



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA**

**KEITTY ARAUJO DOS REIS**

***SCREENING DE ALTERAÇÕES NA REGIÃO *HOTSPOT* DO GENE *BRCA2* EM  
TUMORES DE MAMA CANINOS***

**Belém  
2015**

**KEITTY ARAUJO DOS REIS**

***SCREENING DE ALTERAÇÕES NA REGIÃO *HOTSPOT* DO GENE *BRCA2* EM  
TUMORES DE MAMA CANINOS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**Área de concentração:** Biotecnologia Animal

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bárbara do Nascimento Borges.

**Belém  
2015**

---

Reis, Keitty Araujo dos

*Screening* de alterações na região *hotspot* do gene *BRCA2* em tumores de mama caninos / Keitty Araujo dos Reis - Belém, 2015.

70 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia aplicada a agropecuária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2015.

Orientadora: Bárbara do Nascimento Borges.

1. Cadela - tumor mamário 2. BRCA2 3. Mutação genética. 4. Carcinogênese mamária 5. Cadela - neoplasia mamária I. Borges, Bárbara do Nascimento (Orient.) II. Título

---

CDD – 636.70832

---

**KEITTY ARAUJO DOS REIS**

***SCREENING DE ALTERAÇÕES NA REGIÃO *HOTSPOT* DO GENE *BRCA2* EM  
TUMORES DE MAMA CANINOS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Biotecnologia Animal.

Data da aprovação:

31/03/2015

**Banca Examinadora**

\_\_\_\_\_Orientador

Prof. Dra. Bárbara do Nascimento Borges (ISARH – UFRA)

\_\_\_\_\_Membro Titular

Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo (ICB – UFPA)

\_\_\_\_\_Membro Titular

Prof. Dr. Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos (ICB – UFPA)

\_\_\_\_\_Membro Titular

Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano (ICB – UFPA)

\_\_\_\_\_Membro Suplente

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira (ICEN – UFPA/IEC)

*Aos meus pais, Pedro Reginaldo e Sandra Maria.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ser tão Bom e Fiel, fazendo-se presente através da sua Divina Providência. Tudo para a honra e glória do Senhor!

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Bárbara do Nascimento Borges que me ajudou muito aceitando ser minha orientadora já no meio da caminhada, tranquilizando-me dando direção e segurança em minha dissertação. Sou muito grata ao seu profissionalismo e dedicação à pesquisa.

Aos membros da Banca Examinadora, pelo aceite em participar da avaliação desta dissertação contribuindo com suas sugestões e críticas construtivas.

Ao Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da UFRA, pela ajuda e apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus pais, Pedro Reginaldo e Sandra Maria, que sempre me apoiam na caminhada profissional, e acreditam muito no meu potencial. Espero poder corresponder as suas expectativas. É tudo para conseguir, futuramente, o melhor para vocês. Muito obrigada por tudo! Amo vocês!

À minha muito amada família, Hildo Silva e Sophia Reis dos Santos por todo o apoio, carinho e compreensão nessa jornada do mestrado. Sem o carinho de vocês com certeza seria muito mais difícil. Amo muito vocês!

À minha irmã, Patrícia Reis, ao meu cunhado Marcos Almeida e meu afilhado Marco Antonio pelo apoio e ajuda, principalmente pela “santa” internet, além dos momentos de descontração em meio às noites mal dormidas, por conta dos estudos, na casa de vocês.

À Alice Rodrigues, minha sogra, e à Tia Flora pela ajuda durante o período do mestrado, sou muito grata pelo apoio em que me deram principalmente com a Sophia.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular “Francisco Mauro Salzano” da Universidade Federal do Pará, muito obrigada pela acolhida e pela ajuda. Em especial a Raissa Melo, que foi muito generosa em me ajudar nessa etapa profissional da minha vida, serei eternamente grata! Obrigada também a Mayra Pacheco, Mariceli Baia e Natália Kiss que tive a oportunidade de conviver e partilhar muitas coisas.

Aos meus amigos de coração Verena Ferreira e Andre Meneses pelos conselhos, pelos momentos de descontração, e apoio nas decisões referentes ao mestrado.

Aos amigos de turma do mestrado: Dennis Lima, Marcone Helmer, Mayara, Marilza, Natália, Rodrigo e aos outros, por nosso convívio e principalmente pela ajuda nas disciplinas básicas, foi maravilhoso, o que mostra que sempre devemos ajudar uns aos outros.

A todos que de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Cadeia mamária e respectiva drenagem linfática de uma fêmea canina.....17
- Figura 2** - Canino da raça Husk Siberiano, fêmea, com tumor de mama, na mama inguinal direita ..... 20
- Figura 3** - Representação do gene *BRCA2* no cromossomo 25 de cão (*Canis lupus familiaris*).....25
- Figura 4** - Representação da proteína do gene *BRCA2* e seus sítios de interação com outras proteínas.....27
- Figura 5** - Representação do gene *BRCA2* com seus 27 éxons, e destaque para a região codificadora das repetições BRC, éxon 11.....27
- Figura 6** - Representação do ciclo celular e atuação de *BRCA1* e *BRCA2* no reparo do DNA por recombinação homóloga..... 29
- Figura 7** - Representação da capacidade de *BRCA2* ligar-se ao longo da cadeia simples de DNA, que será reparada por recombinação homóloga.....30
- Figura 8** - Eletroferograma com as alterações genéticas observadas nas amostras sequenciadas para o éxon 11. **1:** AAA→GAA (A<sup>355</sup>G, adenina para guanina); **2:** CCC→AAA (CCC<sup>1954</sup>AAA, citosinas para adeninas); **3:** TCC→TCA (C<sup>2121</sup>A, citosina para adenina); **4:** AAA→AGA (A<sup>2414</sup>G, adenina para guanina), número de acesso no *GenBank*:FJ464406.1, XM005635378.1.....48
- Figura 9** - Eletroferograma com a alteração genética G/A (10.753.421), no éxon 12, observada nas amostras sequenciadas. (1) Amostra homozigota e (2) heterozigota para este evento.....51
- Figura 10** - Eletroferograma com a alteração genética A/G, no éxon 24, observada em duas amostras das analisadas. (1) e (2) ambas heterozigotas para este evento.....53
- Figura 11** - Eletroferograma representando amostra homozigota para o evento 10204 insAAA, no éxon 27 do gene *BRCA2* canino.....57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para os tumores mamários caninos (adaptado de CASSALI <i>et al.</i> , 2014).....	21
<b>Tabela 2</b> - Classificação dos tumores mamários em cadelas segundo a Organização Mundial da Saúde.....	23
<b>Tabela 3</b> - Iniciadores utilizados para a reação da cadeia em polimerase dos éxons 5, 11, 12, 24 e 27 do gene <i>BRCA2</i> canino.....	36
<b>Tabela 4</b> - Relação das amostras pareadas (tumoral e não tumoral do mesmo animal) com o diagnóstico histopatológico, idade, raça e sexo.....	38
<b>Tabela 5</b> - Relação das amostras não-pareadas (apenas tumoral) com o diagnóstico histopatológico, idade, raça e sexo.....	39
<b>Tabela 6</b> - Relação de amostras de tipo tumoral e as alterações encontradas no éxon 11 do gene <i>BRCA2</i> canino .....	46
<b>Tabela 7</b> - Relação das amostras de tecido não tumoral e as alterações encontradas no éxon 11 do gene <i>BRCA2</i> canino.....	47
<b>Tabela 8</b> - Relação das amostras de tipo tumoral e as alterações encontradas no éxon 12 do gene <i>BRCA2</i> canino.....	49
<b>Tabela 9</b> - Relação das amostras de tecido não tumoral e as alterações encontradas no éxon 12 do gene <i>BRCA2</i> canino.....	50
<b>Tabela 10</b> - Relação das amostras de tipo tumoral e a alteração encontrada no éxon 24 do gene <i>BRCA2</i> canino.....	51
<b>Tabela 11</b> - Relação das amostras de tecido não tumoral apresentando o alelo selvagem A no éxon 24 do gene <i>BRCA2</i> canino.....	52
<b>Tabela 12</b> - Relação das amostras de tipo tumoral e as alterações encontradas no éxon 27 do gene <i>BRCA2</i> canino.....	54
<b>Tabela 13</b> - Relação das amostras de tecido não tumoral e as alterações encontradas no éxon 27 do gene <i>BRCA2</i> canino.....	55

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Distribuição das raças dos 23 caninos acometidos por tumor de mama.....	40
<b>Gráfico 2</b> - Distribuição dos tipos histopatológicos quanto a histogênese do tumor mamário apresentado pelos 23 animais do presente estudo.....	41
<b>Gráfico 3</b> - Distribuição dos animais castrados e não castrados.....	42
<b>Gráfico 4</b> - Distribuição das fêmeas que faziam uso de contraceptivos e acometidas pelo tumor de mama.....	42
<b>Gráfico 5</b> - Distribuição das fêmeas que apresentavam ou não pseudociese e foram acometidas pelo tumor de mama canino.....	43
<b>Gráfico 6</b> - Distribuição da ocorrência de processo metastático nos 23 animais estudados com tumor de mama canino.....	44

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	10
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	13
1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1.1 Câncer.....	15
1.1.2 Tumor de Mama em Caninos.....	17
1.1.2.1 Etiologia e Predisposição.....	18
1.1.2.2 Manifestações Clínicas e Diagnóstico.....	19
1.1.2.3 Tipos Histopatológicos.....	21
1.1.2.4 Tratamento.....	22
1.1.2.5 Prognóstico.....	23
1.1.2.6 Alterações genética.....	24
1.1.3 BRCA-2.....	25
1.1.3.1 Definição e Estrutura.....	25
1.1.3.2 Função da proteína BRCA2.....	28
1.1.3.3 Alterações no Gene <i>BRCA2</i> .....	31
<b>2 SCREENING DE ALTERAÇÕES NA REGIÃO HOTSPOT DO GENE BRCA2 EM TUMORES DE MAMA CANINOS</b> .....	34
2.1 INTRODUÇÃO.....	34
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.2.1 Coleta das Amostras.....	35
2.2.2 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	36
2.2.3 Análise das Mutações do Gene <i>BRCA2</i> e Análise Estatística.....	37
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
2.3.1 Características Gerais dos Animais.....	37
2.3.2. Análise de Alterações do Gene <i>BRCA2</i> .....	44
2.3.2.1 Éxon 11.....	44
2.3.2.2 Éxon 12.....	48
2.3.2.3 Éxon 24.....	51
2.3.2.4 Éxon 27.....	53
<b>CONCLUSÃO</b> .....	58
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	59
<b>ANEXO 1</b> - Aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (UFRA) .....	68
<b>ANEXO 2</b> - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	69
<b>ANEXO 3</b> - Tabela com informações gerais sobre os animais do estudo.....	70

## RESUMO

Os tumores mamários são neoplasias frequentes em fêmeas caninas. Representando 25 a 50% dos tumores caninos, e 50% destes são considerados malignos. São considerados especiais para os pesquisadores devido às similaridades com o câncer de mama humano. A identificação de fatores de risco genéticos é fundamental para a melhoria da prevenção, diagnóstico e tratamento. O principal fator genético envolvido na carcinogênese mamária é a alteração de genes supressores de tumor, incluindo o *BRCA2*. Quando mutado representa grande risco ao desenvolvimento de tumor de mama. Com isso, o presente estudo tem por objetivo identificar alterações na região *hotspot* do gene *BRCA2* relacionadas com o desenvolvimento de tumores mamários caninos, com a análise dos éxons 11, 12, 24 e 27, que são os mais estudados na espécie canina, para esse gene e os quais apresentam alterações já descritas por literatura, a fim de identificar alterações gênicas em caninos que apresentam tumor mamário, correlacionando as alterações encontradas com os aspectos histopatológicos, e identificando possíveis marcadores do processo tumoral para a construção de kits de diagnóstico e prognóstico da doença. Foram utilizadas amostras, de tecido mamário neoplásico e não-neoplásico de caninos atendidos no HOVET/UFRA. As amostras foram armazenadas em microtubos com RNA Later® e conservadas a temperatura de -20 °C. A extração do DNA foi feita pelo método de fenol-clorofórmio, e posteriormente realizada a PCR. A identificação das alterações foi realizada no programa BioEdit v.5.0.6, pelo alinhamento das sequências obtidas com os éxons correspondentes oriundas do GenBank. Para análise estatística foram utilizados os testes Qui-Quadrado, teste G, e Exato de Fisher, *Odds Ratio* através do programa GraphPad Prism 6.0. Foram utilizadas 40 amostras de 23 animais, dos quais apenas um era macho, faixa etária entre 4 a 15 anos, várias raças com a raça Poodle sendo a mais acometida depois dos cães sem raça definida, com histogênese tumoral do tipo sarcoma sendo mais frequente. Na análise das alterações encontradas foi observado que o éxon 11 apresentou o maior número de polimorfismos na região *hotspot* analisada: A<sup>355</sup>G, CCC<sup>1954</sup>AAA, C<sup>2121</sup>A, A<sup>2414</sup>G e A<sup>511</sup>C; sendo que apenas a alteração A<sup>511</sup>C não foi correlacionada com aumento de risco de desenvolver tumores quando comparada com as características clínicas e histopatológicas dos pacientes. O éxon 12 apresentou um polimorfismo G/A (rs23255542), sendo que as frequências alélicas deste não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos tumorais e não tumorais analisados, e que a presença do alelo mutante em indivíduos que fizeram uso de anticoncepcional aumentou em 13 vezes o risco de desenvolvimento de tumores, sugerindo que esta alteração pode influenciar, mesmo sem causar mudança de aminoácido, na tumorigênese mamária canina. A única alteração observada no éxon 24 (A/G, posição 7747634) foi encontrada apenas em heterozigose em uma baixa frequência na população estudada, enquanto que o polimorfismo do tipo indel observado no éxon 27 (10204 ins/del AAA) apresentou frequências alélicas que não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este evento, apesar de ser observado em uma alta frequência na população estudada, não foi correlacionado com nenhuma característica clínica ou histopatológica analisada. Desta forma, pode-se sugerir que os polimorfismos dos éxons 11 e 12 apresentam potencial como biomarcadores da tumorigênese mamária canina na população estudada.

**Palavras-chave:** Tumor mamário canino. *BRCA2*. Mutação.

## ABSTRACT

Breast tumors are common tumors in female dogs. Representing 25 to 50% of canine tumors, and 50% are considered malignant. They are considered special for researchers due to similarities to human breast cancer. The identification of genetic risk factors is crucial to improving the prevention, diagnosis and treatment. The main genetic factor involved in mammary carcinogenesis is the alteration of tumor suppressor genes, including BRCA2. When mutated is great risk to develop breast tumor. Thus, this study aims to identify changes in the BRCA2 gene hotspot region related to the development of canine mammary tumors, with the analysis of exons 11, 12, 24 and 27, which are the most studied in dogs, for that gene and which shows changes already described in literature in order to identify genetic alterations in dogs that have mammary tumor correlating the changes found with the histopathological features, and identify potential markers of tumor process for the construction of diagnostic kits and prognosis disease. Samples were used, of neoplastic breast tissue and non-neoplastic canine treated at HOVET / UFRA. The samples were stored in microtubes with RNA Later® and stored at -20 ° C. DNA extraction was performed with phenol-chloroform method, and then performed PCR. The identification of changes took place in BioEdit v.5.0.6 program, by aligning the sequences obtained with the corresponding exons derived from GenBank. Statistical analysis was performed using the chi-square test, G test and Fisher exact test, odds ratio by GraphPad Prism 6.0. 40 samples of 23 animals were used, of which only one was male, aged between 4-15 years, several races with the Poodle being the most affected after the mongrel dogs with tumor histogenesis sarcoma type is more frequent. In the analysis of the changes found it was observed that the exon 11 had the highest number of polymorphisms in the hotspot region analyzed: A355G, CCC1954AAA, C2121A, A2414G and A511C; and only the change A511C was not correlated with increased risk of developing tumors compared with the clinical and pathological characteristics of the patients. The exon 12 had a G / A polymorphism (rs23255542), and allele frequencies of this were not in Hardy-Weinberg equilibrium in tumor groups and non-tumor analyzed and that the presence of the mutant allele in individuals who used contraceptive increased 13 times the risk of developing tumors, suggesting that this alteration may influence even without causing amino acid change in canine mammary tumorigenesis. The only change observed in exon 24 (A / G, position 7,747,634) was found only in heterozygous at a low frequency in the population, while the polymorphism of indel type observed in exon 27 (10204 ins / del AAA) showed allelic frequencies They are not in Hardy-Weinberg equilibrium. This event, despite being observed at a high frequency in the population studied, was not correlated with any clinical or histopathological characteristics analyzed. Thus, it may be suggested that polymorphisms of exons 11:12 have potential as biomarkers of canine mammary tumorigenesis in this population

**Keywords:** Canine mammary tumor. BRCA2. Mutation.

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O aumento da ocorrência de neoplasias em canídeos torna-se um problema cada vez mais presente no dia a dia de clínicas ou hospitais veterinários, devido ao aumento da expectativa média de vida destes animais (PROENÇA, 2009). Em decorrência da melhoria dos cuidados da saúde, além da melhoria dos testes de diagnósticos na comunidade veterinária, que possibilitam a obtenção de diagnósticos mais precisos de determinadas enfermidades (DAVIS & OSTRANDER, 2014).

Os tumores mamários são neoplasias frequentes em fêmeas caninas, ficando atrás apenas dos tumores de pele (FONSECA & DALECK, 2000). Representam 25 a 50% dos tumores caninos, sendo que 50% destes são considerados malignos (DALECK *et al.*, 1998; CASSALI, 2000; KLOPFLEISCH *et al.*, 2011). São detectados em animais de meia idade e velhos (RIVERA & EULER, 2011).

Os tumores mamários espontâneos de cães têm interesse especial para os pesquisadores que trabalham com neoplasias em razão de algumas similaridades com o câncer de mama humano (RAMOS *et al.*, 2012; PINHO *et al.*, 2012). Na cadela, a frequência dos tumores mamários espontâneos é duas a três vezes superior à observada na mulher (RIBEIRO *et al.*, 2009; SHAFIEE *et al.*, 2013). Apresentam várias características epidemiológicas, clínicas, histopatológicas, e o comportamento biológico, como o estabelecimento do tumor e a progressão metastática, semelhantes ao da espécie humana (CASSALI, 2000; ZUCCARI *et al.*, 2008; PINHO *et al.*, 2012). Segundo Pinho *et al.* (2012) a maior parte das alterações genéticas associadas ao câncer, que desempenham papel no desenvolvimento e progressão do tumor mamário, são semelhantes em ambas espécies. Além disso, a descoberta da alta homologia e similaridade do genoma canino com o genoma humano destaca a relevância da utilização do cão para a pesquisa oncológica.

Devido a essas semelhanças e também em algumas alterações moleculares, o tumor de mama canino torna-se de interesse crescente, e visto, desta forma, como modelo adequado para estudos comparativos com a espécie humana (CASSALI, 2000; ZUCCARI *et al.*, 2008; KLOPFLEISCH *et al.*, 2011; TAVASOLY *et al.*, 2013). Porém, em contraste com os seres humanos, de uma maneira geral, ainda há poucas informações sobre os mecanismos que contribuem para o desenvolvimento desses tumores em caninos (KLOPFLEISCH *et al.*, 2011).

