



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

Verena da Costa Ferreira

**PERFIL DE METILAÇÃO E MUTAÇÃO DO GENE *BRCA1* EM TUMORES
MAMÁRIOS CANINOS**

Belém

2015



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

Verena da Costa Ferreira

**PERFIL DE METILAÇÃO E MUTAÇÃO DO GENE *BRCA1* EM TUMORES
MAMÁRIOS CANINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração:

Saúde Animal

Belém

2015



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

Verena da Costa Ferreira

**PERFIL DE METILAÇÃO E MUTAÇÃO DO GENE *BRCA1* EM TUMORES
MAMÁRIOS CANINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Saúde Animal.

Data da aprovação:

___/___/___

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Bárbara do Nascimento Borges (Orientadora)
UFRA- UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

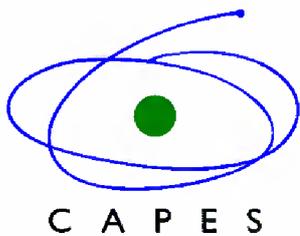
Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano (1º Examinador)
ICB - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Prof^a. Dra. Maria Lúcia Harada (2º Examinador)
ICB - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Profa. Dra. Danielle Queiroz Calcagno (3º Examinador)
UNACON - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira (Suplente)
ICB - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

FONTES FINANCIADORAS



**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CAPES**



Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA



**Conselho Nacional de Conhecimento Científico e Tecnológico
- CNPq**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural da Amazônia, pela oportunidade de realizar a Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado durante todo o curso e pelo apoio financeiro.

A equipe do Laboratório Francisco Mauro Salzano pelo espaço cedido para o desenvolvimento do projeto.

A meus pais e as minhas irmãs pelo amor incondicional que nos une, pela confiança, amizade, companheirismo e por todos os ensinamentos.

Ao meu amado marido, pelo amor, fidelidade, amizade, companheirismo e paciência. Minha vida não seria completa longe de você.

A minha orientadora, Professora Bárbara Borges pelo apoio durante esses dois anos e por todos os ensinamentos, paciência e dedicação.

Aos amigos que fizeram parte desta jornada, que em diversos momentos, foram cruciais para que cada etapa se cumprisse.

Aos amigos do LABIOMOL, Mariana Araújo, Wallax Augusto, Danilo Pinheiro, Thamirys Faro, Raissa Melo, Iane Guimarães, Mayra Pacheco (Mairex), Adriana Teixeira (Drica), Mariceli Baia (Mari), Carlos Costa, Keitty Reis (Skate) e Natália Kiss por todos os momentos de aprendizado e descontração dentro e fora do laboratório.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho minha eterna gratidão, muito obrigada por tudo!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação e resultados histopatológicos dos pacientes com amostras teciduais pareadas.	28
Tabela 2. Identificação e resultados histopatológicos dos pacientes com amostras teciduais não pareadas.	30
Tabela 3. Sequências de iniciadores usadas para realização da análise genotípica com suas respectivas temperaturas de anelamento.	31
Tabela 4. Sequências de iniciadores usadas para realização da análise epigenética com suas respectivas temperaturas de anelamento.	32
Tabela 5. Identificação das amostras pareadas utilizadas para a análise de metilação do <i>BRCA1</i>	37
Tabela 6. Identificação das amostras não pareadas utilizadas para a análise de metilação do <i>BRCA1</i> .	38
Tabela 7. Variação genética no Intron 8 - Éxon 9 do gene <i>BRCA1</i> em amostra mamária tumoral e comparação histopatológica.	39
Tabela 8. Polimorfismos (SNPs) e mutação da região 5'UTR do gene <i>BRCA1</i> em amostra mamária tumoral e comparação histopatológica.	42
Tabela 9. Polimorfismos (SNPs) e mutação da região 5'UTR do gene <i>BRCA1</i> em amostra mamária não tumoral e comparação histopatológica.	43
Quadro 1. Estadiamento tumores mamários caninos (CMTs)	21
Quadro 2. Classificação Histopatológica de tumores mamários caninos	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Hallmarks</i> do Câncer. _____	13
Figura 2. Ação das enzimas DNMT na formação da 5-metil-citosina _____	16
Figura 3. Estrutura da proteína <i>BRCA1</i> e seus domínios. _____	23
Figura 4. Recombinação homóloga e o gene <i>BRAC1</i> . _____	25
Figura 5. Eletroferograma da representação das regiões ricas em ilhas CpGs. _____	38
Figura 6. Eletroferograma da mutação (G>A) no Éxon 9. _____	39
Figura 7. Eletroferograma da mutação (T>C) na região 5'UTR. _____	40
Figura 8. Eletroferograma dos polimorfismos (C>G) na região 5'UTR. _____	41
Gráfico 1. Distribuição racial. _____	33
Gráfico 2. Distribuição de cadelas castradas e não castradas. _____	34
Gráfico 3. Distribuição de quantidades de gestações na população canina estudada. _____	34
Gráfico 4. Distribuição de cadelas com uso de terapia contraceptiva. _____	35
Gráfico 5. Distribuição de cadelas que apresentaram ou não gestações psicológicas. _____	35
Gráfico 6. Percentual de pacientes com e sem metástases. _____	36
Gráfico 7. Distribuição em porcentagem de óbitos. _____	36
Gráfico 8. Distribuição de sobrevivência. _____	37

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. CÂNCER	12
1.2. EPIGENÉTICA E CÂNCER	15
1.3. CÂNCER DE MAMA EM CANINOS	19
1.4. GENE <i>BRCA1</i>	23
2. OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVO GERAL	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. COLETA DAS AMOSTRAS	28
3.2. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA	28
3.3. EXTRAÇÃO DO DNA	30
3.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E ANÁLISE GENOTÍPICA	31
3.5. MODIFICAÇÃO DO DNA	31
3.6. BISSULFITE SEQUENCING PCR (BSP)	31

3.7. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO	32
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	33
4.2. ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE <i>BRCA1</i>	37
4.3. ANÁLISE DO PERFIL DE MUTAÇÃO DO ÍNTRON 8 - ÉXON 9 DO GENE <i>BRCA1</i>	39
4.4. ANÁLISE DO PERFIL DE MUTAÇÃO DA REGIÃO 5'UTR DO GENE <i>BRCA1</i>	39
4.4.1. MUTAÇÃO DA REGIÃO 5'UTR (T/C)	39
4.4.2. POLIMORFISMOS (SNPs) NA REGIÃO 5'UTR	42
5. CONCLUSÕES	45
6- REFERÊNCIAS	46
7- ANEXOS	51
7.1. ANEXO II - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA CEUA/UFRA	52
7.2. ANEXO I - TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	53
7.3. ANEXO 3 - TABELA COMPLETA TUMOR DE MAMA CANINO	54

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia de maior prevalência e a principal causa de morbidade e mortalidade entre mulheres do mundo todo. Em cadelas não castradas, tumores mamários são a neoplasia mais frequentes, com incidência de duas a três vezes superior a observada em mulheres e correspondendo a cerca de 50% dos tumores que acometem caninos. Sabe-se que em mulheres alterações no gene *BRCA1* são associadas a predisposição genética para o desenvolvimento de neoplasias mamárias. Em contraste com os seres humanos, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que contribuem para o desenvolvimento de tumores em caninos. Sendo assim, o presente estudo objetiva avaliar o perfil de mutação e de metilação do gene *BRCA1* em tecido mamário canino tumoral e sadio, afim de caracterizar as alterações genéticas e epigenéticas do gene e a possível influência destas na carcinogênese mamária canina. Para isso, foram coletadas amostras de tecido tumoral e sadio de pacientes submetidas a mastectomia no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia. O DNA foi obtido por extração fenólica e submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de sequenciamento direto, para a análise de mutações nas regiões *hotspots* do gene *BRCA1* (Éxon 9 - Íntron 8 e região 5'UTR). Para a análise de metilação, o DNA foi convertido utilizando o bissulfito de sódio e a região promotora de *BRCA1* foi analisada por *Bissulfite Sequencing* PCR. Foram utilizadas amostras teciduais de 24 animais, sendo 17 amostras pareadas (tecido sadio e tecido tumoral) e 7 amostras não pareadas (tecido tumoral), e classificadas histologicamente em tumores de origem mesenquimal ou epitelial. Coletou-se ainda, dados para a caracterização da população, bem como informações sobre histórico reprodutivo dos animais para correlação com os resultados obtidos. Não foi observado hipermetilação na região promotora do *BRCA1* em nenhuma das amostras analisadas, o que nos leva a sugerir a ausência de envolvimento deste padrão na tumorigênese mamária canina. Para o Éxon 9 - Íntron 8 foi observada mutação em uma única amostra, caracterizada por uma transição (G>A), ainda não descrita na literatura pesquisada. Os polimorfismos encontrados na região 5'UTR foram caracterizados por duas alterações, uma transição (T>C) observada em 3 amostras (2 tecido tumoral e 1 tecido não tumoral) não descrita na literatura e observada em pacientes portadores de tipos histológicos de prognóstico desfavorável, e a transição (C>G) observada em 8 amostras (6 tecido tumoral e 2 tecido não tumoral), sendo que esta, quando correlacionada ao histórico dos animais sugere, que a presença do alelo selvagem G favoreça o desenvolvimento tumoral, principalmente em em pacientes jovens independentemente de seu status reprodutivo. Não foi possível caracterizar a importância das mutações no Éxon 9 e na região 5' UTR no processo tumoral devido sua baixa frequência, e portanto mais estudos precisam ser realizados com um maior número amostral, bem como investigação de outras alterações genéticas e epigenéticas para melhor caracterizar as alterações que favorecem o desenvolvimento de CMTs.

