dingo</i>	NOTCH1	112677443
<i>Canis lupus dingo</i>	SF3B1	112656476
<i>Canis lupus familiaris</i>	TP53	403869
<i>Canis lupus familiaris</i>	NOTCH1	480676
<i>Canis lupus familiaris</i>	SF3B1	488456
<i>Enhydra lutris kenyoni</i>	NOTCH1	111145671
<i>Enhydra lutris kenyoni</i>	SF3B1	111145177
<i>Eumetopias jubatus</i>	TP53	114225325
<i>Eumetopias jubatus</i>	NOTCH1	114201903
<i>Eumetopias jubatus</i>	SF3B1	114222822
<i>Felis catus</i>	TP53	493847
<i>Felis catus</i>	NOTCH1	101094384
<i>Felis catus</i>	SF3B1	101088016
<i>Halichoerus grypus</i>	TP53	118526306
<i>Halichoerus grypus</i>	NOTCH1	118537627
<i>Halichoerus grypus</i>	SF3B1	118545127
<i>Hyaena hyaena</i>	TP53	120231386
<i>Hyaena hyaena</i>	NOTCH1	120221947
<i>Hyaena hyaena</i>	SF3B1	120222073
<i>Leopardus geoffroyi</i>	TP53	123604339
<i>Leopardus geoffroyi</i>	NOTCH1	123592630
<i>Leopardus geoffroyi</i>	SF3B1	123599270
<i>Leptonychotes weddellii</i>	TP53	102726420
<i>Leptonychotes weddellii</i>	NOTCH1	102747848
<i>Leptonychotes weddellii</i>	SF3B1	102734520
<i>Lontra canadensis</i>	TP53	116856570
<i>Lontra canadensis</i>	NOTCH1	116872723
<i>Lontra canadensis</i>	SF3B1	116869170
<i>Lutra lutra</i>	TP53	125087037
<i>Lutra lutra</i>	SF3B1	125094969
<i>Lynx canadensis</i>	TP53	115500807
<i>Lynx canadensis</i>	NOTCH1	115499370
<i>Lynx canadensis</i>	SF3B1	115521829
<i>Lynx rufus</i>	TP53	124519563
<i>Lynx rufus</i>	NOTCH1	124522322
<i>Lynx rufus</i>	SF3B1	124516532

Espécie	Gene	Gene ID
<i>Meles meles</i>	TP53	123929470
<i>Meles meles</i>	NOTCH1	123952727
<i>Meles meles</i>	SF3B1	123950561
<i>Mirounga angustirostris</i>	TP53	123854560
<i>Mirounga angustirostris</i>	NOTCH1	123850151
<i>Mirounga angustirostris</i>	SF3B1	123838986
<i>Mirounga leonina</i>	TP53	118000034
<i>Mirounga leonina</i>	NOTCH1	118017516
<i>Mirounga leonina</i>	SF3B1	118012183
<i>Mustela erminea</i>	TP53	116578338
<i>Mustela erminea</i>	NOTCH1	116570741
<i>Mustela erminea</i>	SF3B1	116597006
<i>Mustela lutreola</i>	TP53	131815809
<i>Mustela lutreola</i>	NOTCH1	131812256
<i>Mustela lutreola</i>	SF3B1	131827622
<i>Mustela nigripes</i>	TP53	132003790
<i>Mustela nigripes</i>	NOTCH1	132024235
<i>Mustela nigripes</i>	SF3B1	132013418
<i>Mustela putorius furo</i>	TP53	101677794
<i>Mustela putorius furo</i>	NOTCH1	101683079
<i>Mustela putorius furo</i>	SF3B1	101682461
<i>Neofelis nebulosa</i>	TP53	131496929
<i>Neofelis nebulosa</i>	NOTCH1	131491068
<i>Neofelis nebulosa</i>	SF3B1	131500801
<i>Neomonachus schauinslandi</i>	TP53	110584444
<i>Neomonachus schauinslandi</i>	NOTCH1	110581307
<i>Neomonachus schauinslandi</i>	SF3B1	110592295
<i>Neovison vison</i>	TP53	122906719
<i>Neovison vison</i>	NOTCH1	122917128
<i>Neovison vison</i>	SF3B1	122902150
<i>Nyctereutes procyonoides</i>	TP53	129497070
<i>Nyctereutes procyonoides</i>	NOTCH1	129509494
<i>Nyctereutes procyonoides</i>	SF3B1	129522726
<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	TP53	101362427
<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	NOTCH1	101380913
<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	SF3B1	101376277
<i>Panthera leo</i>	TP53	122206426
<i>Panthera leo</i>	NOTCH1	122205364
<i>Panthera leo</i>	SF3B1	122226441
<i>Panthera onca</i>	TP53	132688368
<i>Panthera onca</i>	NOTCH1	132663762
<i>Panthera onca</i>	SF3B1	132671688
<i>Panthera tigris</i>	TP53	102962571
<i>Panthera tigris</i>	NOTCH1	102957861
<i>Panthera tigris</i>	SF3B1	102960594
<i>Panthera uncia</i>	TP53	125927023
<i>Panthera uncia</i>	NOTCH1	125923906
<i>Panthera uncia</i>	SF3B1	125911335
<i>Phoca vitulina</i>	TP53	116649291
<i>Phoca vitulina</i>	NOTCH1	116641068
<i>Phoca vitulina</i>	SF3B1	116633155

Espèce	Gene	Gene ID
<i>Prionailurus bengalensis</i>	TP53	122484900
<i>Prionailurus bengalensis</i>	NOTCH1	122474354
<i>Prionailurus bengalensis</i>	SF3B1	122481607
<i>Prionailurus viverrinus</i>	TP53	125151405
<i>Prionailurus viverrinus</i>	NOTCH1	125150308
<i>Prionailurus viverrinus</i>	SF3B1	125172120
<i>Puma concolor</i>	TP53	112856999
<i>Puma concolor</i>	SF3B1	112848744
<i>Puma yahouaroundi</i>	TP53	121015982
<i>Puma yahouaroundi</i>	NOTCH1	121022839
<i>Puma yahouaroundi</i>	SF3B1	121030870
<i>Suricata suricatta</i>	TP53	115281719
<i>Suricata suricatta</i>	SF3B1	115287577
<i>Ursus americanus</i>	TP53	123792132
<i>Ursus americanus</i>	NOTCH1	123796348
<i>Ursus americanus</i>	SF3B1	123798164
<i>Ursus arctos</i>	TP53	113271152
<i>Ursus arctos</i>	NOTCH1	113248639
<i>Ursus arctos</i>	SF3B1	113250629
<i>Ursus maritimus</i>	TP53	103660368
<i>Ursus maritimus</i>	NOTCH1	103675283
<i>Ursus maritimus</i>	SF3B1	103659709
<i>Vulpes lagopus</i>	TP53	121499929
<i>Vulpes lagopus</i>	NOTCH1	121472943
<i>Vulpes lagopus</i>	SF3B1	121480539