A elevada incidência desse tipo de neoplasia relatada em certas raças puras sugere um componente genético envolvido, como descrito em tumor de mama humano hereditário, onde

familiares apresentam alterações associadas aos genes *BRCA1* e *BRCA2* (RIVERA & EULER, 2011). Sabe-se atualmente que a desregulação desses genes está significativamente associada ao desenvolvimento do tumor mamário tanto em mulheres como em cães (PINHO *et al.*, 2012; ENGINLER *et al.*, 2014).

A identificação de fatores de risco genéticos é fundamental para a melhoria da prevenção, diagnóstico e tratamento desses tumores. E isso tem sido o foco de intensa investigação por oncologistas veterinários e patologistas nas últimas décadas (PENA *et al.*, 2014). Em relação ao tumor de mama canino há o aumento do interesse, principalmente pela elevada incidência e complexidade da evolução clínica dessa enfermidade, em grande parte reflexo do diagnóstico tardio, que compromete o tratamento e reduz a taxa de sobrevivência dos animais (CASSALI *et al.*, 2011; HORTA *et al.*, 2012).

Tem-se desenvolvido maneiras de incorporar métodos de biologia molecular para estudar diretamente alterações genéticas, para a busca do diagnóstico precoce e preciso de inúmeras doenças, o que auxilia o entendimento de sua patogênese e traz novas perspectivas para um tratamento ou prevenção mais eficazes, oferecendo qualidade de vida para o paciente (SEGAL *et al.*, 2001).

Na medicina veterinária tem-se buscado a utilização desses métodos biotecnológicos para o melhor entendimento da carcinogênese nos animais. No caso do tumor mamário em caninos é importante que seja verificada também a ocorrência de alterações nos genes envolvidos nessa doença, como é o caso do gene supressor *BRCA2*.

Visando isso, o objetivo do presente estudo é identificar alterações na região *hotspot* do gene *BRCA2* relacionadas com o desenvolvimento de tumores mamários caninos, com a análise dos éxons 11, 12, 24 e 27, que são os éxons mais estudados para esse gene e os quais apresentam alterações já conhecidas segundo literatura (YOSHIKAWA *et al.*, 2005; HSU *et al.*, 2009; BERGE *et al.*, 2011; ENGINLER *et al.*, 2013), a fim de identificar alterações gênicas em tecidos tumoral e não tumoral de cadelas que apresentam tumor mamário, correlacionando as alterações encontradas com os aspectos histopatológicos, e identificando possíveis marcadores do processo tumoral para a construção de kits de diagnóstico e prognóstico da doença.

## 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1 Câncer

O câncer é causado por alterações genéticas nas células, devido ao acúmulo de danos contínuos que afetam o crescimento ou a diferenciação celular (HEEMST *et al.*, 2007).

A proliferação e a diferenciação celular são processos rigorosamente controlados para atender às necessidades do organismo. Qualquer alteração nos mecanismos que regulam esses processos pode modificar a fisiologia da célula normal e, eventualmente, conduzir ao desenvolvimento de um tumor (AMENDOLA & VIEIRA, 2005).

A instabilidade genômica é uma característica importante das células cancerosas, e várias são as causas desta instabilidade. Esses danos não são restritos as células neoplásicas e sim também para qualquer célula não neoplásica a qualquer momento (KLOPFLEISCH *et al.*, 2011). Visando a integridade do genoma e por consequência a sobrevivência as células apresentam mecanismos de reparo que removem, eficientemente, a maior parte das lesões que o DNA sofre a partir de fontes endógenas e exógenas (LEVITT & HICKSON, 2002). Devido a grande variedade de formas de danos ao DNA, as células de mamíferos apresentam variadas ferramentas de reparo, como: reparação não homóloga, recombinação homóloga, reparo por excisão de bases, reparo por excisão de nucleotídeo, reparo por incompatibilidade, e síntese translesão (KLOPFLEISCH *et al.*, 2011).

Entretanto, uma pequena parcela destes danos não chega a ser reparado ou é reparado de forma inadequada. A replicação de DNA, transcrição de genes, reparo do DNA e *checkpoints* do ciclo celular devem ser interligados para promover a sobrevivência de células após danos no seu material genético e preservar a integridade dos cromossomos, e isto requer uma resposta altamente coordenada, com a ativação de vias adequadas de reparo (LEVITT & HICKSON, 2002).

Diversos defeitos podem ocorrer nas proteínas que participam do reparo por excisão de nucleotídeo, do reparo de erros de pareamento, do reparo por recombinação e da síntese do DNA (NELSON & COX, 2011). Dessa forma, quando esse reparo não é realizado efetivamente, ocorre mutação. Estas, quando acumuladas, alteram a função de genes que regulam direta ou indiretamente a proliferação ou a sobrevivência das células, como os proto-oncogenes e genes supressores de tumor (AMENDOLA & VIEIRA, 2005; DE PAULA *et al.*, 2012), o que pode resultar num processo neoplásico.

Essas duas classes de genes têm papel importante no desenvolvimento do câncer, pois quando desempenham suas funções normais, atuam controlando o ciclo celular em uma rigorosa sequência de eventos. Os proto-oncogenes estimulam, enquanto os genes supressores inibem os processos de divisão celular. Quando alterados, são responsáveis pela proliferação descontrolada das células, característica do processo tumorigênico (RIVOIRE *et al.*, 2006).

Quando alterados os proto-oncogenes tornam-se oncogenes, que são carcinogênicos e causam multiplicação celular excessiva, pelo aumento de sua expressão ou pela produção de uma forma mais ativa de sua proteína, de modo que a proliferação celular seja contínua e independente de estímulos externos. As mutações responsáveis pelas alterações nesta classe de genes são, geralmente, dominantes, bastando que um dos alelos esteja alterado para que o fenótipo neoplásico se manifeste. Os genes supressores de tumores, em contrapartida, contribuem para o desenvolvimento do processo neoplásico quando são inativados por mutações, que resultem na perda de sua ação, privando a célula de controles cruciais para a inibição do crescimento inapropriado (AMENDOLA & VIEIRA, 2005; RIVOIRE *et al.*, 2006; NELSON & COX, 2011). Genes supressores de tumor podem ser agrupados em duas categorias principais: *gatekeepers* e *caretakers*.

*Gatekeepers* regulam negativamente a proliferação celular ou positivamente a morte celular programada (apoptose) ou a parada do ciclo celular de células com acúmulo de danos, protegendo a mesma de um crescimento desordenado. A presença do alelo selvagem de um gene *gatekeeper* é suficiente para assegurar o controle da proliferação celular. Somente quando ambos os alelos são inativados é que o fenótipo maligno se manifesta. Quando um gene dessa categoria apresenta alteração, promove o crescimento de células tumorais. Já os *caretakers* apresentam a função de proteger contra danos e mutações, através da supressão indireta do crescimento neoplásico, codificando proteínas que atuam na manutenção da integridade do genoma, sendo que a perda de sua atividade causa instabilidade genômica (LEVITT & HICKSON, 2002; VENKITARAMAN, 2002; AMENDOLA & VIEIRA, 2005; HEEMST *et al.*, 2007).

A existência de numerosos distúrbios de instabilidade cromossômica em que mutações germinativas de um gene *caretaker* podem levar tanto a instabilidade do genoma quanto a uma predisposição ao câncer, reforça a importância destes genes em suprimir transformação neoplásica (LEVITT & HICKSON, 2002). O principal fator genético envolvido na carcinogênese mamária é a alteração de genes supressores de tumor. Dentre estes genes, destacam-se *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*, essenciais para preservar a estrutura dos cromossomos,

e na supressão da instabilidade do genoma (SEGAL *et al.*, 2001; VENKITARAMAN, 2002; HEEMST *et al.*, 2007).

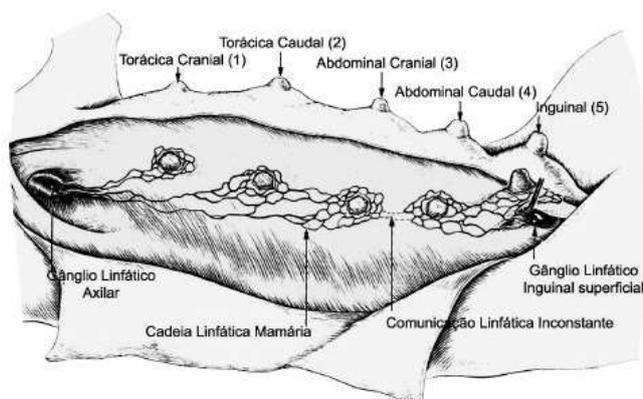
Em uma célula normal, o equilíbrio fisiológico entre supressores tumorais e oncogenes mantém a homeostase e permite a proliferação das células cuidadosamente regulado sem crescimento descontrolado do tumor maligno (Berger *et al.*, 2011).

### 1.1.2 Tumor de Mama em Caninos

Os tumores mamários caninos são as neoplasias mais frequentes em fêmeas caninas não castradas (CIRILLO, 2008; RIVERA *et al.*, 2009; RIVERA & EULER, 2011). São considerados tumores heterogêneos quanto à patologia e ao comportamento clínico (RIVERA & EULER, 2011).

A cadela apresenta, em média, cinco pares de glândulas mamárias (Figura 1), entretanto seu número pode variar de 4 a 6 pares de glândulas (QUEIROGA & LOPES, 2002), sendo que as glândulas abdominal e inguinal caudal são afetadas com maior frequência do que as torácicas (DALECK *et al.*, 1998; QUARESMA, 2008).

**Figura 1** - Cadeia mamária e respectiva drenagem linfática de uma fêmea canina.



Fonte: Adaptado Queiroga & Lopes, 2002.

Essa neoplasia mamária representa 25 a 50% dos tumores caninos, sendo que 50% destes são considerados malignos (DALECK *et al.*, 1998; CIRILLO, 2008; KLOPFLEISCH *et al.*, 2011; CASSALI *et al.*, 2014). Quando malignos, geralmente o evento de metástase ocorre via vasos linfáticos para os linfonodos regionais ou por via hematológica, e os pulmões são o local mais frequente de metástase à distância (SHAFIEE *et al.*, 2013). Sendo a causa mais comum de morte nos pacientes acometidos (KLOPFLEISCH *et al.*, 2011).

#### 1.1.2.1 Etiologia e Predisposição

Como no câncer de mama em mulheres, fatores não-genéticos e genéticos estão envolvidos na etiologia dessa neoplasia em cadelas (RIVERA & EULER, 2011). Segundo Borge *et al.* (2011), é uma doença multifatorial com interação forte entre fatores genético e ambiental.

De acordo CIRILLO (2008), os tumores de mama são fortemente dependente de hormônios. Nas cadelas, 50% a 80% dos tumores mamários malignos epiteliais expressam receptores de estrógeno, e 44% receptores de estrógeno e progesterona. Por esta razão recomenda-se a ovariectomia (OH) antes do primeiro cio, visto que quanto mais precocemente for realizada a castração do animal, menor será o risco de desenvolvimento da neoplasia.

Segundo Ramos *et al.* (2012), a OH realizada antes do primeiro estro reduz o risco de desenvolvimento da neoplasia mamária para 0,05%; aumentando o risco significativamente nas fêmeas esterilizadas após o primeiro ciclo estral (8,0%) e o segundo (26%). Após dois anos e meio de idade ou já no segundo cio esse procedimento já não apresenta um efeito protetor contra o aparecimento do tumor (CIRILLO, 2008; JOHSON, 2010; RAMOS *et al.*, 2012; NAGATA *et al.*, 2014).

Os progestágenos utilizados para suprimir o estro promovem alterações hiperplásicas e neoplásicas nas glândulas mamárias de cadelas (JOHSON, 2010). De acordo com Ramos *et al.* (2012), a utilização regular de drogas hormonais, em fêmeas ou em machos, aumenta em três vezes o risco de aparecimento de carcinomas e tumores benignos. Além do uso de progestágenos, o desenvolvimento de pseudocistes também parece ser responsável pelo aparecimento precoce de tumores de mama em cadelas (OLIVEIRA *et al.*, 2003; SILVA *et al.* 2004).

Acomete geralmente animais de meia idade e velhos, entre 7 e 12 anos de idade (CIRILLO, 2008; RIVERA & EULER, 2011). No que diz respeito à raça, algumas raças de cães com *pedigree* possuem uma maior incidência de tumor de mama do que outras, indicando uma significativa influência de fatores de riscos genéticos (BORGE *et al.*, 2011; DOBSON, 2013). Entre as raças que apresentam alto risco, estão *Boxer*, *Springer Spaniel Inglês*, *Poodle*, *Cocker Spaniel*, *Dachshund*, *Setter Inglês* e *Fox Terrier* (BORGE *et al.*, 2011). Dalekc *et al.* (2008), relatam os caninos sem raça definida (S.R.D.) com alta incidência desse tipo de tumor.

Além disso, a obesidade, e a dieta baseada em comida caseira - principalmente com elevada ingestão de carnes bovinas, suínas e gordura animal - estão relacionadas com maior ocorrência destes tumores (ZUCCARI *et al.*, 2008; TORÍBIO *et al.*, 2012a).

Segundo Rivera *et al.* (2009), nenhum padrão hereditário foi descrito para tumores mamários em cães, semelhante aos encontrados em humanos, embora tenha relatos de predisposição em algumas raças.

#### 1.1.2.2 Manifestações Clínicas e Diagnóstico

A avaliação clínica através do exame físico das cadelas com tumores de mama é fundamental para determinar o estadiamento clínico, e obter um maior entendimento sobre o comportamento biológico da neoplasia, proporcionando informações de significado diagnóstico, prognóstico e do tratamento quimioterápico utilizado (TORÍBIO *et al.*, 2012b). Para isso é importante também que o clínico obtenha informações acerca do histórico do animal, referentes ao ciclo reprodutivo (se é regular, números de nascimentos, castração, uso de terapia hormonal, aborto e ocorrência de pseudociese), e início e velocidade de crescimento das lesões (CASSALI *et al.*, 2011).

As neoplasias mamárias apresentam-se, geralmente, como nódulos circunscritos, com tamanho variável, com 0,5 cm de diâmetro até tumores com mais de 15 cm no seu maior diâmetro, consistência e mobilidade para a pele e músculo, podendo também estar associado com a ulceração da pele e regiões com reações inflamatórias (QUEIROGA & LOPES, 2002; CASSALI *et al.*, 2011).

Estes tumores são frequentemente observados numa glândula mamária (Figura 6), mas também podem envolver várias glândulas mamárias simultaneamente, inclusive sendo de diferentes tipos histológicos (CASSALI *et al.*, 2011).

**Figura 2** - Canino da raça Husk Siberiano, fêmea, com tumor de mama, na mama inguinal direita.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

É importante que seja avaliado, além da cadeia mamária da paciente, os linfonodos para verificação de um possível envolvimento por metástase. Esta avaliação geralmente é realizada por citopatologia, através da punção aspirativa por agulha fina (PAAF), visto que esse método apresenta 100% sensibilidade e 96% de especificidade para a identificação de metástases (CIRILLO, 2008; CASSALI *et al.*, 2014; MATOS *et al.*, 2012).

O estadiamento clínico é determinado de acordo com o Sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para os tumores mamários caninos. E tem como avaliação do tamanho da lesão primária (T), o acometimento de linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M) (Tabela 1) (CASSALI *et al.*, 2014).

Para que seja determinado tal estadiamento, devem ser realizados exames complementares, principalmente o de imagem na região torácica para diagnóstico de doença metastática pulmonar (CASSALI *et al.*, 2011). De acordo com Muramoto *et al.* (2011) o exame ultrassonográfico dos linfonodos regionais também pode ser utilizado para detecção de metástase.

O diagnóstico do tumor é confirmado por biópsia excisional e exame histopatológico (CIRILLO, 2008; CASSALI *et al.*, 2014). É essencial que seja realizado o exame anatomopatológico de todos nódulos independentemente de seu tamanho, pois este oferece informações adicionais importantes que podem ajudar a definir o prognóstico e o tratamento mais adequado (CASSALI *et al.*, 2011). Além da classificação, o exame histopatológico permite avaliar a infiltração, tecidos e vasos sanguíneos circundantes, detalhes sobre a histomorfologia do tumor (presença ou ausência de pleomorfismo, grau de diferenciação, índice mitótico, presença ou ausência de necrose) e contribui para uma excisão precisa (FERREIRA *et al.*, 2003).

**Tabela 1:** Sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para os tumores mamários caninos (adaptado de CASSALI *et al.*, 2014).

<b>SISTEMA MODIFICADO</b>			
<b>T - Tumor Primário</b>			
T1 < 3 cm			
T2 3-5 cm			
T3 > 5 cm			
<b>N - Linfonodo Regional</b>			
N0 (Histologia ou citologia) - Ausência de Metástase			
N1 (Histologia ou citologia) - Presença de Metástase			
<b>M - Metástase a Distância</b>			
M0 - Ausência de metástase à distância			
M1 - Presença de metástase à distância			
	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Estágio I</b>	T1	N0	M0
<b>Estágio II</b>	T2	N0	M0
<b>Estágio III</b>	T3	N0	M0
<b>Estágio IV</b>	Qualquer T	N1	M0
<b>Estágio V</b>	Qualquer T	Qualquer N	M1

A imunohistoquímica pode ser utilizada também para o diagnóstico e prognóstico de neoplasias mamárias (CIRILLO, 2008). Segundo Cassali *et al.* (2014) os marcadores moleculares podem prever o comportamento de vários tipos de câncer em seres humanos e animais, para os tumores de mama caninos os mais utilizados na imunohistoquímica são: receptores hormonais (- receptor ER e progesterona - receptor de estrogênio PR), a COX-2, um marcador de o índice de proliferação do tumor (Ki-67), um marcador de angiogênese (CD31), factor de crescimento epidérmico (EGF), moléculas de adesão (E -cadherin e  $\beta$ -catenina), Her-2 e p53.

### 1.1.2.3 Tipos Histopatológicos

A classificação histológica é fundamental para a determinação prognóstica e para a escolha do tratamento (MARTINS, 2008), além de ser uma ferramenta valiosa para prever o comportamento biológico do tumor (CASSALI *et al.*, 2014).

A classificação mais adotada dos tumores mamários em cadelas é a proposta por Misdorp *et al.* (1999), e adotada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Tabela 2) (CASSALI *et al.*, 2014). Esta classificação é estabelecida com base na morfologia descritiva de acordo com o grau de malignidade, essa característica indica uma redução considerável na taxa de sobrevivência do animal acometido (FERREIRA *et al.*, 2003).

Quanto à histogênese, as neoplasias malignas na glândula mamária, podem ser de origem epitelial (carcinoma), com envolvimento de células epiteliais dos ductos ou alvéolos, de células mioepiteliais adjacentes ao epitélio dos ductos ou alvéolos; ou podem ter origem mesenquimal (sarcomas), a partir de células do tecido conjuntivo intersticial (DALECK *et al.*, 2008; SORENMO *et al.*, 2011).

#### 1.1.2.4 Tratamento

O tratamento básico para neoplasias mamárias em cães é a excisão cirúrgica da tumoração (TAVASOLY *et al.*, 2013). As opções cirúrgicas são: nodulectomia, mamectomia, mastectomia em bloco e mastectomia total uni ou bilateral. A escolha da técnica dependerá do número de mamas acometidas, tamanho e localização da formação, fixação a tecidos adjacentes e estado geral do animal. A remoção dos linfonodos regionais deverá ser realizada de acordo com a localização da(s) glândula(s) acometida(s) (CIRILLO, 2008).