Palavras-chave: Alterações genéticas, Epigenética, câncer de mama, cães

ABSTRACT

Breast cancer is the most common neoplasia and the major contributor to overall morbidity and mortality among women worldwide. In not spayed female dogs, mammary tumors are the most common neoplasia with an incidence of two to three times superior that related in women and representing about 50% of the tumors affecting this species. In women it is known about the inherited risk for those with mutations in *BRCA1* to develop mammary tumors. Even less is known about the molecular mechanism that contribute to canine mammary tumors formation. Meanwhile, this research evaluated the whole of mutations and methylation in *BRCA1* gene, in tumoral and non tumoral tissues of canine mammary glands, and therefore, characterize the genetic and epigenetic alterations in this gene and its influence in mammary carcinogenesis on this specie. Therefore, tumoral and non tumoral samples of canine mammary glands were collected by surgical intervention in the veterinary hospital of Universidade Federal Rural da Amazônia. The DNA was obtained by phenolic extraction and amplified using PCR, followed by direct DNA sequencing, to analyze mutations in hotspots regions in the *BRCA1* (Éxon 9 - Íntron 8 and 5'UTR). For methylation analises, the DNA was converted with bissulfite and the promoter region of *BRCA1* was analyzed by *Bissulfite Sequencing* PCR. Samples of 24 animals were analyzed, 17 paired samples (tumoral and non tumoral tissues) and 7 non paired samples (tumoral tissue), classified by its histogenesis in mesenquimal or epitelial tumors. Informations of reproductive history from the animals were accessed and correlated with the genetic findings. Hypermethylation in the *BRCA1* promoter was not observed in the analyzed samples, suggesting there was no evidence of this mechanism in canine mammary tumorigenesis. In one sample, was observed a mutation in the Éxon 9 - Íntron 8 characterized by a transition (G>A), not described in the literature. The polimorfisms in 5'UTR region were characterized by a two changes, a trasição (T>C) observed in 3 samples (2 tumoral e 1 non tumoral tissue) not described in the literature, and observed in patients with histological types of desfavorable prognostic. The transition (C>G), was observed in 8 samples (6 tumoral e 2 non tumoral tissues), and when correlated with animals data, suggest that the allele G presence could increase the risk of mammary tumors especially in young female patients independently of its reproductive status. It was not possible to define the importance of the genetic changes in Éxon 9 and 5' UTR region in the CMTs, by its low frequency and therefore, it is necessary more researches, with a higher number of samples, as well as other genetic and epigenetic studies to better recognize the genetic changes participating of the tumorigenesis in CMTs.

Palavras-chave: Genetic changes, epigenetic, breast cancer, dogs

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

O câncer surge como resultado de alterações genéticas e epigenéticas que influenciam no controle e atividade de diversos genes, particularmente os envolvidos nos processos de diferenciação, crescimento e apoptose, promovendo uma proliferação celular anormal (Levitt & Hickson, 2002; Vogelstein & Kinzler, 2004; Sadikovic et al., 2008; Ali & Sjöblom, 2009).

Os tumores geralmente possuem células progenitoras cujos clones e subclones possuem alterações genéticas, epigenéticas e estado de diferenciação desiguais. Esta heterogeneidade contribui para que o mesmo tipo tumoral apresente comportamentos clínicos diferenciados e portanto, sensibilidade diferenciada à quimioterapia, radioterapia e outros tratamentos dificultando assim o manejo clínico da doença. Por estas razões, os eventos que iniciam o desenvolvimento do câncer possuem importância clínica e devem ser considerados como prioridade para a busca de tratamentos mais eficazes (Croce et al., 2008).

Devido o crescimento e o aumento da expectativa de vida da população mundial, a incidência de câncer aumentou, estimando-se que para o ano de 2030, ocorrerão aproximadamente 26 milhões de novos casos com 17 milhões de óbitos (World Cancer Report, 2008). Nos Estados Unidos da América, o câncer é considerado a segunda principal causa de mortalidade em pessoas (Jemal et al., 2009) e no Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para os anos de 2014/2015 é de 576 mil novos casos, tendo como segundo no ranking, o câncer de mama em mulheres, totalizando 75 mil casos novos (INCA, 2014). Tais estimativas tornam o câncer um problema de saúde pública não somente nacional, mas mundial, e por esta razão, estudos que possam auxiliar no seu controle, diagnóstico, tratamento e prevenção se fazem tão importantes.

Segundo Jemal et al. (2011) o câncer de mama é a neoplasia de maior prevalência e a principal causa de morbidade e mortalidade entre mulheres do mundo todo. Este tumor acomete pacientes de meia idade (50-64 anos) e fatores como uso de terapias hormonais, idade a menarca e menopausa, quantidade de gestações, dieta, bem como hereditariedade, podem predispor ao desenvolvimento neoplásico nas mamas (McPherson & Dixon, 2000).

Nos países ocidentais, cerca de 10% das neoplasias mamárias em mulheres ocorrem por predisposição genética de origem familiar e os genes mais estudados são o *BRCA1* e *BRCA2*, visto que estes quando alterados, seja por mecanismos genéticos ou epigenéticos,

predispõem ao desenvolvimento de tumores mamários e ovarianos (McPherson & Dixon et, 2000).

O câncer surge por meio de várias etapas que modificam progressivamente as células normais evoluindo-as para um estado neoplásico potencialmente maligno (Hanahan & Weinberg, 2000; Lou et al., 2009). Estas células neoplásicas adquirem características em comum denominadas de *Hallmarks* (Hanahan & Weinberg, 2000). Hanahan & Weinberg (2000), sugeriram que a maioria dos cânceres adquiriam as mesmas características funcionais durante seu desenvolvimento: evasão a apoptose, auto suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de anti crescimento, angiogênese sustentada, invasão de tecidos/metástases e potencial replicativo ilimitado. Uma década mais tarde, os autores sugeriram duas novas características envolvidas na patogênese do câncer: danos ao DNA por estresse e evasão da supervisão imunológica, bem como duas alterações inerentes a neoplasia: instabilidade genômica/ mutação e microambiente inflamatório compreendendo assim as dez marcas do câncer (Hanahan & Weinberg, 2011).



Estas características são adquiridas pela célula tumoral por meio da ativação e modificação de mecanismos celulares, que coordenam processos como a proliferação celular, migração, polaridade, apoptose e diferenciação durante a embriogênese e homeostase dos tecidos (Hanahan & Weinberg, 2011). Muitas destas características podem ser provocadas por alterações genéticas como a mutação, a amplificação e o aumento da expressão de oncogenes em conjunto com a perda de função (mutação), deleção, e/ou silenciamento epigenético de genes supressores tumorais importantes (Lou et al. 2009).

Os oncogenes são genes que codificam proteínas que controlam a proliferação celular e apoptose. Sua ativação geralmente ocorre por meio de amplificações, mutações de ponto, translocações e fusões cromossômicas, inserções retrovirais e ainda eventos epigenéticos. As translocações e mutações ocorrem como eventos iniciais ou durante a progressão tumoral, enquanto que amplificações usualmente ocorrem durante a progressão tumoral. Seus produtos podem ser classificados em seis grandes grupos: fatores de transcrição, remodeladores de cromatina, fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, transdutores de sinais e os reguladores de apoptose, sendo que, cada um desses grupos influenciam de forma diferente o processo de tumorigênese (Osborne et al., 2004; Croce et al, 2008).

Já os genes supressores tumorais são definidos como genes codificadores de proteínas que atuam em funções importantes como regulação do ciclo celular e apoptose, diferenciação, integridade genômica/ reparo do DNA e adesão celular, impedindo assim, que as células sofram transformação maligna. De acordo com sua função, podem ser divididos em duas grandes categorias: *Gatekeepers* e os *Caretakers* (Oliveira et al., 2005).

Os *Gatekeepers* atuam inibindo o crescimento tumoral e induzem a morte da célula, seja por meio da supressão da proliferação, indução da apoptose ou promovendo a diferenciação celular. (Oliveira et al., 2005; Van Heemst et al., 2007).

Em tumores de origem hereditária a inativação desses genes contribui diretamente para o desenvolvimento e progressão tumoral e freqüentemente, esta inativação é bialélica, ou seja, um alelo é inativado nas células germinativas, transferido para prole (hereditário), enquanto o segundo alelo é inativado nas células somáticas (Oliveira et al., 2005). Dessa forma, segundo a hipótese dos “dois eventos” de Knudson (1971), esta classe de genes funciona de maneira recessiva nas células e para que o fenótipo maligno seja observado, dois eventos mutacionais devem ocorrer para que o gene seja inativado. Dessa forma, conclui-se

que um único alelo funcionalmente normal é o suficiente para proteger o indivíduo da transformação maligna (Berger et al., 2011).

Os *Caretakers* são genes que não regulam diretamente a proliferação celular, mas atuam protegendo o genoma contra mutações por meio do reparo do DNA e prevenindo a instabilidade genômica. Dessa forma, a perda de suas funções não está diretamente relacionada ao desenvolvimento tumoral, entretanto quando mutados aceleram a conversão de células normais em neoplásicas. Muitos *Caretakers* são requeridos para a manutenção da integridade do genoma e sua inativação pode elevar a taxa de mutação no DNA, aumentando as chances de um *Gatekeeper* perder sua função, retificando a importância destes genes na supressão da transformação neoplásica (Levitt et al., 2002; Oliveira et al., 2005; Van Heemst et al., 2007).

1.2. EPIGENÉTICA E CÂNCER

A atual definição de epigenética é “o estudo das alterações hereditárias da expressão de um gene que ocorre independentemente das modificações primárias do DNA”. A maioria dessas alterações hereditárias são estabelecidas durante a diferenciação celular e mantidas durante a divisão, permitindo que as células possuam características distintas (Shikhar et al., 2010).

Duas características importantes do estado epigenético das células são: o processo epigenético é reversível e portanto fornece adaptação e regeneração celular em novos microambientes; a estrutura da cromatina é herdada, o estado cromático possui memória e é transmitido para as células filhas na ausência de perturbações (Lange & Schneider, 2010; Blancafort et al., 2013).

Assim, a herança epigenética é importante em muitos processos fisiológicos incluindo a diferenciação, silenciamento cromossômico, a exemplo do cromossomo X em fêmeas mamíferas, plasticidade das células tronco, envelhecimento e *imprinting* genômico. (Hatziapostolou et al., 2011).

Avanços nas pesquisas epigenéticas revelaram que as células tumorais humanas abrigam numerosa quantidade de anormalidades epigenéticas além das alterações genéticas.

Tais alterações genéticas e epigenéticas interagem em todos os estágios do desenvolvimento tumoral, promovendo a progressão. Sendo assim, sugere-se que as alterações epigenéticas possam ser o evento chave da iniciação de determinados tipos de câncer (Shikhar et al., 2010). Essas alterações podem desencadear o silenciamento de genes supressores tumorais e/ou a reativação de regiões silenciadas, o que levar a ativação de oncogenes (Blancafort et al., 2013).

Dentre os mecanismos epigenéticos, quatro categorias relacionadas à modificação da cromatina são importantes: metilação do DNA, modificações de histonas, remodelamento da cromatina e RNAs não codificantes incluindo os miRNAs (Shikhar et al., 2010).

A metilação do DNA, é a modificação epigenética mais estudada em mamíferos e fornece um mecanismo de silenciamento genético, participando de forma importante na regulação da expressão gênica e arquitetura da cromatina (Shikhar et al., 2010).

A metilação é uma modificação covalente na qual um grupo metil é incorporado ao carbono 5 do um anel pirimídico de um resíduo de citosina usando a enzima S-adenosil metionina (SAM) como doador universal em dinucleotídeos CpG (**Figura 2**). Essa transferencia do grupo metil é catalisada pela família de DNA metiltransferases (DNMTs) presentes na forquilha de replicação durante a fase S (Taby et al., 2010; Shikhar et al., 2010).