A quimioterapia é indicada no tratamento de doença sistêmica ou metastática. Deve ser aplicada às neoplasias mamárias como uma terapia adjuvante, que associada à cirurgia, tem por objetivo tentar obter a cura do animal. A quimioterapia antineoplásica visa evitar uma recidiva local, o aparecimento de metástases e eliminar qualquer célula neoplásica residual que possa existir após a excisão cirúrgica do tumor (CIRILLO, 2008).

Uma outra opção seria a terapia endócrina adjuvante, que após a detecção dos receptores hormonais pode ser um tratamento promissor para os animais que não respondem devidamente à técnica de mastectomia (FONSECA E DALECK, 2000).

**Tabela 2-** Classificação dos tumores mamários em cadelas segundo a Organização Mundial da Saúde.

<b>Neoplasias malignas</b>	
<b>1 Carcinomas</b>  <b>1.1 Carcinoma <i>in situ</i></b> 1.1.1 Carcinoma Ductal <i>in situ</i> 1.1.2 Carcinoma Lobular <i>in situ</i> <b>1.2 Carcinoma em tumor misto</b> <b>1.3 Carcinoma Papilar</b>   <b>1.4 Carcinoma Tubular</b> <b>1.5 Carcinoma Sólido</b>  <b>1.6 Tipos especiais de carcinoma</b> 1.6.1 Carcinoma Micropapilar 1.6.2 Carcinoma Lobular Invasivo 1.6.3 Carcinoma Lobular Pleomórfico 1.6.4 Carcinoma Secretório 1.6.5 Carcinoma Mucinoso 1.6.6 Carcinoma Rico em Lipídios 1.6.7 Carcinoma de Célula Escamosa 1.6.8 Carcinoma de Células Fusiformes 1.6.9 Carcinoma Anaplásico 1.6.10 Neoplasias Mamárias com Sebócitos Diferenciados <b>1.7 Neoplasias mioepitelial</b> 1.7.1 Adenomioepitelioma Maligno	<b>2 Sarcomas</b>  <b>2.1 Fibrossarcoma</b>  <b>2.2 Osteossarcoma</b> <b>2.3 Carcinossarcoma</b>  <b>2.4 Sarcoma em tumor misto</b> <b>2.5 Outros sarcomas</b> 2.5.1 Condrossarcoma 2.5.2 Lipossarcoma 2.5.3 Hemangiossarcoma
<b>Neoplasias benignas</b>	
Adenoma Adenomioepitelioma Adenoma Basaloide Fibroadenoma Tumor misto benigno	

Fonte: Adaptada de CASSALI *et al.* 2014.

#### 1.1.2.5 Prognóstico

O prognóstico depende de diversas variáveis que estão relacionadas com as características clínicas do tumor, como tamanho, presença de ulceração cutânea e padrão de crescimento; com o estadiamento clínico da doença, como invasão vascular e linfática,

regional ou à distância; e com as características histológicas, como tipo histológico, grau histológico e índice mitótico. Sendo assim, tumores de grande tamanho, com ulceração da pele, crescimento tumoral e infiltração na presença de invasão vascular, metástase, e altos índices de proliferação são significativamente associados com taxas de sobrevida reduzidas (QUEIROGA & LOPES, 2002; QUARESMA, 2008; ZUCCARI *et al.*, 2008; CASSALI *et al.*, 2009).

#### 1.1.2.6 Alterações genéticas

Como em humanos, várias alterações genéticas são associadas ao risco aumentado de câncer em caninos. Acredita-se que a responsabilidade para o desenvolvimento de câncer de mama seja uma característica poligênica conferida por um grande número de locos, onde cada um contribui com um pequeno efeito sobre o risco dessa doença (Rivera *et al.*, 2009).

Segundo Rivera e Euler (2011), em humanos vários são os genes de susceptibilidade ao câncer de mama, contribuindo de forma alta, média e baixa para o desenvolvimento do neoplasma, entre eles estão: os de maiores riscos estão *BRCA1* e *BRCA2*, seguidos por Caderina 1 (*CDH1*), Nibrin (*NBH*), neurofibrina (*NF1*), fosfatase e homólogo angiotensina (*PTEN*), proteína relacionada transformação-53 (*TP53*), e serina/treonina proteína quinase 11 (*STK11*); genes que com médio risco, estão a ataxia-telangiectasia mutante (*ATM*), *BRCA1* interagindo com a proteína C-terminal helicase 1 (*BRIP1*), quinase checkpoint 2 (*CHEK2*), sócio e localizador de *BRCA2* (*PALB2*) e *RAD50*; no grupo de genes que oferecem um risco menor são fator de crescimento de fibroblastos 2 (*FGFR2*), proteína específica de linfócitos 1 (*LSP1*), proteína quinase 1 ativada por mitógeno (*MAP3K1*), fator de crescimento  $\beta$  1 (*TGF $\beta$ 1*) e *TOX3*. Entretanto, alterações nesses genes podem oferecer risco para outros tipos de câncer, além do câncer de mama.

No câncer de mama canino é uma doença de origem multifatorial e depende de uma interação entre vários genes principais e secundários, além de fatores ambientais (RIVERA *et al.*, 2009).

De acordo, ainda, com estes autores em suas pesquisas, de 10 genes selecionados (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *ERBB2*, *FGFR2*, *LSP1*, *MAP3K1*, *RCAS1*, *TOX3* e *TP53*) como candidatos à neoplasia mamária apenas os genes *BRCA1* e *BRCA2* foram significativamente associados ao câncer mamário.

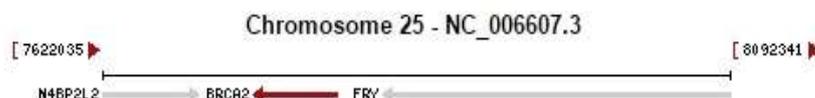
### 1.1.3 BRCA-2

#### 1.1.3.1 Definição e Estrutura

O gene *BRCA2* (*Breast cancer type2*), juntamente com *BRCA1*, são supressores tumorais. São genes grandes e altamente heterogêneos, diferindo quanto à biologia molecular, interações proteicas e quanto aos riscos de câncer (FILIPPINI & VEGA, 2013), e estão relacionados à síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome* ou HBOC) em humanos (GRETARSDOTTIR *et al.*, 1998; EWALD, 2008). Esta síndrome é considerada uma doença autossômica dominante altamente penetrante. As mutações podem ser de origem materna ou paterna, podendo ocorrer quatro ou mais tipos de câncer de mama ou de ovário na família, geralmente em jovens ou de forma bilateral, em câncer de mama (FILIPPINI & VEGA, 2013). No que diz respeito ao câncer de mama não familiar esporádico o complexo BRCA é responsável por cerca de 5% dos casos (RIVERA E EULER, 2009).

Em humanos, este gene está localizado no cromossomo 13 (região 13q12-q13), possui 27 éxons e codifica uma proteína de 3.418 aminoácidos, com poucos motivos reconhecidos (MACHNIEWICZ, 2003; FOULKES & SHUEN, 2013). Em caninos o gene *BRCA2* foi identificado no cromossomo 25, e também contém 27 éxons [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/474180>] (Figura 3), distribuídos em 11 kb de comprimento e codifica 3.471 aminoácidos (HSU *et al.*, 2010). Sua expressão está presente em muitos tecidos (YOSHIDA *et al.*, 2004), especialmente na glândula mamária em cães (OCHIAI *et al.*, 2001).

**Figura 3:** Representação do gene *BRCA2* no cromossomo 25 de cão (*Canis lupus familiaris*).

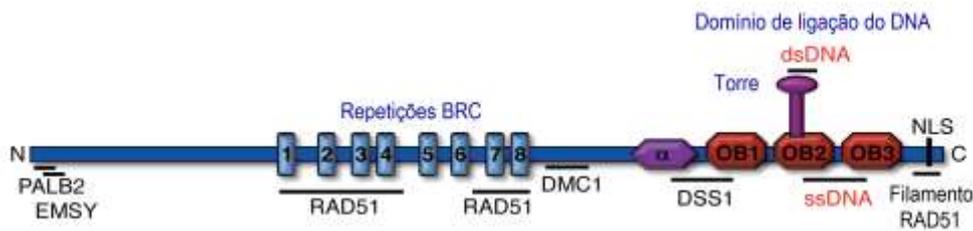


**Fonte:** [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/474180](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/474180)

Ochiai *et al.* (2001) constataram em seus experimentos que a sequência de aminoácidos do BRCA2 canino apresenta 68% de homologia com a proteína humana, e 58% de homologia com a proteína de ratos. A proteína BRCA2 canina é maior do que a do ser humano e de ratos por 53 e 143 aminoácidos, respectivamente. Em relação à sequência nucleotídica, a homologia entre os genes *BRCA2* humano e canino é de 76%, enquanto que entre canino e ratos é de 59%.

Estruturalmente, BRCA2 apresenta: 1) região N-terminal, com 40 resíduos, necessária para a interação com PALB2 (JESEN, 2013); 2) oito repetições chamadas “BRC”, cada uma podendo se ligar e recrutar RAD51 para os locais de danos no DNA, mais especificamente à cadeia simples de DNA (csDNA) resultante da quebra da dupla cadeia do DNA (LEVITT & HICKSON, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2004; O’DONOVAN & LIVINGSTON, 2010; FILIPPINI & VEGA, 2013; JENSEN, 2013); 3) região alfa-hélice que interage com a recombinase DMC1 e contribui para a função de BRCA2 na meiose (JESEN, 2013); 4) três dobras OB (oligonucleoídeo/oligossacarídeo de ligação) - OB1, OB2 e OB3 – que representam um domínio de ligação ao DNA (DBD - *DNA-binding domain*), que permite BRCA2 ligar-se a cadeia simples de DNA (csDNA), gerada por uma quebra de dupla cadeia do DNA, para o carregamento de RAD51 (JESEN, 2013). Acredita-se que OB2 possibilita a ligação de BRCA2 a cadeia dupla de DNA através do domínio de Torre, que consiste em duas alfa hélices longas, que se prolongam para cima (~ 90 angstroms) do domínio OB2 terminando em um feixe de três hélices. Supõem-se que o domínio de Torre faz o reconhecimento entre csDNA e cdDNA, permitindo BRCA2 se ligar preferencialmente a esta última, capturando essa cadeia dupla da cromátide irmã para modelo. Com essa aproximação o filamento de RAD51 pode fazer a invasão para o reconhecimento da homologia entre as cromátides (JESEN, 2013); 5) e por fim a proteína BRCA2 apresenta sinais de localização nuclear (NLS), localizados na região C-terminal da proteína canina, onde RAD51 também pode interagir (OCHIAI *et al.*, 2001; TUTT & ASHWORTH, 2002) (Figura 4).

**Figura 4** – Representação da proteína do gene *BRCA2* e seus sítios de interação com outras proteínas.

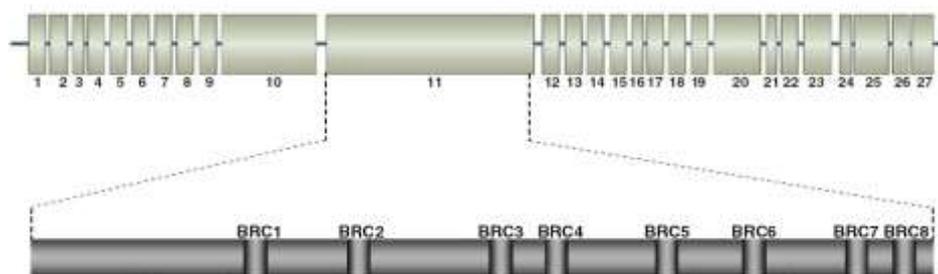


PALB2 = parceiro e localizador de BRCA2; DSS1 (deleted in split foot/hand disease) = deletado na doença do pé/mão dividida; DMC1 = cDNA1 meiótico interrompido;  $\alpha$  = região alfa-hélice; OB = domínio oligonucleotídeo/ oligossacarídeo; NLS = sinais de localização nuclear. Fonte: JENSEN, 2013.

As repetições BRC são conservadas entre as espécies, e sua organização espacial é mantida. Entretanto nem todos os aminoácidos que se encontram entre cada repetição são conservados (OCHIAI *et al.*, 2001, JENSEN, 2013). Essas repetições, em humanos e cães, são codificados pelo éxon 11, que é o maior éxon do gene *BRCA2* (Figura 5) (BIGNELL *et al.*, 1997; HSU *et al.*, 2010). Bignell *et al.* (1997) demonstraram elevado grau de conservação inter-espécies e intra-espécies entre BRC1, 3, 4, 7 e 8, e identificaram uma região de 26 aminoácidos que é conservada em todos os motivos BRC, denominada de sequência consenso BRC.

A região NLS (sinal de localização nuclear) localizada na região C-terminal do gene *BRCA2* é codificada pelo éxon 27, que é o último éxon deste gene. É uma região altamente conservada e desempenha papéis importantes em alguns mamíferos (YOSHIKAWA *et al.*, 2005). Essa região é essencial para a localização nuclear do gene *BRCA2* em humanos, e em caninos isso não deve ser diferente.

**Figura 5** – Representação do gene *BRCA2* com seus 27 éxons, e destaque para a região codificadora das repetições BRC, o éxon 11.



Fonte: Modificado de Hsu *et al.*, 2010.

A importância dos motivos BRC para função de BRCA2 na manutenção da integridade do genoma é sugerida devido a identificação de mutações pontuais dentro das repetições BRC em indivíduos predispostos ao câncer de mama humano (CARREIRA *et al.*, 2009).

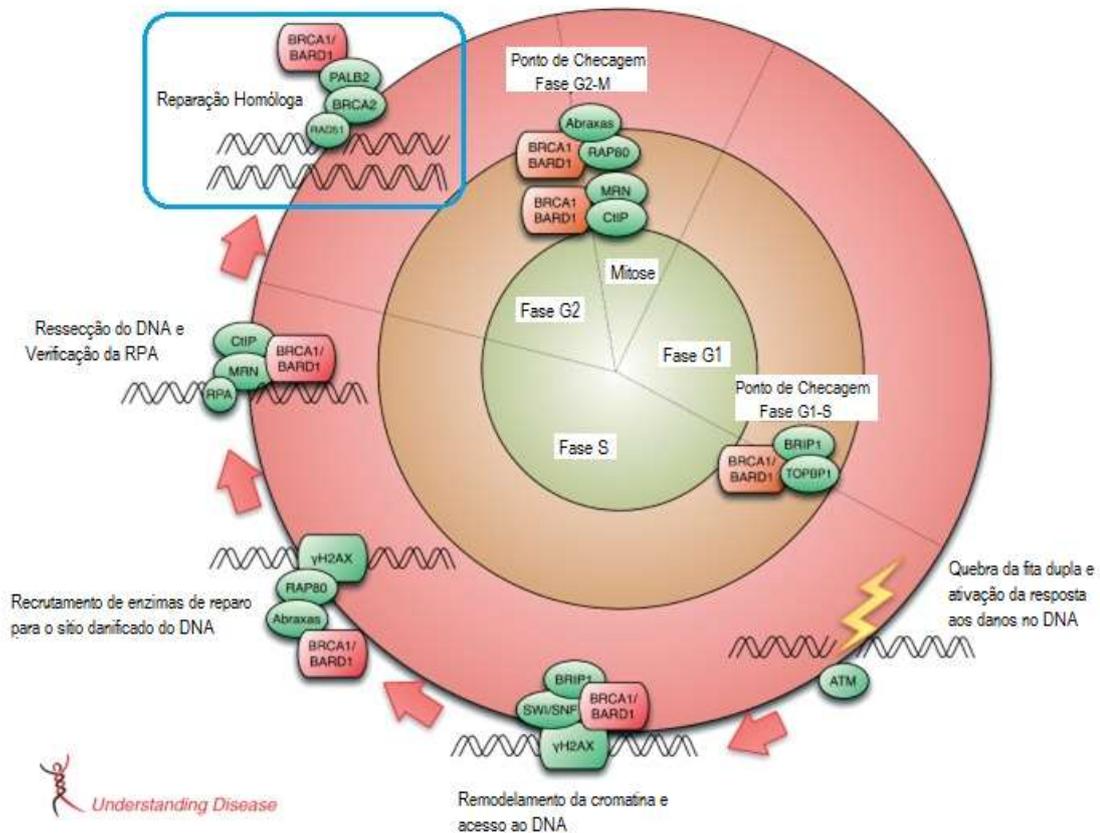
### 1.1.3.2 Função da proteína BRCA2

A proteína BRCA2 está envolvida na manutenção da estabilidade genômica, sendo que as proteínas BRCA desempenham importantes funções em diversos processos celulares, e estão envolvidas na ativação e regulação transcricional, controle do ciclo celular (*checkpoint*), regulação da mitose, diferenciação celular, além do reparo de lesões no DNA principalmente por recombinação homóloga quando ocorre quebra de dupla fita (AMENDOLA & VIEIRA, 2005; EWALD, 2008; PINHO *et al.*, 2012; FILIPPINI & VEGA, 2013).

Alterações/ mutações desse gene levará as células a uma diminuição da capacidade de reparar danos no DNA, como quebra de cadeia dupla. (RIVERA E EULER, 2011)

Quebras de fita dupla do DNA (DSB do inglês) podem surgir espontaneamente ou serem induzidas, por resposta a espécie reativa de oxigênio resultante do metabolismo celular e por radiação ionizante, respectivamente. Podem ocorrer, também, normalmente durante a replicação de DNA, durante a geração de uma diversidade de anticorpos e na meiose. A falha para reparar uma quebra de fita dupla pode resultar em apoptose, enquanto o reparo inadequado pode levar a mutações ou rearranjos cromossômicos tais como translocações e deleções. Ocorrências repetidas destas alterações ao longo do tempo podem promover a carcinogênese. Para evitar tais efeitos patológicos, dois principais mecanismos de reparo de DSB são descritos como utilizados pelas células a junção de pontas não-homólogas (NHJE) e a recombinação homóloga (HR) (O'DONOVAN & LIVINGSTON, 2010). Nesta última há a participação da proteína BRCA2, a qual baseia-se na presença de uma cromátide irmã intacta para atuar como molde para a correta reparação da quebra, sem perda de informação da sequência (YOSHIDA *et al.*, 2004; NELSON & COX, 2011; SUKYO, 2012; FOULKES & SHUEN, 2013; JENSEN, 2013). Este evento ocorre durante as fases S e G<sub>2</sub> do ciclo celular (Figura 6) (O'DONOVAN & LIVINGSTON, 2010; FOULKES & SHUEN, 2013).

**Figura 6** – Representação do ciclo celular e atuação de BRCA1 e BRCA2 no reparo do DNA por recombinação homóloga.



Em azul- papel da proteína brca2 na recombinação homóloga. Fonte: FOULKES & SHUEN, 2013

Devido à atuação das proteínas dos genes *BRCA* nesta via de reparo por recombinação homóloga, a perda completa da função de qualquer uma dessas proteínas conduz a um aumento dramático na instabilidade do genoma (FILIPPINI & VEGA, 2013).

A função primária de BRCA2 na recombinação homóloga é baseada na sua capacidade de ligar-se a RAD51 recombinase (FILIPPINI & VEGA, 2013), regulando a localização intracelular e a função desta proteína, sendo que a interação entre ambas é fundamental para a manutenção da divisão celular e estrutura dos cromossomos (VENKITARAMAN, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2004; DE PAULA *et al.*, 2012).

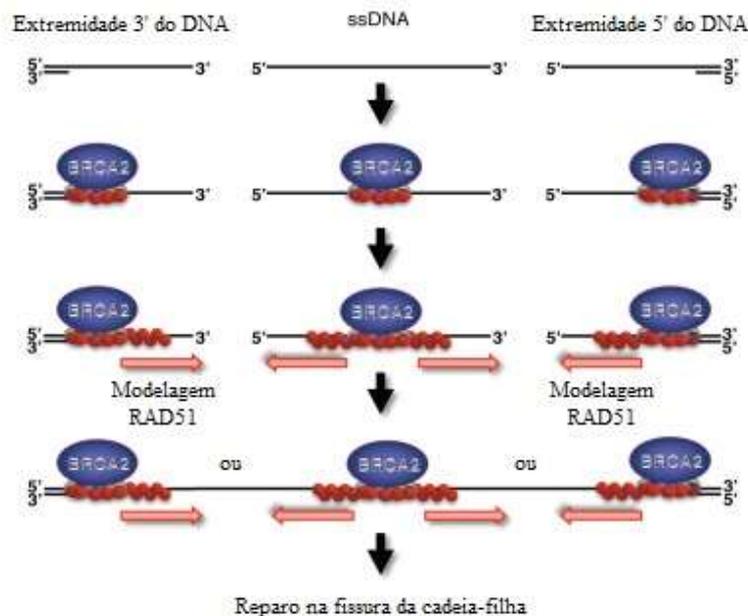
RAD51 forma longos filamentos de nucleoproteína à medida que se associa com a região unifilar exposta. O filamento de DNA-RAD51 então inicia a pesquisa da cromátide-irmã não-danificada para a verificação da sequência complementar que será usada como molde para a síntese de DNA, processo esse chamado de invasão de filamento. A ponta 3' do filamento invasor desloca uma das cromátides-irmãs não-danificadas, o que forma uma alça D (de deslocamento), e a síntese de DNA continua a partir de ambas as pontas 3' até que

ambos os filamentos se desenrolem de seus moldes e se helicoidizem. A ligação fecha os cortes, resultando em um trecho reparado de DNA. (GRIFFITHS *et al.*, 2008)

De acordo com Jesen (2013), BRCA2 possibilita o correto posicionamento de RAD51, através do fornecimento de um núcleo central para ligação de proteínas RAD51. Moléculas livres adicionais de RAD51 podem interagir e estender o filamento a partir deste núcleo estabilizado por BRCA2, simultaneamente ao deslocamento de RPA (proteína de replicação A) no DNA de cadeia simples. Agindo de maneira a estimular e acelerar a ação de RDA51, BRCA2 é considerado uma proteína mediadora da recombinação, que catalisa o início da recombinação homóloga.

BRCA2 apresenta a capacidade, após uma ressecção de uma DSB, de ligar-se a junção entre a cadeia simples de DNA e a cadeia dupla de DNA, e pode ainda ligar-se em vários locais ao longo da cadeia simples, ou pelas extremidades 3' ou 5' dessa cadeia de DNA facilitando o carregamento de RAD51, possibilitando o aumento da formação de seus filamentos nucleoproteína em qualquer extremidade (Figura 7). Além de proporcionar a nucleação do filamento para qualquer direção

**Figura 7:** Representação da capacidade de BRCA2 de ligar-se ao longo da cadeia simples de DNA, que será reparada por recombinação homóloga.



Fonte: Jesen, 2013

Além de RAD51, BRCA2 também interage com PALB2, proteína mediadora que permite a interação entre BRCA1 e BRCA2. O complexo BRCA1/PALB2 faz o recrutamento

de BRCA2, que por sua vez recruta e faz o carregamento da proteína RAD51 para a csDNA. RAD51, acoplando-se a essa cadeia, possibilita o deslocamento de RPA (proteína de replicação A), e com isso há a formação de um filamento nucleoproteína de RAD51 (OCHIAI *et al.*, 2011; FILIPPINI, 2013; FOULKES & SHUEN, 2013; JENSEN, 2013). Estes filamentos catalisam a invasão de cadeia dupla de DNA, iniciando a busca de homologia nas cromátides irmãs intactas e finalizando a recombinação homóloga (O'DONOVAN & LIVINGSTON, 2010; FILIPPINI, 2013; FOULKES & SHUEN, 2013; JENSEN, 2013).

BRCA2 também participa de recombinação meiótica através de sua interação com a recombinase DMC1 (O'DONOVAN & LIVINGSTON, 2010).

### 1.1.3.3 Alterações no Gene *BRCA2*

Mutações neste gene propiciam em humanos riscos ao câncer que podem chegar a 40-84% em neoplasia maligna mamária e de 11-27% para a neoplasia maligna de ovário, além de tornarem tumores sensíveis a agentes que exploram a atividade de reparo de DNA mediada por recombinação homóloga com defeito (FILIPPINI, 2013; FOULKES & SHUEN, 2013).

Portadores destas mutações apresentam um risco maior para predisposição ao câncer de mama e de alto grau para câncer do trato ginecológico e serosa, particularmente ovário, tuba uterina e peritônio, além de câncer de mama e próstata em homens, e câncer no pâncreas. (VENKITARAMAN, 2001; MACHNIEWICZ, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2004; FILIPPINI, 2013; FOULKES & SHUEN, 2013).

Com ausência da ação dos genes *BRCA*, por mutações, a recombinação homóloga não funciona corretamente, o que leva ao reparo dessas quebras por mecanismos passíveis de erros, como a recombinação não-homóloga (NHEJ), que muitas vezes resulta em morte celular (FOULKES & SHUEN, 2013).

Numerosas mutações fundadoras foram identificadas em ambos genes *BRCA*. Outras mutações associadas à doença estão espalhadas por todo a extensão dos genes, que resultam em formação de proteína truncada, o que representa alteração ou perda na função (FILIPPINI, 2013; FOULKES & SHUEN, 2013; JENSEN, 2013; ENGINLER *et al.*, 2014). A maioria das mutações deletérias introduzem códons de terminação prematuros através de pequenas deleções ou inserções de enquadramento, ou grandes deleções ou duplicações. Mutações *missense* deletérias são comumente presentes em resíduos específicos de motivos funcionais (FILIPPINI, 2013; FOULKES & SHUEN, 2013). No entanto, a contribuição de risco de

numerosas outras variantes de sequência, tais como mutações de sentido trocado, pequenas deleções e inserções em grelha, variantes sinônimas, alterações nas sequências não-codificantes ou em regiões exônicas não traduzidas, permanecem obscuras (FILIPPINI, 2013). Vários polimorfismos de nucleotídeo na sequência genômica de *BRCA2* e *BRCA1* foram identificadas em tumor de mama canino quando comparado com tecido mamário normal (KLOPFLEISCH *et al.*, 2011).

Segundo Rivera e Euler (2011), alterações germinativas foram associadas com um alto risco de desenvolvimento de tumores mamários (aproximadamente 4 vezes) em caninos. Segundo ainda esses autores, os genes *BRCA1* e *BRCA2* apresentam maior risco ao desenvolvimento de tumor de mama canino dentre diversos genes de susceptibilidade analisados, como *CDH1*, *NF1*, *PTEN*, *TP53*, *ATM*, *BRIP1*, *CHEK2*, *PALB2* e *RAD50*.

De acordo com Ochiai *et al.* (2011) mutações no gene *BRCA2* afetam suas interações com a recombinase *RAD51*, o que está associado com um risco aumentado de câncer em humanos. Esses autores obtiveram resultados sugestivos de que *BRCA2* mutantes contendo truncamentos das sequências das repetições BRC podem afetar a força de ligação de *RAD51* e, dessa maneira, concluíram que as diferentes forças de ligação à *RAD51* e a disposição correta das oito repetições BRC são necessárias para a boa execução de recombinação homóloga.

Rivera *et al.* (2009), analisou em caninos da raça Springer Spaniel Inglês 10 genes de susceptibilidade de câncer de mama em humanos, e verificou que apenas os genes *BRCA1* e *BRCA2* foram significativos para o risco de ocorrência dessa doença. Foram encontradas mutações germinativas em *BRCA2*, e *BRCA1*, que foram associadas com o risco aumentado de aproximadamente 4 vezes para tumor mamário canino (RIVERA E EULER, 2011).

Aumento nos níveis de expressão de *BRCA2* e *RAD51* foram encontrados em neoplasia mamária canina metastático e metástase linfática em comparação com adenomas ou glândulas normais o que é indicativo de que este tumor maligno pode ter instabilidade genética (KLOPFLEISCH *et al.*, 2011).

Pinho *et al.* (2012), demonstraram que em câncer mamário canino ocorre a diminuição da expressão do RNA mensageiro do gene *BRCA2* em adenomas e o aumento em adenocarcinomas mamários com metástase linfática, quando comparado com epitélio mamário não-neoplásico.

Em humanos tem-se focado em estudos da região do éxon 11, por ser o maior éxon do gene *BRCA2* e por codificar o domínio de repetições BRC, local crucial para ligação de *RAD51* (RIVERA E EULER, 2011). Hsu *et al.*, (2009) investigaram esse éxon no cão, onde

concluíram que houve uma associação entre o estado clínico-patológico e a variação de nucleotídeo único no éxon 11, aparentemente mais elevada no tecido mamário canceroso do que no tecido saudável. E apresentaram elevada frequência de variação genética em dois *hotspots*, A<sup>511</sup>C e A<sup>2414</sup>G. Yoshikawa *et al.* (2012b), verificaram que duas mutações *missenses* em uma repetição BRC, BRC3, são análogas a duas outras mutações nessa mesma região no gene *BRCA2* em humanos. Essas mutações podem afetar a função desta repetição, consequentemente associada ao tumor mamário em cães e em humanos. E concluíram que devido a essa semelhança nos resultados dessas mutações, o *BRCA2* canino pode ser um bom modelo para o estudo do câncer de mama humano.

Em humanos há relatos de variantes de significado indeterminado (USV do inglês *Variants of unknown significance*) ou variantes não classificadas em ambos genes BRCA (LI *et al.*, 2009; WHILEY *et al.*, 2010; ENGINLER *et al.*, 2013). Em *BRCA2* já foi identificada a alteração p.I2285V (NM\_000059.3: c.6853A>G) em mulheres afetadas com o câncer de mama ou de ovário. Essa alteração tem sido associada ao *splicing* do éxon 12, resultando em uma proteína truncada com a deleção de 32 aminoácidos, com a formação da isoforma *BRCA2ΔE12*, que é mais comumente encontrada em tecidos tumorais mamários do que em tecidos normais dos mesmos indivíduos. Mutações de locais de *splicing* é uma causa comum de exclusão de éxon ou inclusão do íntron, e muitos já têm sido identificados em *BRCA1* e *BRCA2* (LI *et al.*, 2009).

O éxon 27 é responsável pela codificação da região NLS na extremidade C-terminal. E quando ocorre a supressão desta região a proteína *BRCA2* é impedida de sua localização nuclear, e isso pode ocorrer também em caninos. A região C – terminal também é importante para a interação com a recombinase Rad51 (YOSHYKAWA *et al.*, 2005).

Segundo Rivera e Euler (2011), existe pouca informação a partir de estudos maiores, com número de tamanho amostral maior, sobre a existência, frequência, e a importância de mutações e o papel destas no risco de desenvolvimento de tumores mamários em cães.

## 2. SCREENING DE ALTERAÇÕES NA REGIÃO *HOTSPOT* DO GENE *BRCA2* EM TUMORES DE MAMA CANINOS

### 2.1 INTRODUÇÃO

Tumores mamários podem ocorrer em todos os grupos de mamíferos (PINHO *et al.*, 2012). Em caninos essas neoplasias são frequentes em fêmeas, ficando atrás apenas dos tumores de pele (FONSECA & DALECK, 2000). Representam 25 a 50% dos tumores diagnosticados em caninos, sendo que 50% destes são considerados malignos (DALECK *et al.*, 1998; CASSALI, 2000; KLOPFLEISCH *et al.*, 2011).

Os tumores mamários espontâneos de cães têm interesse especial para os pesquisadores que trabalham com neoplasias em razão de algumas similaridades com o câncer de mama humano (RAMOS *et al.*, 2012). Na cadela, a frequência dos tumores mamários espontâneos é duas a três vezes superior à observada na mulher (RIBEIRO *et al.*, 2009; SHAFIEE *et al.*, 2013). Apresentam várias características epidemiológicas, clínicas, histopatológicas, e de comportamento biológico, como o estabelecimento do tumor e a progressão metastática, semelhantes ao da espécie humana (CASSALI, 2000; ZUCCARI *et al.*, 2008; PINHO *et al.*, 2012). Segundo Pinho *et al.* (2012) a maior parte das alterações genéticas associadas ao câncer, que desempenham papel no desenvolvimento e progressão do tumor mamário, são semelhantes em ambas espécies.

A elevada incidência desse tipo de neoplasia relatada em certas raças puras sugere um componente genético envolvido, como já descrito em tumor de mama humano hereditário, onde familiares apresentavam alterações associadas aos genes *BCRA1* e *BRCA2* (RIVERA & EULER, 2011). Sabe-se que a desregulação desses genes está associada ao desenvolvimento do tumor mamário tanto em mulheres como em cães (PINHO *et al.*, 2012).

Devido a essa semelhança, o tumor de mama canino torna-se de interesse crescente, e visto desta forma como modelo adequado para estudos comparativos com a espécie humana (CASSALI, 2000; ZUCCARI *et al.*, 2008; KLOPFLEISCH *et al.*, 2011; TAVASOLY *et al.*, 2013). Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que contribuem para esses tumores caninos (KLOPFLEISCH *et al.*, 2011)

Na medicina veterinária tem-se recorrido a utilização de métodos biotecnológicos para o melhor entendimento da carcinogênese nos animais. Como o uso da biologia molecular para estudar diretamente alterações genéticas, para a busca do diagnóstico mais precoce e mais

preciso de inúmeras doenças, auxiliando no entendimento da patogênese e trazendo novas perspectivas para um tratamento ou prevenção (SEGAL *et al.*, 2001). E para que se tenha um modelo mais seguro para estudo, é importante que seja verificado a ocorrência de alterações nos genes envolvidos no tumor mamário canino, como é o caso de gene supressor *BRCA2*.

Visando isso, objetivamos no presente estudo identificar alterações na região *hotspot* do gene *BRCA2* (YOSHIKAWA *et al.*, 2005; HSU *et al.*, 2009; BORGE *et al.*, 2011; ENGINLER *et al.*, 2013) relacionadas com o desenvolvimento de tumores mamários caninos, com a análise dos éxons 11, 12 e 24, bem como de um polimorfismo do tipo indel (inserção/deleção) no éxon 27, identificando possíveis marcadores do processo tumoral para a construção de kits de diagnóstico e prognóstico da doença.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Coleta das Amostras

As amostras de tecido mamário de caninos utilizadas no presente estudo foram coletadas de animais encaminhados à remoção cirurgia no Hospital Veterinário “Prof. Mário Dias Teixeira” (HOVET) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), a partir de Agosto de 2012. Foram coletadas amostras de tecido neoplásico e não-neoplásico do mesmo animal, estas posteriormente foram armazenadas em microtubos contendo solução de RNA Later® (Ambion Inc.) e conservadas a temperatura de -20 °C até o momento da extração do DNA.

O diagnóstico histopatológico e o auxílio na coleta das amostras foram feitos pela equipe do Prof. Dr. Washington Pereira do Laboratório de Patologia Veterinária, do Instituto da Saúde e Produção Animal (ISPA-UFRA). As amostras foram processadas pelas técnicas histopatológicas padrão.

Ressalta-se que este estudo possui aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal Rural da Amazônia (Protocolo 001/2013 CEUA – 23084.000265/2013-53 UFRA) (Anexo 1), e os responsáveis dos animais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de doação das amostras, utilizadas nesta pesquisa (Anexo 2).

### 2.2.2 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Parte do tecido coletado foi utilizado para extração de DNA, pelo método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989), com algumas modificações:

Os fragmentos gênicos contendo cada um dos éxons analisados (éxons 11, 12, 24 e 27) do gene *BRCA2* foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Para isso, foram utilizados tampão de reação 1X (10X=KCl 500mM, 100mM tris-HCl), 1,25 mM de cada dNTP (dinucleotídeos); 0,7 mM de MgCl<sub>2</sub>; 100 ng de DNA molde, 0,5  $\mu$ M de cada iniciador; 1,5 U de Taq DNA polimerase e até 8% (v/v) de DMSO.

Os iniciadores que foram utilizados e suas respectivas temperaturas de anelamento são os mesmos descritos por Hsu *et al.* (2010) para os éxons 11, e por Borge *et al.*, (2011) Enginler *et al.* (2013) para os éxons 12, 24 e 27 do gene *BRCA2* canino (Tabela 3).

**Tabela 3** - Iniciadores utilizados para a reação da cadeia em polimerase dos éxons 11, 12, 24 e 27 do gene *BRCA2* canino.

Éxon	Primer sequência (5'- 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do produto
11	F:TCTGAATTACTTCCTGGCATAGATA R: GGAGTTTCTGGAGTGTCTGG	52	567
12	F: TCTTTCAAATAGGATGGTTGC R: CCCAATTACAAAGAACCTCCA	52	567
24	F: AGTATCTGGCGTCCATCACC R: CCTCCTTCTGTTCCATGTCC	56	540
27	F: CCCCCATTCTCCTCTCTCTC R: CAAAAGGGCTTGGGTGTTA	55	535

A eficiência da amplificação foi verificada aplicando-se 4 $\mu$ L do produto da PCR juntamente com 2 $\mu$ L de corante de visualização *blue-juice* (5 mL glicerol, 1 mL de azul de bromo fenol 0,1%, 1 mL de xileno-cianol 0,1%, 2 mL de EDTA 0,5 M), e submetendo à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com 1  $\mu$ L de brometo de etídio (0,2 mg/mL). A eletroforese foi realizada em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA), a uma corrente de 100 V, por aproximadamente 20 minutos. A visualização foi realizada em transluminador com luz ultravioleta, seguida de sequenciamento automático em aparelho ABI 3130 (Applied Biosystems).

Os produtos obtidos da PCR foram purificados através do kit *EZ-10 Spin Column PCR Product Purification* (Bio Basic/Ludwig Biotec), seguindo as instruções do fabricante, objetivando a remoção de sais e resíduos de oligonucleotídeos e dNTPs, e sequenciados em aparelho ABI 3130 (*Applied Biosystems*).

### **2.2.3 Análise das Mutações do Gene *BRCA2* e Análise Estatística**

A identificação das alterações no fragmento sequenciado foi realizada no programa *BioEdit* v. 5.0.6 (HALL, 1999), pelo alinhamento das sequências obtidas com os éxons correspondentes de uma amostra da literatura (Código *GenBank*: U62133) para comparação e detecção das alterações, considerando inserções, deleções e trocas de bases.