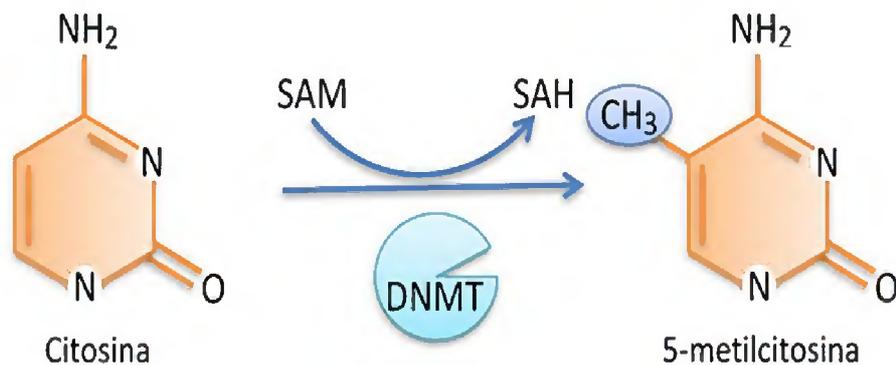


Figura 2. Ação das enzimas DNMT na formação da 5-metil-citosina (m⁵C). DNMT: DNA metiltransferase; SAM: S-adenosil-metionina; SAH: S-adenosil-homocisteína (www.lookfordiagnosis.com).

Os dinucleotídeos CpG não estão distribuídos de forma homogênea no genoma humano e geralmente mais de 90% das citosinas metiladas estão concentradas em grandes regiões de sequências repetitivas e em trechos de DNA ricos em CpG, chamados de ilhas

CpGs (regiões de 500 a 4.000 pares de base com conteúdo CG maior que 55%). Estas, geralmente, localizam-se na região promotora de um gene, e juntas correspondem a cerca de um terço do genoma humano, ocupando cerca de 60% da região promotora de um gene. Enquanto boa parte dos sítios CpG do genoma estão metilados, a maioria das ilhas CpG, usualmente, mantém-se não metiladas durante a fase de desenvolvimento e diferenciação celular (Shikhar et al., 2010; Taby et al., 2010; Jovanovic et al., 2010; Hatziapostolou et al., 2011).

Sabe-se que citosinas metiladas são mais susceptíveis a modificações por processos mutagênicos endógenos e exógenos do que outras bases do DNA, e que as taxas de mutação nos sítios CpG são 40 vezes mais frequentes que outras mutações transicionais (Jovanovic et al., 2010).

Nas células, as ilhas CpG (normalmente não metiladas) podem tornar-se metiladas, resultando no silenciamento de importantes genes supressores tumorais. Ao mesmo passo que em outras regiões, dinucleotídeos CpG podem torna-se não metilados, acarretando uma fraca repressão transcricional de genes normalmente silenciados como os oncogenes e retrotransposons (Jovanovic et al., 2010).

Existem no mínimo três rotas principais pelas quais a metilação dos sítios CpG podem contribuir para a oncogênese: hipometilação do genoma; hipermetilação da região promotora de genes supressores tumorais e mutagênese; e aumento da ligação de carcinógenos químicos ao DNA, bem como, aumento da mutação induzida pela radiação UV (Hatziapostolou et al., 2011).

Três mecanismos foram propostos para explicar a contribuição da hipometilação na carcinogênese: I) a geração de instabilidade genômica, favorecendo a recombinação mitótica acarretando deleções, translocações e rearranjos cromossômicos; II) a ativação de genes na células somáticas que normalmente deviam estar silenciados por meio da metilação das ilhas CpG na região promotora do gene; III) a perda de grupos metil do DNA que podem levar a interrupção do imprinting genômico (Hatziapostolou et al., 2011).

A hipermetilação contribui com a tumorigênese por meio do silenciamento de genes supressores tumorais. Desde a descoberta da hipermetilação das ilhas CpG da região promotora do gene supressor tumoral associado ao retinoblastoma (*Rb*), outros genes

supressores, incluindo *BRCA1*, *p16* e *MLH1* também se apresentaram silenciados por meio deste mecanismo epigenético (Shikhar et al., 2010).

Os genes supressores tumorais estão envolvidos em processos celulares que são importantes para o desenvolvimento e progressão do câncer, portanto, o silenciamento epigenético destes pode desencadear a iniciação tumoral. A hipermetilação, indiretamente, pode silenciar outras classes de genes por meio da inibição de fatores de transcrição e de genes responsáveis pelo reparo do DNA, possibilitando que as células tumorais adquiram outras alterações genéticas proporcionando rápida progressão tumoral (Shikhar et al., 2010; Hatziapostolou et al., 2011).

Apesar da habilidade da hipermetilação do DNA silenciar os genes supressores tumorais ser bem definida como esses genes se tornam alvos para esta metilação aberrante do DNA ainda é incerto. Acredita-se que este silenciamento forneça uma vantagem de proliferação das células neoplásicas resultando na seleção clonal destas (Shikhar et al., 2010; Hatziapostolou et al., 2011).

Outro mecanismo epigenético estudado é o de RNAs não codificantes que fazem parte de uma família de RNAs que pela complementaridade a região 3' não traduzida (UTR) do RNA mensageiro, leva a sua degradação e subsequente inibição da expressão gênica. Fazem parte dessa família os miRNAs, que são oligonucleotídeos regulados epigeneticamente e que possuem como alvo uma série de genes que participam de funções importantes da célula. Dessa forma, um único miRNA pode ter como alvo vários mRNAs, evidenciando a importância desse sistema de regulação gênica nas funções das células (Taby et al., 2010).

1.3. CÂNCER DE MAMA EM CANINOS

O câncer de mama em cadelas é a neoplasia de ocorrência mais comum, com uma incidência duas a três vezes superior a observada em mulheres, correspondendo a cerca de 50% dos tumores que acometem caninos, geralmente detectados em pacientes de meia idade a idosos (7 -10 anos) (Brodey et al., 1983; Bostock et al., 1986; Cassali et al., 2000; Daleck et al., 2008).

A etiopatogenia do câncer é multifatorial, porém acredita-se que o aumento progressivo da expectativa de vida dos animais aumente a probabilidade de alterações acumularem-se no material genético predispondo o acometimento de neoplasias (Marks et al., 2001).

Algumas raças são apontadas com maior incidência ao desenvolvimento de tumores mamários que outras, sugerindo uma significativa influência genética. Dentre as raças apontadas como de alto riscos estão Boxer, English Springer Spaniel, Poodle, Cocker Spaniel, Dachshund, English Setter and Fox Terrier, sendo que nas duas primeiras raças a incidência de desenvolvimento de tumores é de aproximadamente 40%. Em contrapartida, as raças Collie, Shetland Sheepdog e Bernese Mountain Dog possuem baixo risco de desenvolvimento de neoplasia mamária (Arnesen et al., 2001; Rivera et al., 2009; Borge et al., 2010).

Assim como em mulheres, terapia hormonal a base de progesterona, idade avançada, obesidade e dieta são fatores de risco ao desenvolvimento de tumores em caninos (Lindblad-Toh et al., 2005). Sabe-se que o desenvolvimento destes tumores é hormônio dependente, e que sua incidência varia entre fêmeas castradas e não castradas. Sendo assim, quando a ovariectomia é realizada antes do primeiro estro, o risco de desenvolvimento da neoplasia é de 0,05%, ao passo que, quando a castração é realizada após o primeiro e segundo estro a incidência aumenta em 8% e 26%, respectivamente. Contudo, quando a intervenção ocorre após o segundo ciclo estral observa-se que, o risco de desenvolvimento de tumores mamários é o mesmo observado em cadelas inteiras (não castradas) (Rivera et al., 2009).

Por esta razão, a anamnese, o exame físico das mamas, a realização de exames complementares como *screening* radiográfico, ultrassonografia, citologia, histopatologia e avaliação de linfonodos sentinelas são ferramentas que auxiliam no diagnóstico, estadiamento e prognóstico em tumores mamários caninos (Baker et al., 2000; Sorenmo et al., 2003; Shafiee et al., 2013; Cassali et al., 2013).

Os tumores mamários caninos geralmente se apresentam como nódulos circunscritos de dimensões variáveis, consistentes, móveis ou aderidos a musculatura, a ulceração cutânea e inflamação periférica podem ou não estar associadas. Frequentemente, múltiplos tumores podem ser observados em uma única glândula mamária ou podem envolver simultaneamente mais de uma glândula mamária com diferentes tipos histológicos. Observa-se com certa frequência, que as mamas abdominais e inguinais são mais afetadas quando comparadas com a incidência de CMTs (tumores mamários caninos) nas mamas torácicas (Cavalcanti & Cassali, 2006; Cassali et al., 2013).

A excisão cirúrgica ainda é o procedimento que oferece maior probabilidade de cura, sendo que o tipo de cirurgia depende da extensão tumoral, drenagem linfática, tamanho tumoral e localização das lesões. A cirurgia pode ser curativa para cadelas em estágio inicial da doença, com tumores pequenos, não invasivos e carcinomas bem diferenciados. Diferentemente, pacientes acometidas por tumores extensos e de alto grau possuem maior probabilidade de desenvolvimento de doença metastática, sendo assim, terapias complementares como a quimioterapia e radioterapia podem ser benéficas (Sorenmo et al., 2003; Daleck et al., 2008; Cassali et al., 2013). Geralmente, a disseminação metastática ocorre por via linfática ou hematogêna e o sítio de predileção para o desenvolvimento metastático é o pulmão (Sorenmo et al., 2003).

O estadiamento clínico é baseado no sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO) para tumores mamários caninos (**Quadro 1**). Informações sobre tamanho tumoral (T), invasão linfática (N) e presença ou ausência de metástase (M) precisam ser acessadas para que seja possível determinar prognóstico e linhas de tratamento (Owen, 1980).

Quadro 1. Estadiamento de CMTs por Lana et al, 2007. Adaptado de Cassali et al., 2013.

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

Segundo Cassali et al. (2013), no que diz respeito a classificação histopatológica, a classificação mais difundida é a publicada por Misdorp et al. em 1999 pela AFIP (Instituto de Patologia das Forças Armadas), representado no Quadro 2. As lesões malignas são divididas em duas grandes categorias: os carcinomas cuja origem ocorre de células epiteliais e mioepiteliais dos ductos ou alvéolos; e os sarcomas que são tumores de origem mesenquimal (tecido conjuntivo) podendo haver diferenciação em matriz óssea, cartilaginosa, fibrosa ou associações (Cassali et al., 2013).

Quadro 2. Classificação Histopatológica de CMTs por Misdorp et al.,1999. Adaptado de Cassali et al., 2013.

<p><u>Lesões Epiteliais Não Neoplásicas</u></p> <p>Hiperplasia Epitelial Hiperplasia Ductal Hiperplasia Lobular Adenose</p> <p>Lesões nas Células Colunares Alteração da Célula Colunar Hiperplasia da Colunar Lesões Atípicas das Células Colunares</p> <p><u>Tumores Benignos</u> Adenoma Adenoma Complexo Adenoma Basiloide Fibroadenoma Tumor Mixto Benigno Papiloma Ductal</p> <p><u>Tumores Malignos</u></p> <p>Carcinomas Carcinoma in situ Carcinoma Ductal in situ Carcinoma Lobular in situ Carcinoma em tumor mixto Carcinoma Complexo Carcinoma Papilar Carcinoma Tubular Carcinoma Sólido</p>	<p>Tipos Especiais de Carcinomas Carcinoma micropapilar Carcinoma Lobular Invasivo Carcinoma Lobular Pleomórfico Carcinoma Mucinoso Carcinoma Rico em Lipídeos Carcinoma Células Escamosas Carcinoma Espinocelular Carcinoma Anaplásico Neoplasmas Mamários com Diferenciação Sebácea</p> <p>Sarcomas Fibrossarcoma Osteossarcoma Carcinossarcoma Sarcoma em Tumor Mixto</p> <p>Outros Sarcomas Condrossarcoma Lipossarcoma Hemangiossarcoma</p>
--	---

No que diz respeito a estudos na área da biologia molecular, observou-se que nos carcinomas mamários caninos a expressão alterada dos genes *TP53* e *HER-2* é similar a encontrada nos carcinomas de mulheres, o que sugere que esses genes possuem papel importante na carcinogênese mamária canina e grande potencial como indicadores de prognóstico (Arnesen et al., 2001).

Devido a elevada incidência do câncer de mama em caninos seu estudo vem crescendo em relação a outras afecções, bem como a exigência por parte dos proprietários de que seus

animais recebam atenção e tratamentos semelhantes aos prestados a pacientes humanos (Daleck et al., 2008).

1.4. GENE *BRCA1*

O gene *BRCA1*, descoberto nos anos noventa, foi o primeiro gene a ser associado com o câncer mamário hereditário. Em seres humanos, está localizado na região 17q21 e composto por 24 éxons. Codifica uma proteína com 1.863 aminoácidos que participa do reconhecimento de danos e reparo do DNA, atuando como um gene supressor tumoral (van der Groep et al., 2011). Em caninos esse gene foi identificado no cromossomo 9, é composto por 27 éxons e codifica uma proteína de 1.878 aminoácidos, que possui uma alto grau de conservação quando comparada a *BRCA1* humana, correspondendo a 85% de similaridade para os resíduos 1767 - 1863 (Szabo et al., 1996).

Este gene codifica uma proteína (**Figura 3**) composta por um motivo dedo de zinco, um domínio C terminal (BRCT) e pelo sinal de localização nuclear e os motivos de exportação nuclear. Todas as proteínas que possuem este motivo (dedo de zinco), desempenham papel na via da ubiquitinação. Os motivos dedo de zinco são compostos por aminoácidos Cys3HysCys4 que são altamente conservados, sendo que quaisquer alterações na combinação destes podem afetar as propriedades de ligação da proteína expressa do *BRCA1* (Karami & Mehdipour, 2013).



Figura 3. Estrutura da proteína *BRCA1* em humanos e seus domínios. Adaptado de Karami & Mehdipour (2013).

Quando danos ao DNA ocorrem, a BRCA1 se associa a múltiplas proteínas de reparo e reguladores de ciclo celular, sendo capaz de formar complexos com RAD51, que ativam o reparo na quebra da fita dupla de DNA (DSBs) e iniciam a recombinação homóloga (HR). Para que essa função ocorra, pequenas ligases modificadoras de ubiquitina são essenciais para a ligação de BRCA1 em locais de dano ao DNA (Galanty et al., 2009; Filippini et al., 2013).

Outra região importante da proteína, o domínio BRCT, desenvolve papel importante no controle do ciclo celular, recombinação homóloga e na supressão tumoral, permitindo assim, que a BRCA1 desempenhe funções extras que ajudem a manter a estabilidade genômica e a supressão tumoral (Filippini et al., 2013).

Os níveis de expressão de BRCA1, BRCA2 e RAD51 aumentam nas células quando estas entram na fase S do ciclo celular, indicando que essas proteínas são necessárias durante ou após a replicação do DNA. Isso significa que esses genes possuem uma função em comum: proteger a integridade do genoma e manter a estabilidade cromossômica (Scully et al., 2000; van der Groep et al., 2011).

A BRCA1 possui uma função muito importante no ciclo celular ajudando no reparo do DNA pela recombinação homóloga (HR) que ocorre durante as fases S e G2 do ciclo celular (**Figura 4**). Portanto, a ausência da ação de BRCA1, impede que a recombinação homóloga aconteça corretamente, contribuindo com um reparo das quebras por meio de mecanismos passíveis de erros, como a recombinação não homóloga (NHEJ) (Foulkes & Shuen, 2013).

Há relatos de mais de 2.000 mutações no *BRCA1* que incluem: mutações pontuais que geram códons terminais, deleções completas ou parciais de éxons, inserções de íntrons e mutações que afetam a regulação da transcrição. Muitas destas resultam em proteínas truncadas que levam a perda de função (Peto et al. 1999; Easton et al., 2007).

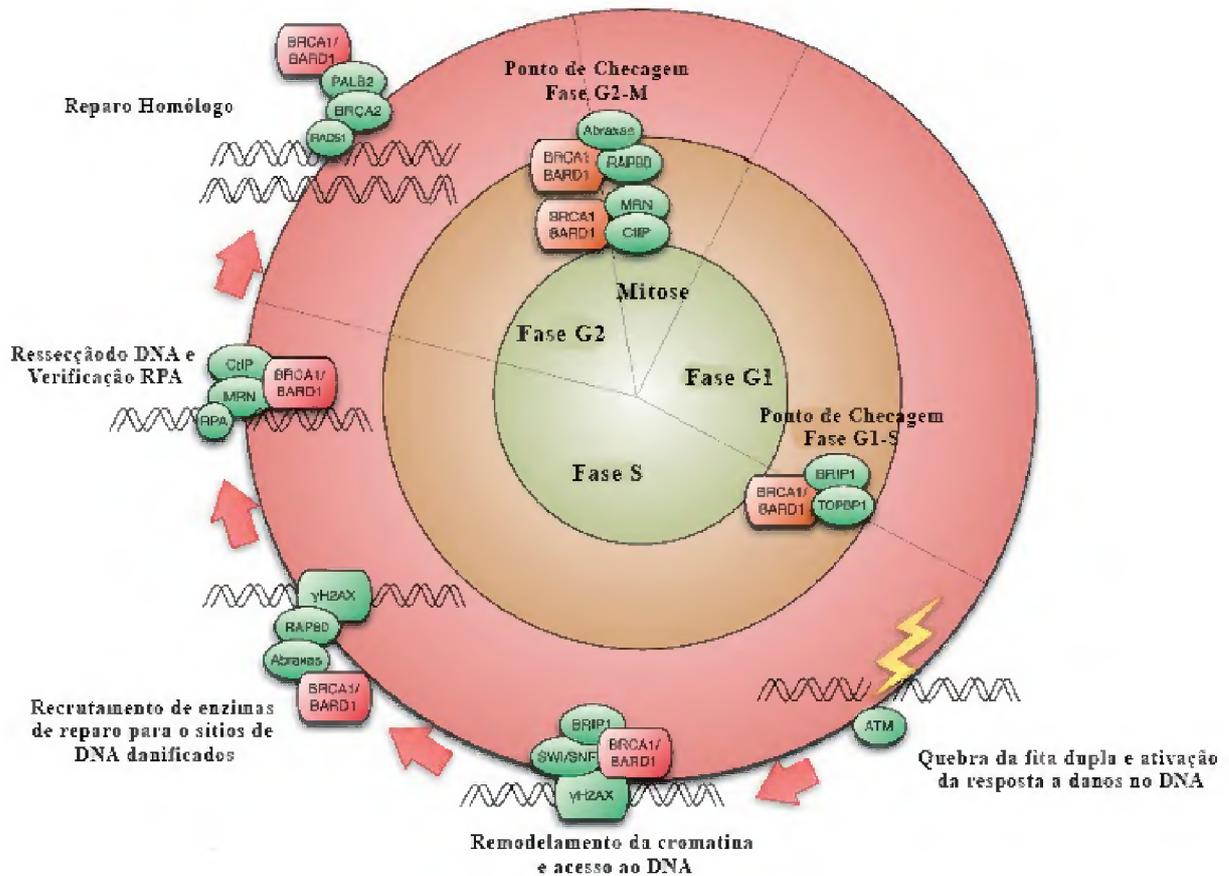


Figura 4. Recombinação homóloga e BRAC1. Em resposta ao dano no DNA, BRCA1 coordena HR e a regulação do ciclo celular, quando ligado a diferentes macrocomplexos; após a ruptura da fita dupla as cinases ATM e ATR fosforilam uma série de reguladores que iniciarão a resposta aos danos no DNA; após modificações enzimáticas complexas por ubiquitinação e SUMO, receptores associados a proteínas (RAP 80) recrutam BRCA 1 e outras enzimas de reparo, para os sítios danificados; o BRCA1 é então envolvido na ressecção das terminações do DNA, a fim de formar uma fita simples de DNA que é protegido por uma proteína de replicação (RPA); o macrocomplexo BRCA1/ PALB2 / BRCA2 é então necessário para o deslocamento RPA e carreamento RAD51 para o DNA de fita simples (ssDNA); o RAD51 media a invasão nas cromátides irmãs e reparação homóloga Adaptado Foulkes & Shuen, 2013.

Rearranjos, incluindo inserções, deleções e duplicação de mais de 500 kb no DNA foram identificados com relatos de pelo menos 19 rearranjos genômicos no *BRCA1*. Outra alteração como a perda da heteroziguidade (LOH) tem sido correlacionada ao câncer de mama porém, esta, não é requerida para o *BRCA1* no que diz respeito ao desenvolvimento da tumorigênese e já que quando presente, provavelmente, é um evento tardio do câncer. Ainda, a hipermetilação da região promotora do *BRCA1*, enquanto mecanismo de silenciamento é

reportada em 11 a 30% do tumores mamários esporádicos e de 42 a 51% dos câncer de mama hereditários em mulheres sem mutação no *BRCA1* (Tapia et al., 2008).

No que se refere a mutações somáticas do gene *BRCA1* há relatos de que a perda da heterozigossidade no cromossomo 17q21 em humanos, é encontrada em metade dos cânceres de mama e ovário esporádicos (Magdinier et al., 1998).

Diversos estudos em tumores mamários caninos relatam as regiões 5'UTR e Intron 8 - Éxon 9 como regiões *Hot spots* e que alterações nesses segmentos podem ter influencia sob o controle da síntese e da conformação da proteína BRCA1, respectivamente (Liu et al., 2000; Signori et al., 2001; Sobczak et al., 2002; Sangeeta et al., 2009; Rivera et al., 2009; Engiler et al., 2013).