Foram aplicados testes estatísticos para relacionar a presença de alterações no fragmento analisado com o tipo tumoral, grau de avanço do tumor, idade e raça dos animais. Para tanto, foram utilizados os testes Qui-Quadrado, teste G, e Exato de Fisher, com correção de Yates, para avaliar as diferenças alélicas e genotípicas entre os tecidos tumoral e não tumoral. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente não significantes. O teste de *Odds Ratio*, com intervalo de confiança de 95%, foi utilizado para estimar o risco relativo das variáveis histopatológicas associadas aos genótipos obtidos. Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa *GraphPad Prism 6.0* (La Jolla California USA).

## **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.3.1 Características Gerais dos Animais**

Foram utilizadas 40 amostras de 23 animais que apresentavam tumores mamários. Dezesesseis animais apresentavam amostras pareadas (com tecido tumoral e não tumoral), e sete animais apresentavam amostras não-pareadas (apenas tecido tumoral). Foram coletadas informações destes animais, referentes à idade, raça, histórico reprodutivo e sobrevivência. Os dados sobre diagnóstico histopatológico bem como idade, raça e sexo são mostrados a seguir (Tabela 4 e 5).

**Tabela 4** - Relação das amostras pareadas (tumoral e não tumoral do mesmo animal) com o diagnóstico histopatológico, idade, raça e sexo.

<b>Animal</b>	<b>Amostras</b>	<b>Diagnóstico Histopatológico</b>	<b>Idade</b>	<b>Raça</b>	<b>Sexo</b>
<b>1</b>	BNB 01 (N)	Tecido não tumoral	15	SRD	F
	BNB 02 (T)	Carcinossarcoma Diferenciado			
<b>2</b>	BNB 03 (N)	Tecido não tumoral	10	SRD	F
	BNB 04 (T)	Adenocarcinoma Pouco Diferenciado			
<b>3</b>	BNB 05 (N)	Tecido não tumoral	7	SRD	F
	BNB 06 (T)	Carcinossarcoma			
<b>4</b>	BNB 07(N)	Tecido não tumoral	10	Poodle	F
	BNB 08 (T)	Fibroadenocarcinoma			
<b>5</b>	BNB 10 (N)	Tecido não tumoral	12	SRD	F
	BNB 11 (T)	Carcinossarcoma Grau III			
<b>6</b>	BNB 12 (N)	Tecido não tumoral	12	SRD	F
	BNB 13 (T)	Adenocarcinoma Papilífero Grau III			
<b>7</b>	BNB 15 (N)	Tecido não tumoral	10	Pinscher	F
	BNB 16 (T)	Adenocarcinoma Papilífero			
<b>8</b>	BNB 17 (N)	Tecido não tumoral	10	SRD	F
	BNB 18 (T)	Tumor Misto Carcinosarcoma			
<b>9</b>	BNB 21 (N)	Tecido não tumoral	15	SRD	F
	BNB 22 (T)	Adenocarcinoma Papilífero			
<b>10</b>	BNB 23 (N)	Tecido não tumoral	15	SRD	F
	BNB 24 (T)	Osteocondrossarcoma			
<b>11</b>	BNB 45(N)	Tecido não tumoral	15	SRD	F
	BNB 46 (T)	Carcinossarcoma Grau II			
<b>12</b>	BNB 50 (N)	Tecido não tumoral	8	SRD	F
	N 71 (T)	Adenocarcinoma Grau I			
<b>13</b>	BNB 132(T)	Adenoma Tubular	*	Poodle	F
	BNB 139(N)	Tecido não tumoral			
<b>14</b>	BNB 144(N)	Tecido não tumoral	8	Yorkshire	F
	BNB 145(T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau III			
<b>15</b>	BNB 175(N)	Tecido não tumoral	*	*	F
	BNB 176(T)	Adenocarcinoma			
<b>16</b>	N57 (N)	Tecido não tumoral	5	Rotweiller	F
	N58 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau II			
	N69 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau III			

Legenda: T – tumoral; N – não tumoral; SRD – sem raça definida; \* dado não informado

**Tabela 5** - Relação das amostras não-pareadas (apenas tumoral) com o diagnóstico histopatológico, idade, raça e sexo.

<b>Animal</b>	<b>Amostras</b>	<b>Diagnóstico Histopatológico</b>	<b>Idade</b>	<b>Raça</b>	<b>Sexo</b>
<b>17</b>	BNB 09 (T)	Carcinossarcoma	10	Poodle	F
<b>18</b>	BNB 19 (T)	Carcinossarcoma Grau III	9	Dashchund	F
<b>19</b>	BNB 20 (T)	Fibrossarcoma	4	SRD	F
<b>20</b>	BNB 25(T)	Carcinossarcoma Grau III	5	Poodle	F
<b>21</b>	BNB 26 (T)	Adenocarcinoma	*	SRD	M
<b>22</b>	BNB 48 (T)	Carcinossarcoma	13	Cocker	F
<b>23</b>	BNB 169 (T)	Carcinoma indiferenciado (Carcinoma inflamatório mamário)	8	Schnauzer	F

Legenda: T – tumoral; N – não tumoral; SRD – sem raça definida; \* dado não informado

Os 23 animais apresentaram faixa etária entre 4 e 15 anos, sendo que apenas três animais não apresentaram idade informada na ficha cadastral. A idade média e desvio padrão foi  $9,7 \pm 2,1$  anos. No presente estudo obtivemos 80% (16/20) dos animais com idade acima de 7 anos, considerados idosos. A literatura relata a ocorrência de neoplasias mamárias em cães considerados idosos de 7 a 12 anos de idade. A faixa etária mais frequente neste estudo corrobora com o relatado em literatura (DALECK *et al.*, 2008; RIVERA *et al.*, 2009; BORGE *et al.*, 2011). Gupta *et al.* (2012), relatam que apesar de haverem divergências na literatura quanto ao intervalo da faixa etária mais acometida pelo tumor, é consenso que ocorre o aumento acentuado desta incidência com o aumento da idade. Segundo Sonremo *et al.* (2011), o risco para o desenvolvimento dessa doença começa a tornar-se significativo em torno de 8 anos de idade e, segundo esses autores, cães mais jovens são mais propensos a desenvolver tumores benignos do que os mais velhos.

Quanto ao sexo dos animais inclusos neste estudo, dos 23, 22 eram fêmeas e apenas 1 era macho. Filho *et al.* (2010) também encontraram uma frequência muito baixa de cães machos acometidos, o que é semelhante ao descrito na literatura em que o risco de cães machos desenvolverem tumores mamários é considerado menor ou igual a 1% em relação às fêmeas (DALECK *et al.*, 2008).

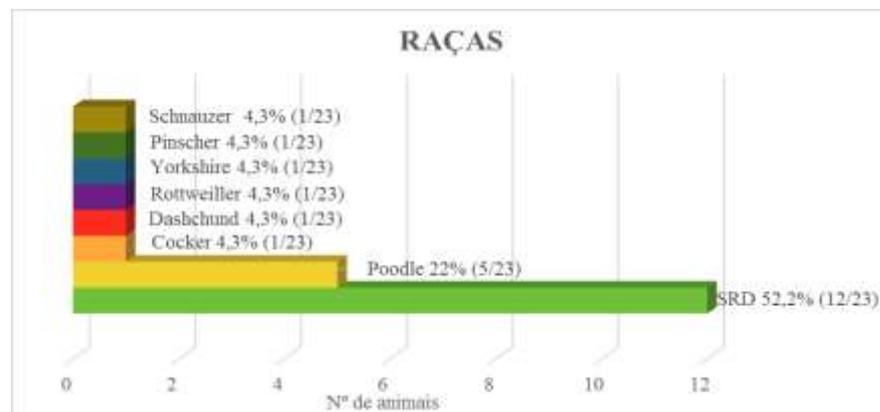
No que diz respeito à distribuição das raças, 52,2% (12/23) eram sem raça definida (SRD), 22% (5/23) eram *Poodle*, 4,3% (1/23) eram *Schnauzer*, 4,3% (1/23) eram *Pinscher*, 4,3% (1/23) eram *Yorkshire*, 4,3% (1/23) eram *Rottweiler*, 4,3% (1/23) eram *Dashchund*, e 4,3% (1/23) eram *Cocker* (Gráfico 1). A maior frequência foi verificada nos animais sem raça definida, seguida dos animais da raça *Poodle* e posteriormente outras raças consideradas

puras. Em comparação entre raças puras e cães sem raça definida, no presente estudo obtivemos 52,2% de acometimento em caninos SRD e 47,8% de animais de raça pura. A literatura sugere uma predisposição consideravelmente mais elevada para tumores mamários em cães de raça pura em comparação com caninos sem raça definidas (RIVERA *et al.*, 2009; GUPTA *et al.*, 2012). Entretanto, Daleck *et al.* (2008) relatam maior incidência dessa enfermidade, nos animais sem raça definida, além dos caninos de algumas raças puras.

Entre os animais de raça pura presentes no estudo, os das raças *Poodle*, *Cocker* e *Dashchund* são apontadas pela literatura como sendo consideradas raças com alto risco para o câncer de mama (BORGE *et al.*, 2011).

A análise de raças acometidas no presente estudo fica limitado devido a ausência de informação da população na área estudada, porém acredita-se que a população canina que é atendida pelo Hospital Veterinário da UFRA seja prioritariamente de caninos sem raça definida, o que pode justificar a maior incidência desses animais no presente estudo.

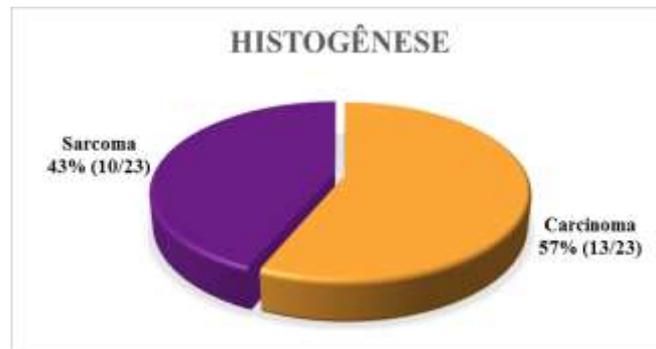
**Gráfico 1** - Distribuição das raças dos 23 caninos acometidos por tumor de mama.



No que se referem a tipos histológicos, das 24 amostras tumorais treze foram de origem epitelial maligna, uma amostra com origem epitelial benigna, e dez animais apresentaram tumores com origem mesenquimal maligna. A frequência dos tumores malignos dos animais estudados foi de 57% carcinoma e 43% sarcoma (Gráfico 2). Corroborando com o que é relatado pela literatura que 50% dos tumores mamários são malignos (DALECK *et al.*, 1998; CIRILLO, 2008; KLOPFLEISCH *et al.*, 2011; CASSALI *et al.*, 2014). E com Biondi *et*

*al.* (2014), que encontram em seus resultados mais de 50% de neoplasias malignas com origem epitelial.

**Gráfico 2** - Distribuição dos tipos histopatológicos quanto a histogênese do tumor mamário apresentado pelos 23 animais do presente estudo.



No que diz respeito a vida reprodutiva das cadelas acometidas, foi verificado que 91% (20/22) da população estudada não era castrada (Gráfico 3). Filho *et al.* (2012) e Biondi *et al.* (2014), verificaram também uma frequência pequena de cadelas castradas em seus estudos na Paraíba e em Santos, respectivamente. Sabe-se que o índice de risco de desenvolvimento de neoplasmas mamários varia entre cadelas castradas e não-castradas e depende ainda da fase em que a castração é efetuada (FONSECA; DALECK 2000; DALECK *et al.*, 2008). A OSH realizada antes do primeiro estro reduz o risco de desenvolvimento da neoplasia mamária para 0,05%; aumentando o risco significativamente nas fêmeas esterilizadas após o primeiro ciclo estral (8,0%) e o segundo (26%). Após dois anos e meio de idade ou no segundo cio esse procedimento já não apresenta um efeito protetor contra o aparecimento do tumor (CIRILLO, 2008; JOHSON, 2010; RAMOS *et al.*, 2012; NAGATA *et al.*, 2014).

No histórico de gestação, observamos que 55% (11/20) eram nulíparas, 35% (7/20) eram múltíparas e 10% (2/20) eram primíparas. Entretanto, o efeito protetor da gestação pode não ocorrer em cães como observado em humanos (DALECK *et al.*, 2008).

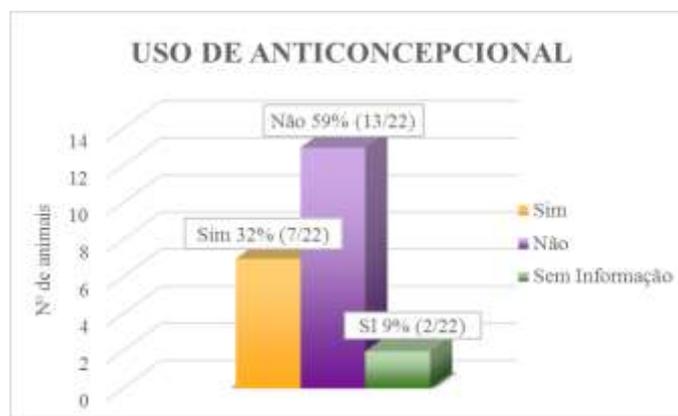
**Gráfico 3** - Distribuição dos animais que eram castrados e não castrados.



SI – sem informação

Em relação a utilização de medicação contraceptiva, foi verificado que 32% (7/22) das cadelas utilizavam esse tipo de medicação, sendo que dois animais não apresentavam informação a respeito disso na ficha clínica (Gráfico 4). A literatura relata que a utilização prolongada de progestágenos para suprimir o estro, promovendo alterações hiperplásicas e neoplásicas nas glândulas mamárias de cadelas (JOHNSON, 2010; FILHO *et al.*, 2012). Segundo Daleck *et al.* (2008), a administração prolongada de progestágenos e estrógenos combinados com progestágenos pode aumentar a incidência de tumores benignos, assim como, a incidência tardia de tumores malignos. Já Sonremo *et al.* (2011), sugerem que tratamentos com hormônio exógeno podem propiciar o desenvolvimento de tumor de mama em cadelas menores de 5 anos de idade, o que pode ser verificado no presente estudo onde um animal com 4 anos e outro com 5 anos de idade faziam uso desse método contraceptivo e desenvolveram tumor de mama maligno.

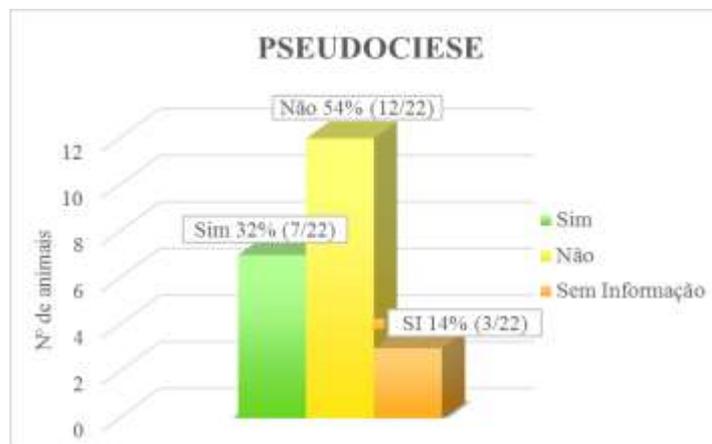
**Gráfico 4** - Distribuição das fêmeas que usam contraceptivos e que apresentaram tumor de mama.



SI – sem informação

Outro fator considerado como possível predisponente ao desenvolvimento do câncer mamário em caninos é o desenvolvimento de gravidez psicológica, pseudociese. Na população estudada 54% (12/22) não apresentavam quadros desse distúrbio de comportamento, sendo que 2 animais não apresentavam dados referentes a essa alteração em suas fichas clínicas (Gráfico 5). Segundo Filho *et al.* (2012), a relação da pseudociese com o desenvolvimento de tumores mamários é controversa. Alguns autores afirmam que a pseudociese pode não ter nenhuma relação com o desenvolvimento de neoplasmas mamários em cadelas (DALECK *et al.*, 2008).

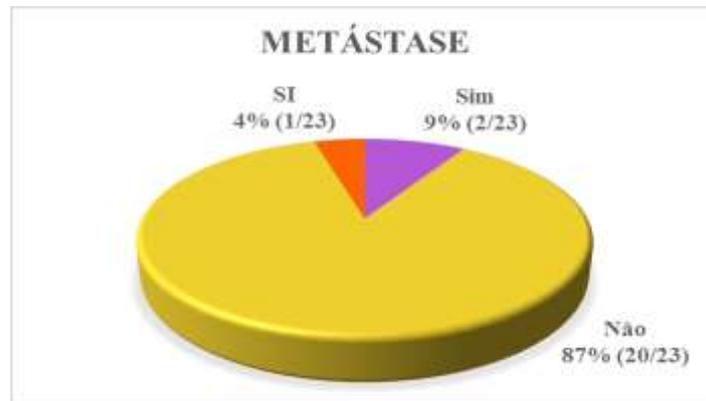
**Gráfico 5** - Distribuição das fêmeas que apresentavam ou não pseudociese e foram acometidas com tumor de mama canino.



SI – sem informação

No que se refere a prognóstico e a sobrevida dos animais, 87% (20/23) dos animais não apresentavam metástase (em linfonodos regionais ou órgãos abdominais e torácicos) no momento do diagnóstico, dois animais apresentaram metástase pulmonar, e um canino não apresentava informação referente a esse dado (Gráfico 6). Os resultados observados diferem do que a literatura relata, pois, segundo Daleck *et al.* (2008), 25% dos animais acometidos com tumores mamários podem apresentar metástases em linfonodos regionais e pulmão no ato do diagnóstico, e podem apresentar micrometástase que não são visibilizadas pelos exames de imagem.

**Gráfico 6** - Distribuição da ocorrência de processo metastático nos 23 animais estudados com tumor de mama canino.



SI – sem informação

### 2.3.2 Análise de Alterações no Gene *BRCA2*

#### 2.3.2.1 Éxon 11

Para análise do éxon 11 foram utilizadas 32 amostras, sendo vinte e uma destas representando amostras pareadas (tumoral e não tumoral) de 10 animais, oito representavam amostras apenas tumorais de 8 animais, e as outras três representavam amostras não tumorais de 3 animais (Tabela 6).

Após o sequenciamento e análise no *software BioEdit*, e comparação com amostras da literatura (números de acesso do *GenBank* FJ464406.1 e XM005635378.1) foram observadas cinco alterações das relatadas por Hsu *et al.* (2011): A<sup>355</sup>G, CCC<sup>1954</sup>AAA, C<sup>2121</sup>A, A<sup>2414</sup>G e A<sup>511</sup>C.

Das 32 amostras utilizadas 46,8% (15/32) apresentaram o evento transição A<sup>355</sup>G, das quais 11 eram amostras tumorais e quatro eram amostras não tumorais. Observou-se que a presença do alelo G, representou um risco reduzido na ocorrência de tumores mamários em caninos (OR= 0,4848; p= 0,5991), mas um aumento no risco de desenvolvimento de tumores de origem epitelial em relação aos sarcomas (OR= 2,0000; p= 0,8668), porém estatisticamente não foram significantes. A respeito de castração, as cadelas que apresentavam o alelo mutado G e não eram castradas apresentaram um risco aumentado de 3 vezes (OR= 3,800; p= 0,9516) de desenvolverem esse tipo de câncer em relação àquelas que eram castradas.