Em caninos o estudo da origem molecular do cancer é recente. Riviera (2009) em seus estudos sobre polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) codificantes e não codificantes observou que o gene *BRCA1* está envolvido no desenvolvimento de CMTs, e que estes SNP's podem modificar a estrutura ou função da proteína, ou podem ter efeitos sobre a transcrição.

As pesquisas envolvendo regiões codificantes e não codificantes do gene *BRCA1* são recentes. Sabe-se que polimorfismos envolvendo estas regiões podem ter efeito sobre o desenvolvimento tumoral, pois estas causam alterações na estrutura ou função da proteína, enquanto que, as alterações nas regiões não codificadoras podem afetar a transcrição (Borge et al., 2011).

Sugiura et al. (2007) em sua pesquisa, não observaram evidências de mutação do gene *BRCA1* em tumores mamários caninos esporádicos, entretanto relataram presença de algumas mutações somáticas em tumores ovarianos. Observaram ainda, que a redução nos níveis de mRNA e altos níveis de metilação da região promotora do gene, são eventos importantes na tumorigenese de tumores mamários esporádicos.

Já Borge et al. (2010), identificou 64 polimorfismos em 11 genes associados ao câncer de mama canino. Destes, quatro estariam localizados em BRCA1, um em região codificante e três em regiões adjacentes não codificantes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de metilação da região promotora do gene e mutação das regiões *Hot spots* do gene *BRCA1* em tumores mamários caninos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o padrão de metilação da região promotora do gene *BRCA1* em tumores mamários caninos;

Avaliar a presença de mutações e polimorfismos nas regiões *hotspot* de *BRCA1*;

Correlacionar a presença de alterações moleculares com dados histopatológicos, idade raça, status reprodutivo, quantidades de gestações, presença de pseudocistes e uso de contraceptivos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de tecido mamário canino foram obtidas, por meio de procedimentos cirúrgicos realizados nos pacientes do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). Foram utilizadas amostras teciduais de 24 animais, sendo 16 amostras pareadas (tecido sadio e tecido tumoral) e 8 amostras não pareadas (tecido tumoral), armazenadas em microtubos contendo solução de *RNA later* (Ambion Inc.) e conservadas a temperatura de -20°C até o momento da extração do DNA.

Os proprietários dos animais do presente estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) para a doação das amostras e ressalta-se que esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRA (Protocolo 001/2013 CEUA - 23084.000265/2013-53 UFRA) (Anexo 2).

3.2. CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As amostras dos 24 animais foram classificadas histologicamente pelo Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal Rural da Amazônia e tabeladas (**Tabela 1 e 2**) contemplando identificação dos pacientes e informações de idade, raça e sexo.

Tabela 1. Identificação e resultados histopatológicos dos pacientes com amostras teciduais pareadas.

CANINO	IDENTIFICAÇÃO LABIOMOL	IDADE	RAÇA	SEXO	TIPO TUMORAL
1	BNB 01 (NT)	15	SRD	F	CARCINOSARCOMA DIFERENCIADO
	BNB02 (T)				
2	BNB 03 (NT)	10	SRD	F	ADENOCARCINOMA POUCO DIFERENCIADO
	BNB04 (T)				
3	BNB 05 (NT)	7	SRD	F	CARCINOSARCOMA
	BNB 06 (T)				
4	BNB 07 (NT)	4	Poodle Toy	F	FIBROADENOCARCINOMA
	BNB 08 (T)				

SRD: Sem raça definida

Tabela 1 (cont.).

CANINO	IDENTIFICAÇÃO LABIOMOL	IDADE	RAÇA	SEXO	TIPO TUMORAL
5	BNB 10 (NT)	12	SRD	F	CARCINOSARCOMA GRAU III
	BNB 11 (T)				
6	BNB 12 (NT)	12	SRD	F	ADENOCARCINOMA PAPILÍFERO GRAU III
	BNB 13 (T)				
7	BNB 15 (NT)	10	Pinscher	F	ADENOCARCINOMA PAPILÍFERO
	BNB 16 (T)				
8	BNB 17 (NT)	10	SRD	F	TUMOR MISTO CARCINOMATOSO
	BNB 18 (T)				
9	BNB 21 (NT)	15	SRD	F	ADENOCARCINOMA PAPILÍFERO
	BNB 22 (T)				
10	BNB 23 (NT)	15	SRD	F	OSTEOCONDROSSARCOMA
	BNB 24 (T)				
11	BNB 45 (NT)	15	SRD	F	CARCINOSARCOMA GRAU II
	BNB 46 (T)				
12	BNB 50 (NT)	8	SRD	F	ADENOCARCINOMA GRAU I
	N 71 (T)				
13	BNB 132 (T)	SI	Poodle Toy	F	ADENOMA TUBULAR
	BNB 139 (NT)				
14	BNB 144 (NT)	8	Yorkshire	F	ADENOCARCINOMA TUBOLO PAPILÍFERO GRAU III
	BNB 145 (T)				
15	BNB 175 (NT)	SI	Poodle Toy	F	ADENOCARCINOMA
	BNB 176 (T)				
16	N 57 (NT)	5	Rottweiler	F	ADENOCARCINOMA TUBOLO PAPILÍFERO GRAU II/ III
	N 58 (T)				
	N 59 (T)				

SRD: Sem raça definida; SI: Sem informação

Tabela 2. Identificação e resultados histopatológicos dos pacientes com amostras teciduais não pareadas.

CANINO	IDENTIFICAÇÃO LABIOMOL	IDADE	RAÇA	SEXO	TIPO TUMORAL
17	BNB 09 (T)	4	Poodle toy	F	CARCINOSARCOMA
18	BNB 19 (T)	9	Dachshund	F	CARCINOSARCOMA GRAU III
19	BNB 20 (T)	4	SRD	F	FIBROSARCOMA
20	BNB25 (T)	5	Poodle toy	F	CARCINOSARCOMA GRAU III
21	BNB 26 (T)	-	SRD	M	ADENOCARCINOMA
22	BNB 48 (T)	13	Cocker	F	CARCINOSARCOMA
23	BNB125 (T)	5	SRD	F	SI
24	BNB 169 (T)	8	Schnauzer	F	CARCINOMA INDIFERENCIADO (Carcinoma inflamatório mamário)

3.3. EXTRAÇÃO DO DNA

O isolamento do DNA foi realizado pelo método de fenol clorofórmio (Sambrook et al., 1989), contendo algumas modificações.

- Transferir cerca de 20 mg tecido mamário para um microtubo de 1,5 ml.
- Adicionar 300 µl de tampão de homogeneização, 300 µl de tampão de lise e 20 µl de proteinase K (10 mg/ml), o material foi misturado por inversão e incubado em banho maria a uma temperatura de 55°C durante 30 minutos.
- Adicionar a mistura, 700 µl de fenol-clorofórmio para a precipitação de proteínas homogeneizando por inversão durante 10 minutos, os microtubos foram centrifugados à 14.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo.
- Adicionar 700 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), repetindo-se o processo de homogeneização e centrifugação da etapa anterior. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo ao qual foi adicionado 70 µl de acetato de sódio (AcNa) 3M pH 4,8 e 700 µl de isopropanol para a precipitação do DNA.
- As amostras foram centrifugadas à 14.000 rpm durante 10 minutos descartando-se o sobrenadante. Adicionar 300 µl de etanol 70% e centrifugar durante 5 minutos à 14.000 rpm, descartar o sobrenadante cuidadosamente para que não haja perdas do precipitado de DNA.

- O DNA foi incubado em estufa à 37 °C e dissolvido em tampão de TE pH 8.

3.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ANÁLISE GENOTÍPICA

O DNA obtido foi utilizado para fazer o *screening* molecular da região *hotspot* do gene *BRCA1* (5'UTR e Intron 8 - Éxon 9). Fragmentos gênicos foram analisados e amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando reações e iniciadores específicos para o gene, de acordo com Engiler (2013) como apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Sequências de iniciadores usadas para realização da análise genotípica com suas respectivas temperaturas de anelamento.

Gene	Região	Sequência 5' - 3'	Ta(°C)	Tamanho do Fragmento
<i>BRCA1</i>	Intron 8 - Éxon 9	F: TCCTCAGGATTCTTGGTGGT R: GTGCTGGGAATCTGCCTATC	55	574 pb
<i>BRCA1</i>	5'UTR	F: CGTGGCTTTCTTTTCTTGG R: CTGGATTCCAAAGCTCCTG	53	475 pb

3.5. MODIFICAÇÃO DO DNA

Após a extração, o DNA foi submetido a modificação pelo bissulfito de sódio baseado no protocolo descrito por Herman et al. (1996) e modificado por Borges et al. (2006).

A modificação pelo bissulfito de sódio baseia-se na modificação química das citosinas não metiladas em uracilas. Sendo possível identificar as citosinas metiladas (5-metilcitosinas), por meio de sequenciamento, devido estas permanecerem citosinas (Herman, et al., 1996).

3.6. BISSULFITE SEQUENCING PCR (BSP)

Bissulfite sequencing PCR (BSP) avalia de forma quantitativa o padrão de metilação de um gene, sendo possível identificar quais e quantos sítios encontravam-se metilados na área analisada. O DNA modificado pelo bissulfito de sódio foi submetido a PCR utilizando a estratégia de *Hot Start*, com iniciadores específicos desenhados com o auxílio do programa *MethylPrimer Express* (Life Technologies) em regiões que não continham ilhas CpGs como

apresentado na **Tabela 4**. Foram analisadas 17 amostras escolhidas aleatoriamente, sendo 5 amostras pareadas (tecido tumoral e não tumoral) e 7 amostras não pareadas (tecido tumoral).

Tabela 4. Sequências de iniciadores usadas para realização da análise epigenética com suas respectivas temperaturas de anelamento.

Nome do Iniciador	Ta(°C)	Sequência 5' - 3'	Tamanho do Fragmento	Sítios CpG analisados
BRCA1 met F	46	TTTAGGGAAAGAATTGATGATTAAT	313pb	20
BRCA1 met R		TCCTCTCCCTTCCTATAAAATCTCT		

3.7. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Os produtos do Bisulfite Sequencing PCR foram purificados com o kit “NucleoSpin Gel and PCR clean-up” (Macherey-Nagel), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, objetivando a remoção de sais e resíduos de oligonucleotídeos e dNTPs. Enquanto que os produtos da PCR para a análise genotípica foram purificados com o kit “Pure Link Quick PCR Purification” (Invitrogen).

Após a purificação os produtos foram sequenciados, empregando o método de terminação de cadeia, descrito por Sanger et al. (1977). A reação foi realizada com o Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard (Life Technologies) versão 3.1.

O sequenciamento foi realizado após a purificação das PCRs para a obtenção dos resultados da análise genotípica e do padrão de metilação do DNA.

Após o término da reação, as amostras foram precipitadas com isopropanol 65% e os precipitados sequenciados no aparelho ABI 3130 (Applied Biosystems).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A identificação das alterações nos fragmentos sequenciados foram realizadas no programa BioEdit v. 5.0.6 (HALL, 1999), pelo alinhamento das sequências obtidas com os correspondentes de uma amostra da literatura, para comparação e detecção das alterações. Os testes estatísticos (Exato de Fisher e Odds Ratio) foram realizados no programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

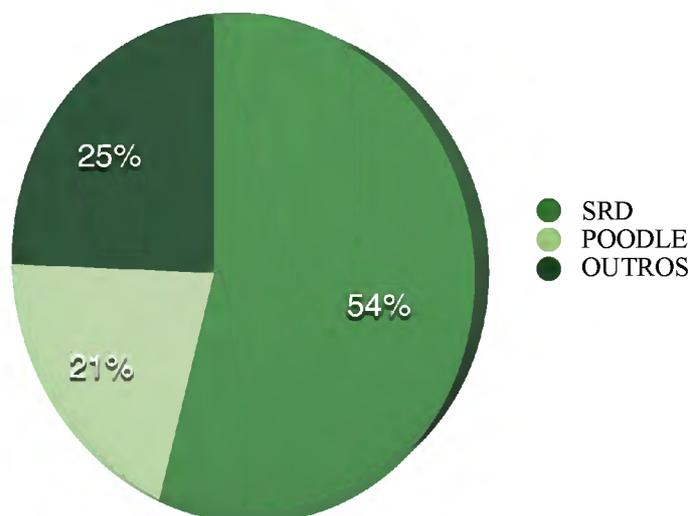
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Dos 24 animais com neoplasias mamárias utilizados para o estudo, foram coletados, quando possível, dados de raça, idade e informações sobre histórico reprodutivo e sobrevida como ilustrado no **Anexo 3**. A média de idade foi de 9,5 com desvio padrão de $\pm 3,6$, sendo a idade mínima de diagnóstico 4 anos e a máxima 15 anos. Segundo Dalek (2008), o câncer de mama em caninos, geralmente é detectado em pacientes de meia idade a idosos (7 -10 anos), corroborando com a média de idade encontrada neste estudo. Apesar disso, seis animais (25%) foram diagnosticado em faixa etária muito precoce (4 -5 anos).

No que diz respeito a distribuição de raças, 54% (13/24) eram cadelas sem raça definida (SRD), 21% (5/24) referente a raça poodle e 25% (6/24) referiam-se a outras raças (Yorkshire, Daschund, Cocker e Rottweiler) como representado no **Gráfico 1**. Algumas raças são apontadas com maior incidência ao desenvolvimento de tumores mamários como Boxer, English Springer Spaniel, Poodle, Cocker Spaniel, Dachshund, English Setter and Fox Terrier (Arnesen et al., 2001; Rivera et al., 2009; Borge et al., 2010). No Brasil, segundo Daleck (2008), há uma incidência alta de pacientes sem raça definida (SRD) diagnosticados com tumores mamários. Neste estudo houve uma maior prevalência de diagnóstico em pacientes SRDs, seguidos da raça Poodle, não estando de acordo com os estudos anteriores de Arnesen et al. (2001), Rivera et al. (2009) e Borge et al. (2010), mas corroborando com os achados de Daleck et al. (2008).

Gráfico 1 : Distribuição Racial



No que se refere a histórico reprodutivo das pacientes, observou-se que 83% (20/24) cadelas não eram castradas, 46% (11/24) nunca haviam gestacionado, como representado nos **Gráficos 2 e 3** abaixo. Segundo Rivera et al. (2009) e Sorenmo et al. (2009), a castração quando realizada antes do primeiro estro, diminui o risco de desenvolvimento da neoplasia mamária para 0,05%, sendo este tipo de câncer o mais relatado em cadelas não castradas. Neste estudo, 83% das cadelas não eram castradas, indicando que o tipo de status reprodutivo possa ter favorecido o desenvolvimento tumoral. No que diz respeito a quantidade de gestações, observou-se que a maioria das pacientes nunca haviam gestacionado. Segundo Daleck (2008), em caninos o efeito gestacional protetivo observado em mulheres, não está bem definido, e portanto não se pode afirmar se esta característica possui influência no desenvolvimento tumoral.

Gráfico 2: Distribuição de cadelas castradas e não castradas

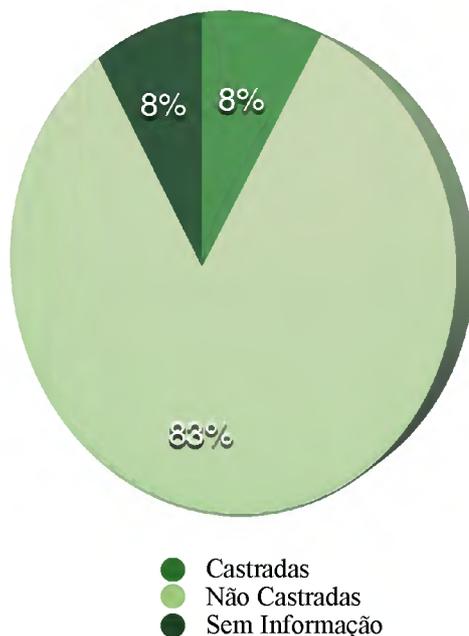
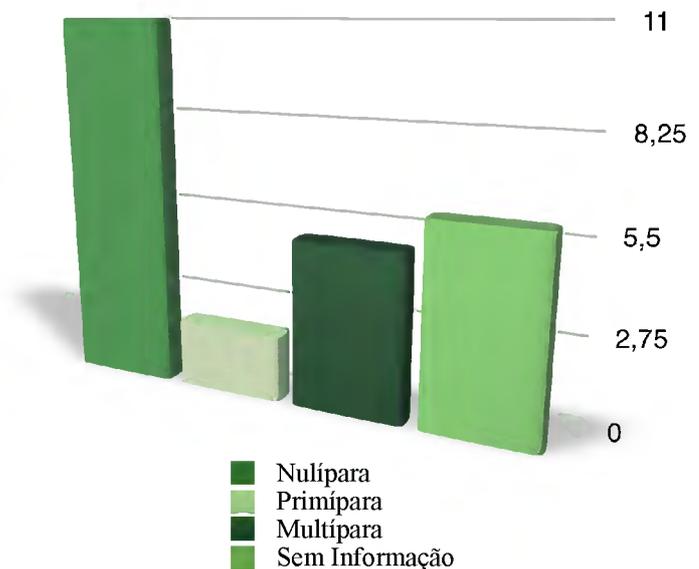


Gráfico 3: Distribuição de quantidades de gestações na população canina estudada.



Ainda referindo-se a histórico reprodutivo das pacientes, 58% (14/24) nunca fizeram uso de contraceptivos e 57% (13/24) não tiveram gestações psicológicas (**Gráficos 4 e 5**). Segundo Sorenmo (2009), o desenvolvimento de tumores mamários em cadelas é dependente da exposição dos ovários a hormônios, sugerindo que a exposição cumulativa ao estrógeno possa favorecer a formação tumoral. Além disso, pacientes expostos a administração

prolongada de progestágenos sintéticos tiveram um aumento na incidência de tumores benignos, assim como, um aumento na incidência tardia de tumores malignos (Daleck et al., 2008). Sendo assim, é possível sugerir que estes achados não estejam contribuindo para o desenvolvimento neoplásico em metade da população estudada.

Gráfico 4: Distribuição de cadelas com uso de terapia contraceptiva

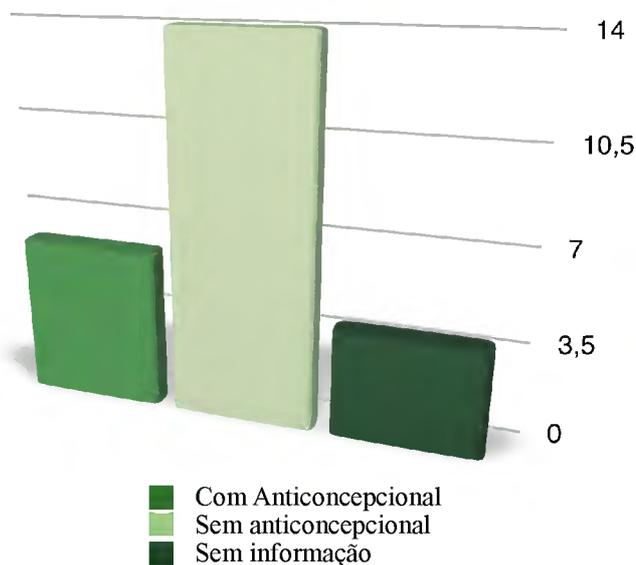
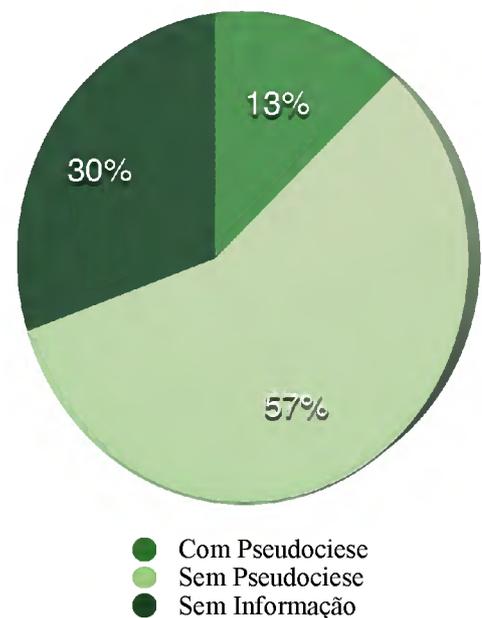


Gráfico 5: Distribuição de cadelas que apresentaram ou não gestações psicológicas.



Das 24 amostras, 12 foram de origem epitelial maligna, uma amostra com origem epitelial benigna, 10 amostras de origem mesenquimal maligna e uma amostra sem identificação, corroborando com os achados de Daleck et al. (2008) e Sorenmo et al. (2009) que referem que cerca de 60% das neoplasias mamárias em cadelas são de origem maligna, e que a maioria dos processos neoplásicos são de origem epitelial.

Na avaliação de prognóstico e sobrevida, observou-se que 83% das cadelas (20/24) não apresentavam metástases em órgãos abdominais e torácicos no ato do diagnóstico em oposição à 8% (2/24) que foram diagnosticadas com metástase pulmonar (**Gráfico 6**). Dos 24 caninos utilizados na pesquisa 38% (9/24) vieram a óbito, 21% (5/24) se encontravam vivos e 42% (10/24) não possuíam informações (**Gráfico 7**). Dos nove pacientes que vieram a óbito,

obteve-se informações de expectativa de vida de oito animais, destes cinco obtiveram sobrevida menor que seis meses e três sobrevida maior que seis meses (**Gráfico 8**).