O polimorfismo CCC<sup>1954</sup>AAA esteve presente em 56,3% (18/32) das amostras, onde dez eram amostras tumorais e oito eram não tumorais. Essa variação genética resulta na troca de aminoácido (Prolina<sup>652</sup>Lisina) (Figura 8).

Segundo análise estatística as cadelas nulíparas apresentaram um risco 2,4 vezes aumentado (OR= 2,400; p= 0,7422) para a ocorrência do tumor de mama quando associado ao alelo mutado, porém sem significância estatística. Da mesma forma, animais que apresentaram o alelo AAA tiveram o risco cinco vezes maior (OR= 5,000; p= 0,5403) de óbito em relação aos animais com alelo selvagem.

A transversão C<sup>2121</sup>A foi encontrada em 62,5% (20/32) das amostras, das quais onze eram tumorais e nove eram não tumorais. Essa mutação silenciosa ocorre no aminoácido Serina<sup>708</sup>, localizado no domínio BRC3 da BRCA2. Apesar de silenciosa, quando a ocorrência do alelo A foi relacionada com o histórico de pseudociese, foi observado que animais com gravidez psicológica apresentaram risco de 2,0 vezes de desenvolvimento da neoplasia mamária.

O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) A<sup>2414</sup>G ocorreu em 71,8% (23/32) das amostras, sendo 13 amostras tumorais e 10 amostras não tumorais. Esta alteração leva à substituição do aminoácido Lisina<sup>805</sup>Arginina na proteína canina BRCA2, na região da repetição BRC3. Na análise estatística foi observado um aumento no risco de desenvolvimento do tumor nas cadelas não castradas, nas que apresentaram pseudociese e nas cadelas nulíparas, em 8,3, 3,0 e 2,8 vezes, respectivamente (OR= 8,333 e p= 0,6414; OR= 3,000 e p= 0,7555; OR= 2,857 e p= 0,7681).

A transversão A<sup>511</sup>C ocorreu em apenas 6,25% (2/32) das amostras analisadas, sendo as duas de tecido tumoral. Esta alteração ocorre próxima a repetição BRC1 e resulta na substituição de uma Lisina por uma Glutamina. Considerando a baixa frequência da alteração, não foram realizadas análises estatísticas.

Como dito anteriormente, as alterações acima foram também encontradas por Hsu *et al.* (2010) em seu estudo, sendo que os autores relatam frequências diferentes das observadas no presente trabalho para as alterações A<sup>2414</sup>G e A<sup>511</sup>C (54,4% para ambas) na população de Taiwan.

Das cinco alterações encontradas, quatro foram observadas na única amostra tumoral benigna presente neste estudo (A<sup>355</sup>G, CCC<sup>1954</sup>AAA, C<sup>2121</sup>A e A<sup>2414</sup>G).

Não foram detectadas modificações genéticas em duas amostras analisadas, sendo uma tumoral e outra não tumoral, com a utilização dos materiais e métodos descritos.

É sabido que o éxon 11 é responsável pela codificação das oito repetições BRC, que interagem com a proteína Rad51. Quando ocorre alteração na sequência codificadora desse domínio, a mesma pode afetar a força de ligação com essa proteína importante para o reparo do DNA por recombinação homóloga. Segundo Ochai *et al.* (2011), as diferentes forças de ligação entre Rad51 e o arranjo correto das oito repetições BRC são necessárias para a boa execução deste reparo, sendo que o enfraquecimento da afinidade de Rad51, mesmo para apenas uma repetição é suficiente para aumentar a susceptibilidade ao câncer de mama (YOSHIKAWA *et al.*, 2012b).

**Tabela 6:** Relação de amostras tumorais e as alterações encontradas no éxon 11 do gene *BRCA2* canino.

Animal	Amostras	Diagnóstico Histopatológico	Éxon11				
			A <sup>355</sup> G	CCC <sup>1954</sup> AAA	C <sup>2121</sup> A	A <sup>2414</sup> G	A <sup>511</sup> C
1	BNB 02 (T)	Carcinossarcoma Diferenciado	G	CCC	A	G	A
2	BNB 04 (T)	Adenocarcinoma Pouco Diferenciado	A	AAA	A	A	A
3	BNB 06 (T)	Carcinossarcoma			NA		
4	BNB 08 (T)	Fibroadenocarcinoma	A	AAA	A	G	A
5	BNB 11 (T)	Carcinossarcoma Grau III	G	AAA	A	G	A
6	BNB 13 (T)	Adenocarcinoma Papilífero Grau III	A	AAA	A	G	A
7	BNB 16 (T)	Adenocarcinoma Papilífero	A	CCC	C	G	A
8	BNB 18 (T)	Tumor Misto Carcinomatoso			NA		
9	BNB 22 (T)	Adenocarcinoma Papilífero	A	CCC	C	G	A
10	BNB 24 (T)	Osteocondrossarcoma	A	CCC	C	G	A
11	BNB 46 (T)	Carcinossarcoma Grau II			NA		
12	N 71 (T)	Adenocarcinoma Grau I	A	CCC	C	A	A
13	BNB 132 (T)	Adenoma Tubular	G	AAA	A	G	A
14	BNB 145 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau III	G	AAA	A	G	A
15	BNB 176 (T)	Adenocarcinoma	G	CCC	C	A	A
16	N58 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau II	G	AAA	A	G	C
	N69 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau III	G	AAA	A	G	A
17	BNB 09 (T)	Carcinossarcoma	G	AAA	A	A	C
18	BNB 19 (T)	Carcinossarcoma Grau III	A	CCC	C	G	A
19	BNB 20 (T)	Fibrossarcoma	G	CCC	C	A	A

<b>20</b>	BNB 25(T)	Carcinossarcoma Grau III						NA
<b>21</b>	BNB 26 (T)	Adenocarcinoma						NA
<b>22</b>	BNB 48 (T)	Carcinossarcoma	<b>G</b>	<b>AAA</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	
<b>23</b>	BNB 169 (T)	Carcinoma indiferenciado (Carcinoma inflamatório mamário)	<b>G</b>	CCC	C	A	A	

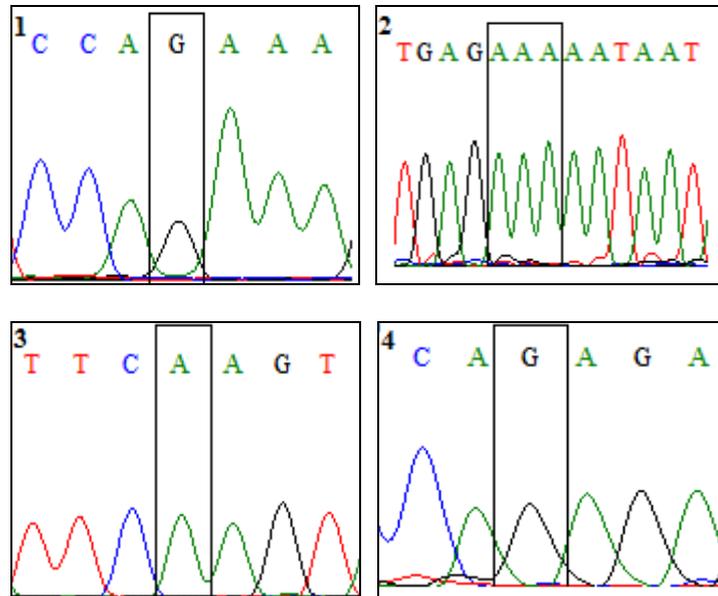
Legenda: T – tumoral; NA – amostra não amplificada.

**Tabela 7:** Relação das amostras de tecido não tumoral e as alterações encontradas no éxon 11 do gene *BRCA2* canino

Animal	Amostras	Diagnóstico Histopatológico	Éxon11					
			A <sup>355</sup> G	CCC <sup>1954</sup> AAA	C <sup>2121</sup> A	A <sup>2414</sup> G	A <sup>511</sup> C	
<b>1</b>	BNB 01 (N)	Tecido não tumoral						NA
<b>2</b>	BNB 03 (N)	Tecido não tumoral	A	<b>AAA</b>	<b>A</b>	A	A	A
<b>3</b>	BNB 05 (N)	Tecido não tumoral	A	CCC	C	A	A	A
<b>4</b>	BNB 07(N)	Tecido não tumoral	A	<b>AAA</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	A
<b>5</b>	BNB 10 (N)	Tecido não tumoral						NA
<b>6</b>	BNB 12 (N)	Tecido não tumoral	A	CCC	C	<b>G</b>	<b>A</b>	A
<b>7</b>	BNB 15 (N)	Tecido não tumoral	A	<b>AAA</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	A
<b>8</b>	BNB 17 (N)	Tecido não tumoral	A	CCC	C	<b>G</b>	<b>A</b>	A
<b>9</b>	BNB 21 (N)	Tecido não tumoral	A	CCC	C	<b>G</b>	<b>A</b>	A
<b>10</b>	BNB 23 (N)	Tecido não tumoral	A	CCC	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	A
<b>11</b>	BNB 45(N)	Tecido não tumoral	<b>G</b>	<b>AAA</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	A
<b>12</b>	BNB 50 (N)	Tecido não tumoral	<b>G</b>	<b>AAA</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	A
<b>13</b>	BNB 139 (N)	Tecido não tumoral						NA
<b>14</b>	BNB 144 (N)	Tecido não tumoral	<b>G</b>	<b>AAA</b>	<b>A</b>	A	A	A
<b>15</b>	BNB 175 (N)	Tecido não tumoral	A	<b>AAA</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	A
<b>16</b>	N57 (N)	Tecido não tumoral	<b>G</b>	<b>AAA</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	A

Legenda: N – não tumoral; NA – amostra não amplificada.

**Figura 8** - Eletroferograma com as alterações genéticas observadas nas amostras sequenciadas para o éxon 11. **1:** AAA→GAA (A<sup>355</sup>G, adenina para guanina); **2:** CCC→AAA (CCC<sup>1954</sup>AAA, citosinas para adeninas); **3:** TCC→TCA (C<sup>2121</sup>A, citosina para adenina); **4:** AAA→AGA (A<sup>2414</sup>G, adenina para guanina), número de acesso no *GenBank*:FJ464406.1, XM005635378.1



### 2.3.2.2 Éxon 12

Para o éxon 12 foram utilizadas 34 amostras, destas vinte e seis representam amostras pareadas (tumorais e não tumorais), e oito representam amostras tumorais (Tabelas 8 e 9).

O *SNP* G/A (*rs23255542*) citado por Borge *et al* (2011) esteve presente neste estudo em 38,2% (13/34) das amostras analisadas, das quais oito eram amostras tumorais e cinco eram não tumorais. Quatro amostras foram heterozigotas para esse evento genético, sendo duas oriundas de tecido tumoral e as outras duas de tecido mamário saudável (Figura 9).

Das amostras tumorais analisadas cinco eram do tipo sarcoma, duas eram carcinoma e uma era a única amostra de tecido tumoral benigno, presente neste estudo, apresentaram o polimorfismo citado. Esse evento é uma alteração sinônima, correspondente ao aminoácido Fenilalanina<sup>2310</sup>. Na análise estatística foi utilizado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg que constatou que os alelos encontraram-se em desequilíbrio, com frequência de 64% (0,6364) do alelo G e 36% (0,3636) do alelo A nas amostras tumorais ( $p= 0,0002$ ), e 60% (0,6) para o alelo G e 40% (0,4) para o alelo A nas amostras não tumorais ( $p= 0,0052$ ), não havendo diferença estatística entre os grupos analisados. Apesar disso, este resultado não diferiu do relatado na literatura onde as frequências dos alelos G e A são de 63,7% e 33,3%, respectivamente (NCBI, 2015).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a presença do alelo mutante e as características analisadas. No entanto, observou-se que o uso de anticoncepcional, associado a presença do alelo A, aumentou o risco de desenvolvimento de tumores em até 13 vezes (OR: 13,75, IC95: 1,482-127,5;  $p= 0.0439$ ). As mutações sinônimas ou mutações silenciosas não resultam em trocas de aminoácidos, mas podem afetar o dobramento das proteínas, tendo impacto sobre a cinética desses polipeptídios levando a diferentes conformações de proteínas finais (ENGINLER *et al.* 2013).

Além disso, segundo Li *et al.* (2009), em seus estudos concluíram que o éxon 12 é redundante funcionalmente e pode ser dispensável, possivelmente devido ao peptídeo codificado pelo éxon 12 não estar envolvido com os domínios que interagem com proteínas importantes para o reparo do DNA, como as repetições BRC. Portanto variantes *missenses* neste éxon, que possam vir a alterar aminoácidos, ou causar *splicing* de todo o éxon são susceptíveis a terem efeito neutro.

**Tabela 8:** Relação das amostras de tipo tumoral e as alterações encontradas no éxon 12 do gene *BRCA2* canino.

Animal	Amostras	Diagnóstico Histopatológico	Éxon12
			G/A (10.753.421)
1	BNB 02 (T)	Carcinossarcoma Diferenciado	G/A
2	BNB 04 (T)	Adenocarcinoma Pouco Diferenciado	G
3	BNB 06 (T)	Carcinossarcoma	A
4	BNB 08 (T)	Fibroadenocarcinoma	G
5	BNB 11 (T)	Carcinossarcoma Grau III	A
6	BNB 13 (T)	Adenocarcinoma Papilífero Grau III	A
7	BNB 16 (T)	Adenocarcinoma Papilífero	A
8	BNB 18 (T)	Tumor Misto Carcinomatoso	G
9	BNB 22 (T)	Adenocarcinoma Papilífero	G
10	BNB 24 (T)	Osteocondrossarcoma	G
11	BNB 46 (T)	Carcinossarcoma Grau II	G
12	N 71 (T)	Adenocarcinoma Grau I	G
13	BNB 132 (T)	Adenoma Tubular	A
14	BNB 145 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau III	G
15	BNB 176 (T)	Adenocarcinoma	NA

<b>16</b>	N58 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau II	NA
	N69 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau III	G
<b>17</b>	BNB 09 (T)	Carcinossarcoma	G
<b>18</b>	BNB 19 (T)	Carcinossarcoma Grau III	G
<b>19</b>	BNB 20 (T)	Fibrossarcoma	G/A
<b>20</b>	BNB 25(T)	Carcinossarcoma Grau III	G
<b>21</b>	BNB 26 (T)	Adenocarcinoma	NA
<b>22</b>	BNB 48 (T)	Carcinossarcoma	A
<b>23</b>	BNA 169 (T)	Carcinoma indiferenciado (Carcinoma inflamatório mamário)	G

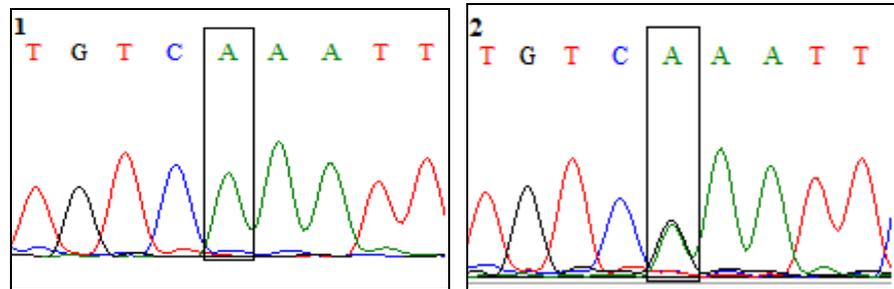
Legenda: T – tumoral; NA – amostra não amplificada.

**Tabela 9:** Relação das amostras de tecido não tumoral e as alterações encontradas no éxon 12 do gene *BRCA2* canino

<b>Animal</b>	<b>Amostras</b>	<b>Diagnóstico Histopatológico</b>	<b>Éxon12</b>
			<b>G/A (10.753.421)</b>
<b>1</b>	BNB 01 (N)	Tecido não tumoral	G/A
<b>2</b>	BNB 03 (N)	Tecido não tumoral	G/A
<b>3</b>	BNB 05 (N)	Tecido não tumoral	G
<b>4</b>	BNB 07(N)	Tecido não tumoral	A
<b>5</b>	BNB 10 (N)	Tecido não tumoral	G
<b>6</b>	BNB 12 (N)	Tecido não tumoral	A
<b>7</b>	BNB 15 (N)	Tecido não tumoral	G
<b>8</b>	BNB 17 (N)	Tecido não tumoral	G
<b>9</b>	BNB 21 (N)	Tecido não tumoral	G
<b>10</b>	BNB 23 (N)	Tecido não tumoral	G
<b>11</b>	BNB 45(N)	Tecido não tumoral	G
<b>12</b>	BNB 50 (N)	Tecido não tumoral	A
<b>13</b>	BNB 139 (N)	Tecido não tumoral	G
<b>14</b>	BNB 144 (N)	Tecido não tumoral	NA
<b>15</b>	BNB 175 (N)	Tecido não tumoral	NA
<b>16</b>	N57 (N)	Tecido não tumoral	NA

Legenda: N – não tumoral; NA – amostra não amplificada.

**Figura 9:** Eletroferograma com a alteração genética G/A (10.753.421), no éxon 12, observada nas amostras sequenciadas. (1) Amostra homozigota e (2) heterozigota para este evento.



### 2.3.2.3 Éxon 24

Foram utilizadas 28 amostras, das quais 18 eram tumorais e 10 eram amostras não tumorais. Todas foram devidamente comparadas com uma sequência previamente descrita na literatura considerada como padrão para o alinhamento (*GenBank*: NC\_006607.3).

Foi encontrada a alteração sinônima A/G, na posição 7747634, que codifica o aminoácido Leucina<sup>3045</sup>. Esse SNP foi encontrado em apenas duas amostras, uma tumoral e outra não tumoral de animais diferentes (Tabelas 10 e 11), sendo ambas heterozigotas para este evento. Esta alteração também foi encontrada por Enginler *et al.* (2013), onde os autores observaram uma alta frequência (70%) da mesma, sendo a presença do alelo A associada com o desenvolvimento da doença, o que sugere a influência deste *SNP* sobre a função da proteína, influenciando na cinética desses polipeptídeos levando a diferentes conformações de proteínas finais (ENGINLER *et al.* 2013).

**Tabela 10:** Relação das amostras de tipo tumoral e a alteração encontrada no éxon 24 do gene *BRCA2* canino.

Animal	Amostras	Diagnóstico Histopatológico	Éxon24
			A/G (NcbiRefSNP: ss748770619)
1	BNB 02 (T)	Carcinossarcoma Diferenciado	NA
2	BNB 04 (T)	Adenocarcinoma Pouco Diferenciado	A
3	BNB 06 (T)	Carcinossarcoma	A
4	BNB 08 (T)	Fibroadenocarcinoma	A

5	BNB 11 (T)	Carcinossarcoma Grau III	NA
6	BNB 13 (T)	Adenocarcinoma Papilífero Grau III	A
7	BNB 16 (T)	Adenocarcinoma Papilífero	NA
8	BNB 18 (T)	Tumor Misto Carcinomatoso	NA
9	BNB 22 (T)	Adenocarcinoma Papilífero	NA
10	BNB 24 (T)	Osteocondrossarcoma	A
11	BNB 46 (T)	Carcinossarcoma Grau II	NA
12	N 71 (T)	Adenocarcinoma Grau I	A
13	BNB 132 (T)	Adenoma Tubular	A
14	BNB 145 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau III	A
15	BNB 176 (T)	Adenocarcinoma	A
16	N58 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau II	A
	N69 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau III	A
17	BNB 09 (T)	Carcinossarcoma	A
18	BNB 19 (T)	Carcinossarcoma Grau III	A
19	BNB 20 (T)	Fibrossarcoma	A
20	BNB 25(T)	Carcinossarcoma Grau III	A
21	BNB 26 (T)	Adenocarcinoma	A
22	BNB 48 (T)	Carcinossarcoma	A
23	BNB 169 (T)	Carcinoma indiferenciado (Carcinoma inflamatório mamário)	G/A

Legenda: T – tumoral; NA – amostra não amplificada.