Estes dados diferem do relatado na literatura, que sugerem que no ato do diagnóstico 25% dos animais já apresentam metástases em linfonodos regionais ou pulmão, e ainda referem que na grande maioria dos casos há micrometastases que não são detectadas nos exames de imagem (Daleck et al., 2008). Entretanto não descarta-se a possibilidade de micrometástases, visto que não foi realizada avaliação dos linfonodos sentinelas (linfonodos axilares e inguinais) nesta população e devido a dificuldade em acessar dados de prontuários completos e uma carência em consultas de acompanhamento dos pacientes em questão, bem como ainda, perda ou mudança de contato telefônico dos proprietários, não é possível afirmar que os dados obtidos de sobrevida representem a realidade da população analisada.

Gráfico 6: Percentual de pacientes com e sem metástases clinicamente detectáveis.

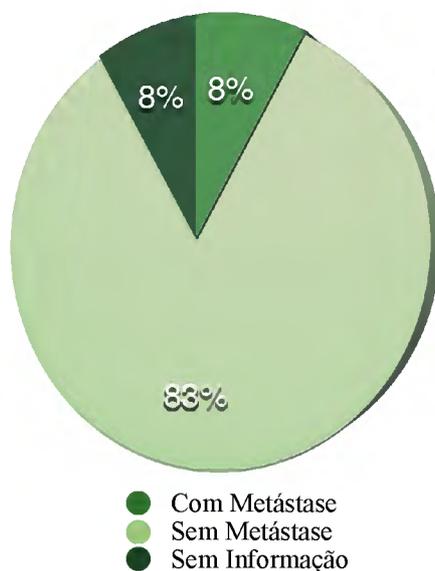
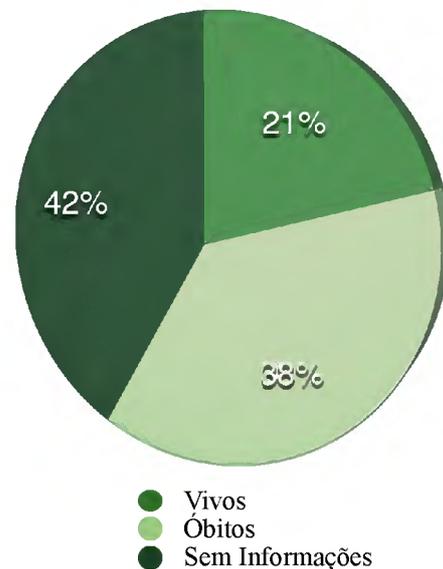
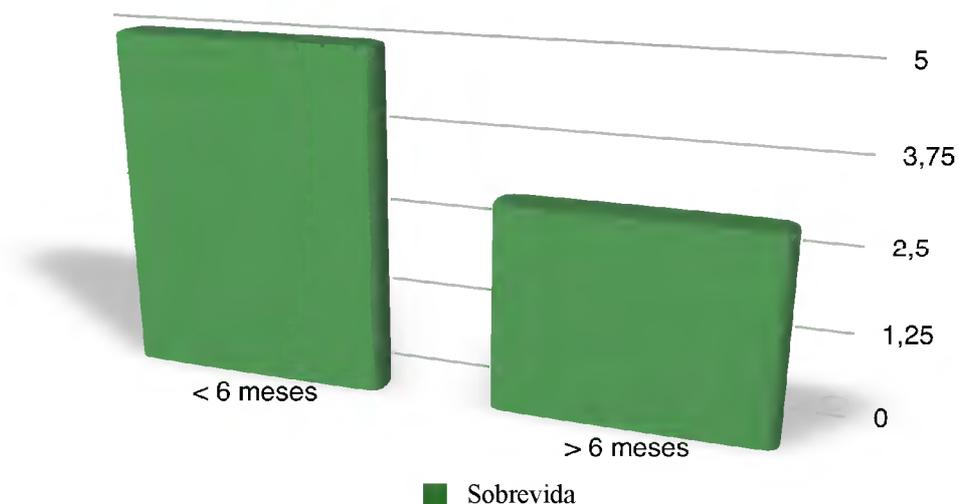


Gráfico 7: Distribuição em porcentagem de óbitos.





4.2. ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE *BRCA1*

Para a análise do perfil de metilação foi realizado uma subamostragem com 12 pacientes totalizando 17 amostras, estas divididas em cinco amostras pareadas (tecido não tumoral e tumoral) e sete amostras não pareadas e escolhidas de forma aleatória como representado nas tabelas abaixo (**Tabelas 5 e 6**). Destas 17 amostras, seis amostras foram tumores de origem mesenquimal, três amostras referentes a tumores de origem epitelial e sete amostras de tecido não tumoral.

Tabela 5: Identificação das amostras pareadas utilizadas para a análise de metilação do *BRCA1*.

CANINO	IDENTIFICAÇÃO LABIOMOL	TIPO TUMORAL
1	BNB 01 (NT)	TECIDO NÃO TUMORAL
	BNB02 (T)	CARCINOSARCOMA DIFERENCIADO
4	BNB 07 (NT)	TECIDO NÃO TUMORAL
	BNB 08 (T)	FIBROADENOCARCINOMA
5	BNB 10 (NT)	TECIDO NÃO TUMORAL
	BNB 11 (T)	CARCINOSARCOMA GRAU III
7	BNB 15 (NT)	TECIDO NÃO TUMORAL
	BNB 16 (T)	ADENOCARCINOMA PAPILÍFERO
10	BNB 23 (NT)	TECIDO NÃO TUMORAL
	BNB 24 (T)	OSTEOCONDROSSARCOMA

NT: não tumoral; T: tumoral

Tabela 6. Identificação das amostras não pareadas utilizadas para a análise de metilação do BRCA1.

CANINO	IDENTIFICAÇÃO LABIOMOL	TIPO TUMORAL
2	BNB 03 (NT)	TECIDO NÃO TUMORAL
6	BNB 13 (T)	ADENOCARCINOMA PAPILÍFERO GRAU III
9	BNB 21 (NT)	TECIDO NÃO TUMORAL
17	BNB 09 (T)	CARCINOSARCOMA
18	BNB 19 (T)	CARCINOSARCOMA GRAU III
20	BNB25 (T)	CARCINOSARCOMA GRAU III

NT: não tumoral; T: tumoral

No presente estudo, nenhuma das amostras analisadas apresentou hipermetilação na região promotora analisada do *BRCA1* como representado na **Figura 5**.

Segundo Tapia (2008), a hipermetilação da região promotora do *BRCA1*, é reportada de 11 a 30% e de 42 a 51% em tumores mamários esporádicos e em câncer de mama hereditário, respectivamente, em mulheres sem mutação no *BRCA1*. Portanto, sugere-se que esta alteração epigenética, enquanto mecanismo de silenciamento, não está envolvida no desenvolvimento de neoplasias mamárias caninas.

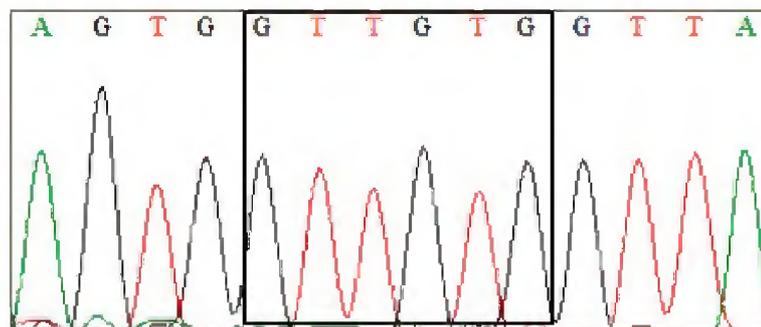


Figura 5: Eletroferograma representação das regiões ricas em ilhas CpGs.

4.3. ANÁLISE DO PERFIL DE MUTAÇÃO DO INTRON 8 - ÉXON 9 DO GENE *BRCA1*

Das 41 amostras analisadas, somente a amostra BNB 09 referente ao canino 17, apresentou uma mutação sinônima (G>A) sem mudança de aminoácido (S239S) ainda não

Tabela 7. Variação genética no Íntron 8 - Éxon 9 do gene *BRCA1* em amostra mamária tumoral e comparação histopatológica.

CANINO	IDADE	RAÇA	TIPO TUMORAL	BRCA1	
				Intron 8 - Éxon 9 G/A	Chr. 9
17	4	Poodle toy	CARCINOSARCOMA	A	23303008

relatada na literatura pesquisada, descrito na **Tabela 7** e visualizado na **Figura 6**.

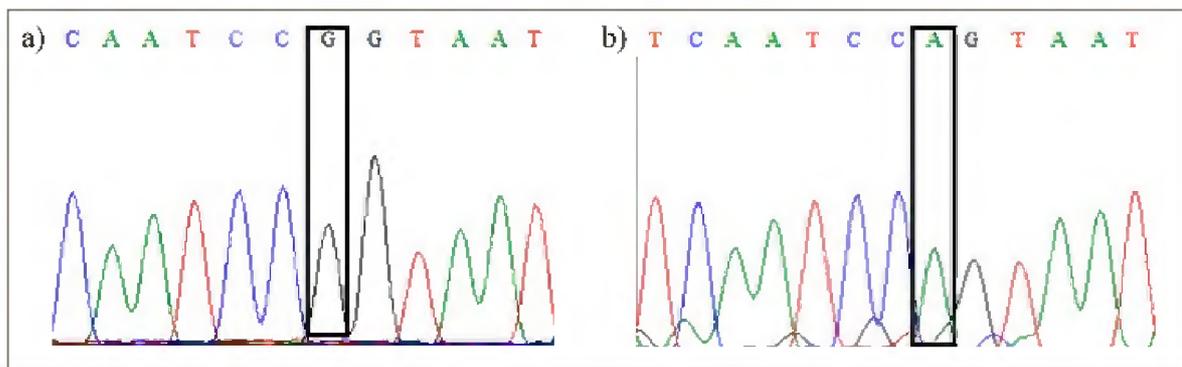


Figura 6: Eletroferograma da mutação (G>A) no éxon 9 a) amostra sem alteração homocigota para o alelo selvagem; b) amostra BNB 09 homocigota para o alelo mutado.

4.4. ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS DA REGIÃO 5'UTR DO GENE *BRCA1*

4.4.1. MUTAÇÃO NA REGIÃO 5'UTR (T/C)

Este padrão de mutação foi observado em dois caninos distintos (**Tabelas 3 e 4**, canino 10 e 24, respectivamente), na posição 23279082 do cromossomo 9, caracterizada como uma mutação do tipo heterocigota T>C (**Figura 7, Tabelas 8 e 9**).

Esta alteração foi observada em caninos acima dos 7 anos de idade. O canino 10 não possuía raça definida e a alteração foi observada tanto no seu tecido não tumoral quanto tumoral cuja histogênese era de origem mesenquimal. Já o segundo portador da mutação foi o

canino 24 da raça Schnauzer, com histogênese de origem epitelial e portador de uma entidade clínica conhecida como Carcinoma Inflamatório Mamário cuja evolução clínica é rápida e prognóstico desfavorável.