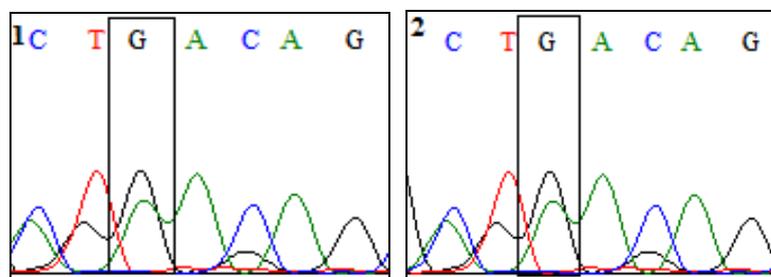
**Tabela 11:** Relação das amostras de tipo não tumoral e a alteração encontrada no éxon 24 do gene *BRCA2* canino.

Animal	Amostras	Diagnóstico Histopatológico	Éxon24
			A/G (NcbiRefSNP: ss748770619)
1	BNB 01 (N)	Tecido não neoplásico	A
2	BNB 03 (N)	Tecido não neoplásico	NA
3	BNB 05 (N)	Tecido não neoplásico	A
4	BNB 07(N)	Tecido não neoplásico	A
5	BNB 10 (N)	Tecido não neoplásico	NA

6	BNB 12 (N)	Tecido não neoplásico	A
7	BNB 15 (N)	Tecido não neoplásico	NA
8	BNB 17 (N)	Tecido não neoplásico	NA
9	BNB 21 (N)	Tecido não neoplásico	A
10	BNB 23 (N)	Tecido não neoplásico	A
11	BNB 45(N)	Tecido não neoplásico	NA
12	BNB 50 (N)	Tecido não neoplásico	A
13	BNB 139 (N)	Tecido não neoplásico	A
14	BNB 144 (N)	Tecido não neoplásico	NA
15	BNB 175 (N)	Tecido não neoplásico	G/A
16	N57 (N)	Tecido não neoplásico	A

Legenda: N – não tumoral; NA – amostra não amplificada.

**Figura 10:** Eletroferograma com a alteração genética A/G, no éxon 24, observada em duas amostras das analisadas. (1) e (2) ambas heterozigotas para este evento.



#### 2.3.2.4 Polimorfismo *Indel* no Éxon 27

Após a PCR, foram visualizados fragmentos com tamanho ~200 pares de bases, com poucos rastros e sem presença de bandas duplas, indicando a eficiência da amplificação da região contendo o evento 10204 ins/del AAA.

Posteriormente ao sequenciamento foram observados que das 37 amostras analisadas, 86,5% (32/37) apresentavam o evento 10204 ins/ins AAA, das quais 30 amostras eram homozigotas tanto nos tecidos tumorais como nos não tumorais (Tabelas 10 e 11), e duas amostras eram heterozigotas para este evento, uma de tecido tumoral e a outra de tecido não

tumoral. O evento 10204del/del AAA ocorreu em 8,1% (3/37) das amostras analisadas, as quais eram homozigotas para este evento, sendo duas amostras de um mesmo animal de tecido tumoral e não tumoral e a outra de uma amostra tumoral. As duas amostras restantes foram consideradas heterozigotas, sendo ambas de tecido tumoral (Figura 10). Esse polimorfismo é uma alteração não-sinônima que pode resultar, segundo a literatura, na substituição de Metionina para Isoleucina e Lisina na posição 3331-3332 (ENGINLER *et al.*, 2013).

Para análise estatística foi utilizado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para avaliar a frequência alélica. Observou-se que nas amostras tumorais a inserção do códon AAA apresentou frequência igual a 86% (0,8600) contra 14% (0,1400) do evento de deleção ( $p=0,0121$ ). Já nas amostras não tumorais observou-se a frequência de 83% (0,8333) de inserção e 16,7% (0,1667) de deleção das bases AAA ( $p=0,0032$ ). Com esses dados concluímos que os alelos encontram-se em frequências desiguais na população analisada, logo não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 12:** Relação das amostras de tipo tumoral e as alterações encontradas no éxon 27 do gene *BRCA2* canino.

Animal	Amostras	Diagnóstico Histopatológico	Éxon27
			10204 ins/delAAA (Genbank: AB210823)
1	BNB 02 (T)	Carcinossarcoma Diferenciado	AAA
2	BNB 04 (T)	Adenocarcinoma Pouco Diferenciado	Deleção
3	BNB 06 (T)	Carcinossarcoma	AAA
4	BNB 08 (T)	Fibroadenocarcinoma	AAA
5	BNB 11 (T)	Carcinossarcoma Grau III	AAA
6	BNB 13 (T)	Adenocarcinoma Papilífero Grau III	AAA
7	BNB 16 (T)	Adenocarcinoma Papilífero	AAA
8	BNB 18 (T)	Tumor Misto Carcinomatoso	AAA
9	BNB 22 (T)	Adenocarcinoma Papilífero	AAA
10	BNB 24 (T)	Osteocondrossarcoma	AAA
11	BNB 46 (T)	Carcinossarcoma Grau II	AAA
12	N 71 (T)	Adenocarcinoma Grau I	AAA
13	BNB 132 (T)	Adenoma Tubular	AAA

14	BNB 145 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau III	Deleção
15	BNB 176 (T)	Adenocarcinoma	AAA
16	N58 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau II	AAA
	N69 (T)	Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau III	AAA
17	BNB 09 (T)	Carcinossarcoma	AAA
18	BNB 19 (T)	Carcinossarcoma Grau III	AAA
19	BNB 20 (T)	Fibrossarcoma	GAA
20	BNB 25(T)	Carcinossarcoma Grau III	GAA
21	BNB 26 (T)	Adenocarcinoma	AAA
22	BNB 48 (T)	Carcinossarcoma	AAA
23	BNB 169 (T)	Carcinoma indiferenciado (Carcinoma inflamatório mamário)	NA

Legenda: T – tumoral; NA – amostra não amplificada.

**Tabela 13:** Relação das amostras de tecido não tumoral e as alterações encontradas no éxon 27 do gene *BRCA2* canino.

Animal	Amostras	Diagnóstico Histopatológico	Éxon27
			10204 ins/delAAA (Genbank: AB210823)
1	BNB 01 (N)	Tecido não neoplásico	AAA
2	BNB 03 (N)	Tecido não neoplásico	Deleção
3	BNB 05 (N)	Tecido não neoplásico	AAA
4	BNB 07(N)	Tecido não neoplásico	AAA
5	BNB 10 (N)	Tecido não neoplásico	AAA
6	BNB 12 (N)	Tecido não neoplásico	AAA
7	BNB 15 (N)	Tecido não neoplásico	AAA
8	BNB 17 (N)	Tecido não neoplásico	AAA
9	BNB 21 (N)	Tecido não neoplásico	AAA
10	BNB 23 (N)	Tecido não neoplásico	AAA
11	BNB 45(N)	Tecido não neoplásico	AAA
12	BNB 50 (N)	Tecido não neoplásico	AAA
13	BNB 139 (N)	Tecido não neoplásico	NA
14	BNB 144 (N)	Tecido não neoplásico	AAA
15	BNB 175 (N)	Tecido não neoplásico	NA
16	N57 (N)	Tecido não neoplásico	AAA

No presente estudo encontramos uma frequência mais elevada do alelo 10204insAAA do que para o 10204delAAA, corroborando como os resultados encontrados por Yoshikawa *et al.* (2005) e Borge *et al.* (2011).

Segundo Yoshikawa *et al.* (2005), o evento 10204insAAA foi associado com uma taxa maior de morbidade para tumor mamário em cães, sendo que esta alteração é responsável por uma mudança de aminoácidos (M3332IK) situada no domínio NLS2, resultando numa localização nuclear aumentada da proteína e possível truncamento da mesma (MIZUTA *et al.*, 1997; YOSHIKAWA *et al.*, 2005). Em nossos resultados observamos que as amostras homozigotas para 10204 ins/ins AAA estavam em uma frequência muito maior do que a observada na população canina japonesa (47,8%).

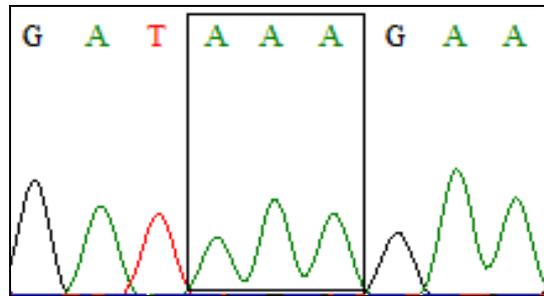
O éxon 27, o terceiro maior éxon do gene *BRCA2*, codifica a região final deste gene (C-terminal e a 3' UTR), onde estão localizados domínios essenciais, como os domínios do tipo NLSs (YOSHIKAWA *et al.*, 2005; ENGINLER *et al.*, 2013). Logo alterações em sua sequência, como polimorfismos do tipo *indel*, podem desativar e inibir a interação entre as proteínas *BRCA2* com Rad51 e PALB2 que quando alteradas influenciam na instabilidade celular (SCULLY *et al.*, 2000; SPAIN *et al.*, 1999; YANO *et al.*, 2000).

Yoshikawa *et al.* (2005) sugeriram que a alteração do aminoácido metionina para isoleucina e lisina pode aumentar a localização nuclear, além de ocorrer maior taxa de morbidade em cães com a inserção AAA do que com a deleção, o que pode ser resultante da associação entre a eficiência de translocação da proteína *Brca2* no câncer de mama em caninos.

Borge *et al.* (2011), verificaram que houve uma frequência maior da inserção AAA do que da deleção, e não houve nenhuma diferença significativa entre os cães de raças com alto e baixo risco para a referida doença.

Já em estudos posteriores, Yoshikawa *et al.* (2012) relataram que a variação 10204 ins/delAAA, juntamente com outras, foi frequente observada, sugerindo que esse evento é uma sequência consenso em cães e que provavelmente pode ser uma variação neutra, embora este ainda seja considerado um candidato a mutação maligna em cães.

**Figura 11:** Eletroferograma representando amostra homocigota para o evento 10204 insAAA, no éxon 27 do gene BRCA2 canino.



## CONCLUSÃO

Os métodos utilizados no presente trabalho permitiram concluir que:

-O éxon 11 apresentou o maior número de polimorfismos na região *hotspot* analisada do gene *BRCA2* canino (A<sup>355</sup>G, CCC<sup>1954</sup>AAA, C<sup>2121</sup>A, A<sup>2414</sup>G e A<sup>511</sup>C), sendo que destas apenas a alteração A<sup>511</sup>C não foi correlacionada com aumento de risco de desenvolver tumores quando comparada com as características clínicas e histopatológicas dos pacientes;

-O éxon 12 apresentou um polimorfismo G/A (*rs23255542*), sendo que as frequências alélicas deste não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos tumorais e não tumorais analisados, e que a presença do alelo mutante aumentou em 13 vezes o risco de desenvolvimento de tumores em animais que fazem uso de anticoncepcional, sugerindo que esta alteração pode influenciar na tumorigênese mamária canina;

-A única alteração observada no éxon 24 (A/G, posição 7747634) foi encontrada apenas em heterozigose em uma baixa frequência na população estudada;

-O polimorfismo do tipo indel observado no éxon 27 (10204 ins/del AAA) apresentou frequências alélicas que não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este evento, apesar de ser observado em uma alta frequência na população estudada, não foi correlacionado com nenhuma característica clínica ou histopatológica analisada;

-Os polimorfismos dos éxons 11 e 12 apresentam potencial como biomarcadores da tumorigênese mamária canina na população estudada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMENDOLA, L. C.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51(4), p.325-330, 2005.

AYRES M, AYRES-JR M, AYRES DL & SANTOS AAS. **BioEstat**. Sociedade Civil Mamirauá: Belém; Brasília: CNPq. (2007)

BERGER, A.H.; KNUDSON, A.G.; PANDOLFI, P. P. A continuum model for tumour suppression. **Nature**, v. 476, p.163-169, august, 2011.

BIGNELL, G.; MICKLEM, G.; STRATTON, M. R.; ASHWORTH, A.; WOOSTER, R. The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. **Oxford University Press Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 1, p.53–58, 1997.

BIONDI, L. R.; GENTILE, L. B.; REGO, A. A. M. S.; NORONHA, N. P.; DAGLI, M. L. Z. Canine mammary tumors in Santos, Brazil: clinicopathological and survival profile. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 51, n. 3, p. 252-262, 2014.

BORGE, K. S.; BØRRESEN-DALE, A. L.; LINGAAS, F. Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.9 (4), p.241–250. 2011.

CARREIRA, A.; HILARIO, J.; AMITANI, I.; BASKIN, R. J.; SHIVJI, M. K.K.; VENKITARAMAN, A. R.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. The BRC Repeats of BRCA2 Modulate the DNA-Binding Selectivity of RAD51. **Cell**, v.136, p.1032–1043, March 20, 2009.

CASSALI, G. D. **Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com as neoplasias da mama humana**. 1996. 80 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2000.

CASSALI, G.; BERTAGNOLLI, A.; LAVALLE, G.; TAVARES, W.; FERREIRA, E.; SILVA, A.; CAMPOS, C. Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary neoplasms in dogs. In: **34th World Small Animal Veterinary Congress 2009** - São Paulo, Brazil, 2009.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO,

K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A.M. R.; OLIVEIRA, L.O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C.; CAVALCANTI, M. F.; FONTELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRIL, J. E.; FREHSE, M. S.; ALMEIDA, E. C. P.; CAMPOS, C. B. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4(2), p.153-180, 2011.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; NARDI, A. B. DE; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; R. SUEIRO, F. E. A.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAUJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; SANTIS, G. W. DI; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B. F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F. V.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7(2), p.38 – 69, jul. 2014

CIRILLO, J. V. Tratamento quimioterápico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas. **Rev Inst Ciênc Saúde**, v. 26(3), p.325-7. 2008.

DALECK, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.; ALESSI, A. C.; SANTANA, A. E.; MARTINS, M. I. M. Aspectos Clínicos e Cirúrgicos do Tumor Mamário Canino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 95-100, 1998.

DAVIS, B.W. AND OSTRANDER, E. A. Domestic Dogs and Cancer Research: A Breed-Based Genomics Approach. **ILAR Journal**, Volume 55, Number 1, 2014.

DE PAULA, L. B.; SANTOS, R. S.; LIMA, P. S.; NATHALIE, M. P.; REIS, A. A. S. Os Gens *BRCA1* e *BRCA2* e suas Relações Genéticas na Predisposição aos Carcinomas Mamários Hereditários e Esporádicos. **Estudos**, Goiânia, v.339, n. 2, p. 199-208, abr./jun, 2012.

DIAS, M. F. Tumores hereditários da mama. 2010. Disponível em: <<[http://www.fspog.com/fotos/editor2/cap\\_32.pdf](http://www.fspog.com/fotos/editor2/cap_32.pdf)>>. Acesso em 22/09/2014.

DOBSON, J. M. Review Article: Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. **ISRN Veterinary Science**, v. 2013, p. 1-23, 2013.

ENGINLER, S. O.; AKIŞ, I.; TOYDEMİR, T. S. F.; OZTABAK, K.; HAKTANIR, D.; GÜNDÜZ, M. C.; KIRŞAN, I.; FIRAT, I. Genetic variations of *BRCA1* and *BRCA2* genes in dogs with mammary tumours. **Vet Res Commun**, v.38, p.21–27. 2013.

EWALD, I. P. **Rastreamento de mutações patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes em risco para a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários.** Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). 2004. 152 f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2008.

FERREIRA E., BREGUNCI G.C., SCHMITT F.C., CASSALI G.D. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 55, p.105- 09, 2003

FILIPPINI, S. E.; VEGA, A. Breast cancer genes: beyond *BRCA1* and *BRCA2*. **Frontiers in Bioscience**, v.18, p. 1358-1372, June 1, 2013.

FILHO, J.C. O.; KOMMERS, G. D; MASUDA, E. K.; MARQUES, B.M.F.P.P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F. E BARROS, C S.L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesq. Vet. Bras.** v. 30(2), p.177-185, 2010.

FONSECA, C.S.; DALECK, C.R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovário-histerectomia como terapia adjuvante. **Revista Ciência Rural.** v.30, n.4, p.731-735, 2000.

FOULKES, W. D; SHUEN, A. Y. In Brief: *BRCA1* and *BRCA2*. **Journal of Pathology**, v. 230, p. 347–349, 2013.

GRETARSDOTTIR, S.; THORLACIUS, S.; VALGARDSDOTTIR, R.; GUDLAUGSDOTTIR, S.; SIGURDSSON, S.; STEINARSDOTTIR, M.; JONASSON, J. G.; ANAMTHAWAT-JONSSON, K.; EYFJÖRD, J. E. *BRCA2* and p53 Mutations in Primary Breast Cancer in Relation to Genetic Instability. **Cancer Research**, v.58, p.859-862. March 1. 1998.

GRIFFITHS, A.J.F; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROLL, S.B. **Introdução à Genética: Mutação, Reparo e Recombinação.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

GUPTA, S. K.; SOOD, N. K.; UPPAL, S. K.; MOHINDROO, J.; MAHAJAN, S.; RAGHUNATH, M.; SINGH, KIRANJEET. Epidemiological Studies on Canine Mammary Tumour and its Relevance for Breast Cancer. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 2,2, p. 322-333, 2012.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis 1997. Disponível em: <<<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>>>. Acesso em 29/09/2014.

HEEMST, D.V.; REIJER, P.M. D.; WESTENDORP, R.G.J. Ageing or cancer: A review - On the role of caretakers and gatekeepers. **Europe an Journal of Cancer**, v. 4 (3), p. 2144 – 2152, 2007.

HORTA, R. S.; COSTA, M. P.; LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com auxílio da imuno-histoquímica. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.6, p.1033-1039, jun.2012.

HSU, WEI-LI; HUANG, YI-HSIN; CHANG, TIEN-JYE; WONGB, MIN-LIANG; CHANG, SHIH-CHIEH. Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. **The Veterinary Journal**, v.184, n.3, p.351–356, 2010.

JOHNSON, C.A. Distúrbios do sistema reprodutivo. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4ed. Rio de Janeiro: Eselvier; 2010, p. 911-925.

JENSEN, R. B. Brca2: One Small Step For DNA Repair, One Giant Protein Purified. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 86, p. 479-489, 2013.

KLOPFLEISCH, R.; EULER, H. VON; SARLI, G.; PINHO, S. S.; GÄRTNER, F.; GRUBER, A. D. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. **Pathology Veterinary**, vol. 48 no. 1, p.98-116. January, 2011

KOTSOPOULOS, J.; OLOPADE, O. I.; GHADIRIAN, P.; LUBINSKI, J.; LYNCH, H.T; ISAACS, C.; WEBER, B.; KIM-SING,C.; AINSWORTH, P.; FOULKES, W. D; EISEN, A.; SUN, P.; NAROD, S. A.Changes in body weight and the risk of breast cancer in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. 833-843. 2005.

LEVITT, N.C.; HICKSON, I.D.Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. **TRENDS in Molecular Medicine**, v.8, n.4, April 2002.

LI, L.; BISWAS, K.; HABIB, L. A.; KUZNETSOV, S. G.; HAMEL, N.; KIRCHHOFF, T.; WONG, N.; ARMEL, S.; CHONG, G.; NAROD, S. A; CLAES, K.; OFFIT, K.; ROBSON,

M. E.; STAUFFER, S.; SHARAN, S.; FOULKES, W. D. Functional redundancy of exon 12 of BRCA2 revealed by a comprehensive analysis of the c.6853A>G p.I2285V variant. **Hum Mutat**, v. 30 (11), p.1543–1550, 2009.

MACHNIEWICZ, P. H. Associação de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. **Rev. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ed.31, julho/dezembro 2003.

MATOS, A.J.F.; BAPTISTA, C.S.; GÄRTNER, M.F.; RUTTEMAN, G.R.. Review: Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. **The Veterinary Journal**, v.193, p.24–31, 2012.

MARTINS, D. C. **Avaliação imuno-histoquímica da proliferação e morte celular em neplasias mamárias malignas caninas**. Tese (Doutorado em Patologia). 2004. 130 f. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008.

MENDES, T. C. **Avaliação comparativa de dois sistemas de classificação histológica e da validade da quantificação da AgNOR para adenomas e carcinomas mamários caninos**. 2004. 65f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

MURAMOTO, C.; STERMAN, F. A.; HAGEN, S. C.F.; PINTO, A. C. B.C. F.; OLIVEIRA, C. M.; FAUSTINO, M.; TALIB, M.S.F.; TORRES, L. N. Avaliação ultrassonográfica de linfonodos na pesquisa de metástases de neoplasia mamária em cadelas. **Pesq. Vet. Bras**, v. 31 (11), p.1006-1013, novembro 2011.

NAGATA, W. B.; PERRI, S. H. V.; EUGÊNIO, F. R.; LARANJEIRA, M. G.; ANDRADE, A. L. Perfil epidemiológico da neoplasia mamária canina em Araçatuba: uma abordagem estatística. **Revista da estatística UFOP**, V. III, 2014.

NELSON, D. L. & COX, M. M. Oncogenes, genes supressores tumorais e morte celular programada. In: Biossinalização. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre (Tradução). Artmed, 2011.

OCHIAI, K.; MORIMATSU, M.; TOMIZAWA, N.; SYUTO, B. Cloning and Sequencing Full Length of Canine Brca2 and Rad51 cDNA. **J. Vet. Med. Sci.**, v.63(10), p.1103–1108, 2001.

OCHIAI, K.; YOSHIKAWA, Y.; OONUMA, T.; TOMIOKA, Y.; HASHIZUME, K.; MORIMATSU, M.. Interactions between canine RAD51 and full length or truncated BRCA2 BRC repeats. **The Veterinary Journal**, v.190, p. 293–295, 2011.

O'DONOVAN, P. J.; LIVINGSTON, D. M. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 961-967, 2010. Disponível em: <<carcin.oxfordjournals.org/content/31/6/961/F2.large.jpg>>. Acesso em 22/09/2014.

O'DONOVAN, P. R. J. AND LIVINGSTON, D. M. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. **Carcinogenesis**, v.31, no.6, p.961–967, 2010.

OLIVEIRA, LUCIANA DE OLIVEIRA, OLIVEIRA, ROSEMARI TERESINHA DE; LORETTI, ALEXANDRE PAULINO; RODRIGUES, RAFAEL; DRIEMEIER, DAVID. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (2), p. 105-110, 2003.

PENA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ABADIE, J.; BENAZZI, C.; CASTAGNARO, M.; I'EZ, L.; GARTNER, F.; HELLME'N, E.; KIUPEL, M.; MILLA'N, Y.; MILLER, M. A.; NGUYEN, F.; POLI, A.; SARLI, G.; ZAPPULLI, V.; J. MARTI'N DE LAS MULAS. Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 51(1), p.127-145, 2014.

PINHO, SALOM\_E S.; CARVALHO, SANDRA; CABRAL, JOANA; REIS, CELSO A.; G€ARTNER, F\_ATIMA. REVIEW ARTICLE: Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research**. Porto, Portugal, v.159, i.3, p.165-172, março, 2012.

PROENÇA, ANA RITA DOS SANTOS GONÇALVES. **Linfoma Maligno Multicêntrico Canino**. 2005. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa, Portugal, 2009.

QUARESMA, ADELINA MARIA GASPAR GAMA. **Canine mammary tumours: new insights into prognosis and molecular classification**. 2004. 186 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, Portugal, 2008.

QUEIROGA, FELISBINA & LOPES, CARLOS. Tumores mamários caninos – Novas perspectivas. In: **Congresso de Ciências Veterinárias** [Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, 2002], SPCV, Oeiras, 10-12 Out., pp. 183-190, 2002.

RAMOS,R.S.; AVANZI, B.R.; VOLPATO, R.; PIGNATON,W. ; CASTAN, E.P.; COSTA, F.A.A.; LOPES, M.D. Expressão gênica dos RE $\alpha$ , RE $\beta$  e PR em tumores mamários de cadelas por meio do q-PCR. **Arq. Bras. Med. Zootec.**, v.64, n.6, p.1471-1477, 2012.

RIBEIRO, LORENA G. R.; DAMASCENO, KARINE. A. ; COSTA NETO, JOÃO M.; D'ASSIS, MÁRIO JORGE M. H.; COSTA, ALTEMAR T.; SILVA, NAIRLÉIA S.; AGUIAR, PAULO HENRIQUE P.; CASSALI, GEOVANNI D. ESTRELA-LIMA, ALESSANDRA. Expressão da COX-2 nos carcinomas mamários de cadelas. **Veterinária em Foco**, v.6, n.2, jan./jun. 2009.

RIVERA, P. AND EULER, H. VON. Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48(1), p.132-146, 2011

RIVERA, PATRICIO; MELIN, MALIN; BIAGI, TARA; FALL, TOVE; HÄGGSTRÖM, JENS; LINDBLAD-TOH, KERSTIN; EULER, HENRIK VON. Mammary Tumor Development in Dogs is Associated with BRCA1 and BRCA2. **Cancer Research**, v. 69 (22), p. 8770-8774, 2009.

RIVOIRE, WALDEMAR AUGUSTO; CORLETA, HELENA VON EYE; BRUM, ILMA SIMONI; CAPP, EDISON. Biologia molecular do câncer cervical. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v.6 (4), p. 447-451, out./dez., Recife, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F & MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>a</sup> ed., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, USA, 1989.

SEGAL,SANDRA L.; BITTELBRUNN, ANA C.; BIAZÚS, JORGE V.; MENKE, CARLOS H.; CAVALHEIRO, JOSÉ A.; XAVIER, NILTON L.; RABIN, ELIANE G.; CERICATTO, RODRIGO. Genética e câncer de mama. **Revista HCPA**, V. 21(2), p. 191-197, 2001.

SHAFIEE, RADMEHR; JAVANBAKHT, JAVAD; ATYABI,NAHID; KHERADMAND, PEGAH; KHERADMAND, DANIAL; BAHRAMI, ALIMOHAMMAD; DARAEI, HASTI AND KHADIVAR, FARSHID. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohistopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. **Cancer Cell International** 13:79. 2013.

SILVA, ALESSANDRA ESTRÊLA DA; SERAKIDES, ROGÉRIA; CASSALI, GEOVANNI DANTAS. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.34, n.2, p.625-633, mar-abr, 2004.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.33, p.573-596. 2003.

SORENMO, K. U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48(1), p. 85-97, 2011.

SUKYO. Ovarian cancer. International University. Ho Chi Minh, 25 de dezembro de 2012. Disponível em: <<<http://nohabio.org/ovarian-cancer>>>. Acesso em: 22 setembro 2014

TAVASOLY, ABBAS; GOLSHAHI, HANNANEH; REZAIIE, ANNAHITA; FARHADI, MOHAMMAD. Classification and grading of canine malignant mammary tumors. **Veterinary Research Forum**, v.4 (1), p. 25 – 30. 2013.

TORÍBIO, JÚLIA MORENA DE MIRANDA LEÃO; COSTA NETO, JOÃO MOREIRA DA; BAVIA, MARIA EMÍLIA; LIMA, ALESSANDRA ESTRELA DA SILVA; CARDIM, LUCIANA LOBATO; CARNEIRO, DEBORAH DANIELA MADUREIRA TRABUCO; FILHO, EMANOEL FERREIRA MARTINS; RIBEIRO, LORENA GABRIELA ROCHA. Detecção de aglomerados espaciais de casos de neoplasia mamária em cães no município de Salvador, Bahia. **Ciência Rural**, v.42, n.1, p.98-104, Santa Maria, jan, 2012a.

TORÍBIO, JULIA MORENA DE MIRANDA LEÃO; LIMA, ALESSANDRA ESTRELA; FILHO, EMANOEL FERREIRA MARTINS; RIBEIRO, LORENA GABRIELA ROCHA; D'ASSIS, MÁRIO JORGE MELHOR HEINE; TEIXEIRA, RAQUEL GRAÇA; DAMASCENO, KARINE ARAÚJO; CASSALI, GEOVANNI DANTAS; NETO, JOÃO MOREIRA DA COSTA. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.4, p. 427-433, jul/ago, 2012b.

TUTT, ANDREW & ASHWORTH, ALAN. The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. **TRENDS in Molecular Medicine**, v.8, n.12, 2002.

VENKITARAMAN, ASHOK R. **Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage**. J Cell Sci. 114, p.3591-3598, 2001. Disponível em: <<<http://jcs.biologists.org/content/114/20/3591.full>>>. Acesso em 20/07/14.

VENKITARAMAN, ASHOK R. Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**, V.108, p.171–182, Jan, 2002.

YOSHIDA, KIYOTSUGU; MIKI, YOSHIO. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. **Cancer Sci**, vol. 95, no. 11, p. 866–871, november 2004.

YOSHIKAWA, Y.; MORIMATSU, M.; OCHIAI, K.; NAGANO, M.; YAMANE, Y.; TOMIZAWA, N.; SASAKI, N.; HASHIZUME, K. Analysis of Genetic Variations in the Exon 27 Region of the Canine BRCA2 Locus. **J. Vet. Med. Sci**, v. 67 (10), p. 1013-1017, 2005.

YOSHIKAWA, Y.; MORIMATSU, M.; OCHIAI, K.; OKUDA, K.; TAODA, T.; CHIKAZAWA, S.; SHIMAMURA, A.; OMI, T.; BONKOBARA, M.; ORINO, K.; WATANABE, K. Establishment of a PCR analysis method for canine BRCA2. **BMC Research Notes**, v. 5:173, 2012a.

YOSHIKAWA, Y.; OCHIAI, K.; MORIMATSU, M.; SUZUKI, Y.; WADA, S.; TAODA, T.; IWAI, S.; CHIKAZAWA, S. O.; ORINO, K.; WATANABE, K. Effects of the Missense Mutations in Canine BRCA2 on BRC Repeat 3 Functions and Comparative Analyses between Canine and Human BRC Repeat 3. **Plos One**, v. 7 (10), p. 1-9, Outubro, 2012b.

WHILEY, P. J.; PETTIGREW, C. A.; BREWSTER, B. L.; WALKER, L.C.; SPURDLE, A. B.; BROWN, M. A. Effect of BRCA2 sequence variants predicted to disrupt exonic splice enhancers on BRCA2 transcripts. **BMC Medical Genetics** 2010.

ZUCCARI, DEBORA A.P.C.; BERTON, CARLA R.; TERZIAN, ANA CAROLINA B.; RUIZ, CAMILA M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias –importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arq Ciênc Saúde**. Vol.15(4), p.189-98, out/dez 2008.

## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

---

ATESTADO

Protocolo 001/2013 (CEUA) – 23084.000265/2013-53 (UFRA)

Título do Projeto/Plano de Aulas: Análises moleculares em tumores caninos.

Docente/Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Bárbara Borges

Instituição: UFRA

Data do Parecer: 18 de fevereiro de 2013.

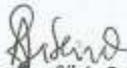
**PARECER**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRA apreciou o protocolo acima e verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794/2008, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do COBEA. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

Liberado para o início da pesquisa, sendo obrigatório a entrega nesta CEUA do relatório semestral e de conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no Projeto.

Belém, 08 de março de 2013.

  
Profa. Dra. Ana Sílvia Sardinha Ribeiro  
Coordenadora CEUA/UFRA



---

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA  
Av. Tancredo Neves, nº 2501, Bairro Montese, Belém – PA. CEP: 66.077-901  
Contatos: (11)3210-5165 [ceua@ufra.edu.br](mailto:ceua@ufra.edu.br) [www.comissao.ufra.edu.br/ceua](http://www.comissao.ufra.edu.br/ceua)

## ANEXO 2

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Universidade Federal Rural da Amazônia está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá conhecer melhor os mecanismos que ocasionam as lesões de mama e o desenvolvimento de tumor mamário em caninos, através da identificação das alterações genéticas e epigenéticas associadas ao quadro clínico do paciente e exames histopatológicos. Estes estudos são realizados em pequenos fragmentos de tecido mamário removido por cirurgia e oferecem novas possibilidades de diagnóstico.

Seu animal está sendo admitido neste Hospital, para estabelecimento de diagnóstico e há a necessidade da remoção de material biológico relacionado à enfermidade. Parte do material retirado será encaminhado para exames laboratoriais, necessários para o diagnóstico definitivo. O restante do material não utilizado é armazenado para novos exames, se necessário.

A obtenção do fragmento de tecido mamário para pesquisa não implicará em riscos adicionais e nem em aumento no tempo do exame ou cirurgia. O fragmento de material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras, preservando a privacidade e identidade do animal. A eventual inclusão dos resultados em publicações científicas será feita de modo a garantir o anonimato do animal.

É necessário esclarecê-lo (a) que não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu atendimento ou tratamento. Caso você tenha alguma dúvida sobre este documento ou em relação a pesquisa, por gentileza, entre em contato com a Prof<sup>a</sup>. Bárbara Borges (ISARH), pelos telefones 3201-7585/3210-5140.

Uma cópia deste documento será arquivada no prontuário do seu animal e, se desejar, uma cópia lhe será fornecida.

Declaro estar ciente das informações prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o teor, e autorizo a utilização de amostras de tecido retiradas durante a cirurgia do meu animal.

Belém, ..... de ..... de .....

-----  
Assinatura do Responsável \_\_\_\_\_

Nome: ..... RG: .....

Animal	Amostras	Diagnóstico Histopatológico	Idade	Raça	Sexo	Anticoncepcional	Pseudociese	Castração	Metástase	Gestações	Situação	Sobrevida
1	BNB 01 (N) BNB 02 (T)	Tecido não tumoral Carcinossarcoma Diferenciado	15	SRD	F	Não	Não	Não	Não	Nulípara	Óbito	3 anos
2	BNB 03 (N) BNB 04 (T)	Tecido não tumoral Adenocarcinoma Pouco Diferenciado	10	SRD	F	Não	Não	Sim	Não	Nulípara	Vivo	Não se aplica
3	BNB 05 (N) BNB 06 (T)	Tecido não tumoral Carcinossarcoma	7	SRD	F	Sim	Sim	Não	Não	Múltipara	*	*
4	BNB 07(N) BNB 08 (T)	Tecido não tumoral Fibroadenocarcinoma	10	Poodle	F	Não	Não	Não	Sim	Nulípara	Óbito	1 ano
5	BNB 10 (N) BNB 11 (T)	Tecido não tumoral Carcinossarcoma Grau III	12	SRD	F	Sim	Sim	Não	Não	Múltipara	Óbito	1 mês
6	BNB 12 (N) BNB 13 (T)	Tecido não tumoral Adenocarcinoma Papilífero Grau III	12	SRD	F	Sim	Sim	Não	Não	Múltipara	*	*
7	BNB 15 (N) BNB 16 (T)	Tecido não tumoral Adenocarcinoma Papilífero	10	Pinscher	F	Não	*	Não	Não	Nulípara	*	*
8	BNB 17 (N) BNB 18 (T)	Tecido não tumoral Tumor Misto Carcinomatoso	10	SRD	F	Sim	Não	Não	Não	Múltipara	Óbito	2 meses
9	BNB 21 (N) BNB 22 (T)	Tecido não tumoral Adenocarcinoma Papilífero	15	SRD	F	Não	Não	Não	Não	Múltipara	Óbito	1 ano
10	BNB 23 (N) BNB 24 (T)	Tecido não tumoral Osteocondrossarcoma	15	SRD	F	Não	Não	Não	Não	Nulípara	Óbito	1 mês
11	BNB 45(N) BNB 46 (T)	Tecido não tumoral Carcinossarcoma Grau II	15	SRD	F	Não	Sim	Não	Não	Primípara	*	*
12	BNB 50 (N) N 71 (T)	Tecido não tumoral Adenocarcinoma Grau I	8	SRD	F	Não	Sim	Não	Não	Múltipara	*	*
13	BNB 132 (T) BNB 139 (N)	Adenoma Tubular Tecido não tumoral	*	Poodle	F	*	*	Não	Não	*	*	*
14	BNB 144 (N) BNB 145 (T)	Tecido não tumoral Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau III	8	Yorkshire	F	Não	Não	Não	Não	Múltipara	Viva	Não se aplica
15	BNB 175 (N) BNB 176 (T)	Tecido não tumoral Adenocarcinoma	*	*	F	*	*	*	*	*	*	*
16	N57 (N) N58 (T) N69 (T)	Tecido não tumoral Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau II Adenocarcinoma Túbulo Papilífero Grau III	5	Rotweiller	F	Sim	Não	Não	Sim	Nulípara	*	*
17	BNB 09 (T)	Carcinossarcoma	10	Poodle	F	Não	Não	Não	Não	Nulípara	Viva	Não se aplica
18	BNB 19 (T)	Carcinossarcoma Grau III	9	Dashhund	F	Não	Não	Não	Não	Nulípara	Viva	Não se aplica
19	BNB 20 (T)	Fibrossarcoma	4	SRD	F	Sim	Não	Não	Não	Nulípara	Óbito	6 meses
20	BNB 25(T)	Carcinossarcoma Grau III	5	Poodle	F	Não	Sim	Não	Não	Nulípara	*	*
21	BNB 26 (T)	Adenocarcinoma	*	SRD	M	Não se aplica	Não se aplica	Não	Não	Não se aplica	*	*
22	BNB 48 (T)	Carcinossarcoma	13	Cocker	F	Sim	Não	Não	Não	Primípara	Óbito	4 meses
23	BNB 169 (T)	Carcinoma indiferenciado (Carcinoma inflamatório mamário)	8	Schnauzer	F	Não	Sim	Não	Não	Nulípara	Óbito	2 meses