Devido estas alterações ainda não terem sido relatadas na literatura e ter afetado somente 10% da população estudada, não é possível afirmar se esta mutação aumenta o risco de desenvolvimento neoplásico em cadelas. Entretanto, esta foi observada em pacientes portadores de dois tipos histológicos agressivos com prognósticos desfavoráveis, cursando com sobrevida inferior à 6 meses.

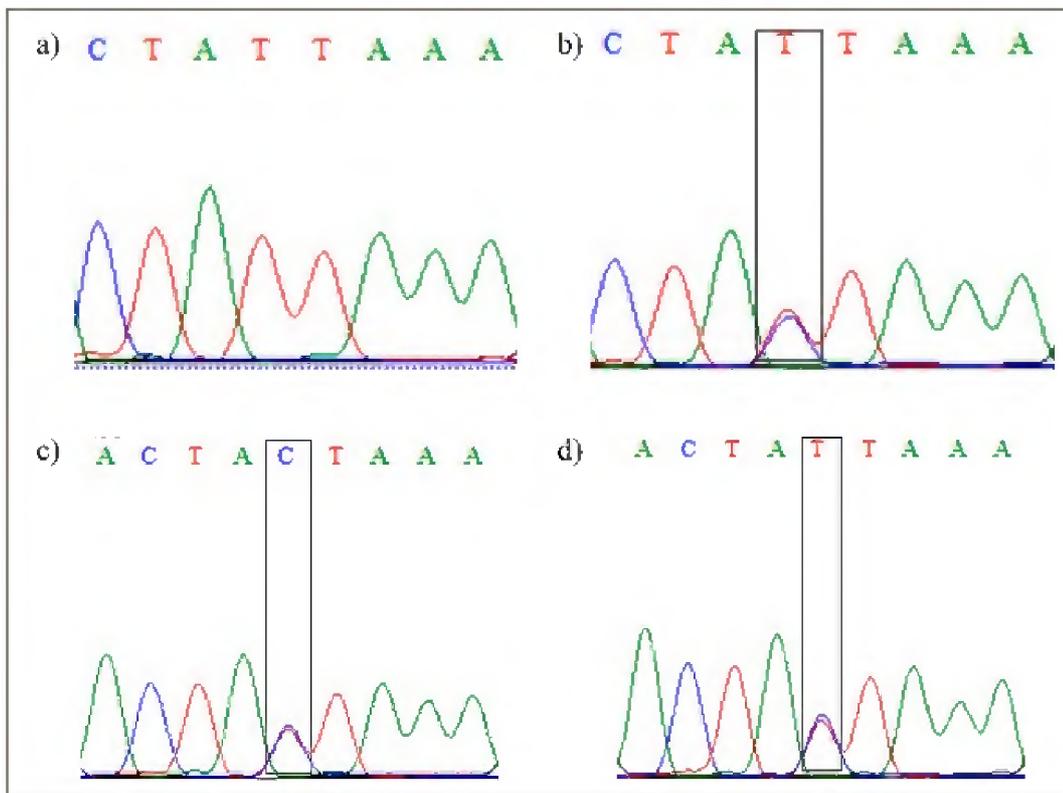


Figura 7: Eletroferograma da mutação (T>C) na região 5'UTR a) amostra sem alteração; b) amostra BNB 169 com padrão heterozigoto T/C; c) amostra BNB 23 tecido não tumoral com padrão heterozigoto; d) amostra BNB 24 tecido tumoral heterozigoto T/C.

4.4.2. POLIMORFISMOS (SNPs) NA REGIÃO 5'UTR

Foi observada a presença de um polimorfismo (C>G), já relatado na literatura (Rivera et al., 2009), na posição 23278708 do cromossomo 9 (Tabelas 8 e 9). Nesta análise foram observados 12 animais heterozigotos, seis animais homozigotos G (alelo mutado) e seis animais com o alelo selvagem (C) (**Figura 8, Tabelas 8 e 9**).

Este polimorfismo foi correlacionado com as informações referentes ao histórico dos pacientes e tipo tumoral (Anexo 3) e avaliado se a presença do alelo mutado G contribuiu com o aumento do risco de desenvolvimento tumoral nesta população.

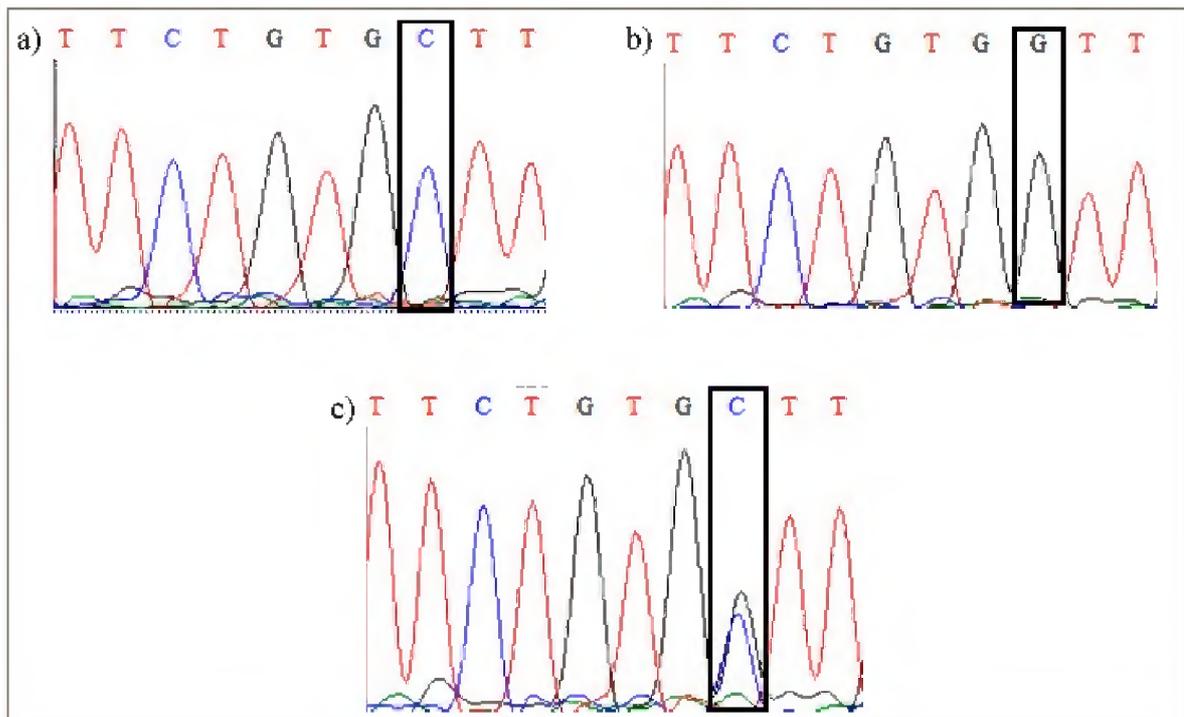


Figura 8: Eletroferograma do polimorfismo (C>G) na região 5'UTR a) amostra homozigota C/C; b) amostra homozigota G/G; c) amostra heterozigota C/G

Tabela 8. Polimorfismos (SNPs) e mutação observados na região 5'UTR do gene BRCA1 nas amostras tumorais analisadas.

CANINO	IDADE	RAÇA	TIPO TUMORAL	BRCA1	
				5'UTR C/G 23278708	5'UTR T/C 23279082
1	15	SRD	CARCINOSARCOMA DIFERENCIADO	C/G	T
2	10	SRD	ADENOCACINOMA POUCO DIFERENCIADO	C/G	T
3	7	SRD	CARCINOSARCOMA	C/G	T
4	4	Poodle Toy	FIBROADENOCARCINOMA	C/G	T
5	12	SRD	CARCINOSARCOMA GRAU III	C	T
6	12	SRD	ADENOCARCINOMA PAPILÍFERO GRAU III	C/G	T
7	10	Pinscher	ADENOCARCINOMA PAPILÍFERO	C	T
8	10	SRD	TUMOR MISTO CARCINOMATOSO	G	T
9	15	SRD	ADENOCARCINOMA PAPILÍFERO	C/G	T
10	15	SRD	OSTEOCONDROSSARCOMA	G	T/C
11	15	SRD	CARCINOSARCOMA GRAU II	C/G	T
12	8	SRD	ADENOCARCINOMA GRAU I	C	T
13	SI	Poodle Toy	ADENOMA TUBULAR	C/G	T
14	8	Yorkshire	ADENOCARCINOMA TUBOLO PAPILÍFERO GRAU III	C	T
15	SI	Poodle Toy	ADENOCARCINOMA	C	T
16	5	Rottweiler	ADENOCARCINOMA TUBOLO PAPILÍFERO GRAU II/ III	C/G	T
17	4	Poodle toy	CARCINOSARCOMA	G	T
18	9	Dachshund	CARCINOSARCOMA GRAU III	G	T
19	4	SRD	FIBROSARCOMA	G	T
20	5	Poodle toy	CARCINOSARCOMA GRAU III	G	T
21	-	SRD	ADENOCARCINOMA	C/G	T
22	13	Cocker	CARCINOSARCOMA	C	T
23	5	SRD	SI	C/G	T
24	8	Schnauzer	CARCINOMA INDIFERENCIADO (Carcinoma inflamatório mamário)	C/G	T/C

SRD: sem raça definida

SI: sem informação

Tabela 9. Polimorfismos (SNPs) e mutação observados na região 5'UTR do gene BRCA1 nas amostras não tumorais analisadas.

CANINO	IDADE	RAÇA	TIPO TUMORAL	BRCA1	
				5'UTR C/G 23278708	5'UTR T/C 23279082
1	15	SRD	TECIDO NÃO TUMORAL	C/G	T
2	10	SRD	TECIDO NÃO TUMORAL	C/G	T
3	7	SRD	TECIDO NÃO TUMORAL	C/G	T
4	4	Poodle Toy	TECIDO NÃO TUMORAL	C/G	T
5	12	SRD	TECIDO NÃO TUMORAL	C	T
6	12	SRD	TECIDO NÃO TUMORAL	C/G	T
7	10	Pinscher	TECIDO NÃO TUMORAL	C	T
8	10	SRD	TECIDO NÃO TUMORAL	G	T
9	15	SRD	TECIDO NÃO TUMORAL	C/G	T
10	15	SRD	TECIDO NÃO TUMORAL	G	T/C
11	15	SRD	TECIDO NÃO TUMORAL	C/G	T
12	8	SRD	TECIDO NÃO TUMORAL	C	T
13	SI	Poodle Toy	TECIDO NÃO TUMORAL	C/G	T
14	8	Yorkshire	TECIDO NÃO TUMORAL	C	T
15	SI	Poodle Toy	TECIDO NÃO TUMORAL	C	T
16	5	Rottweiler	TECIDO NÃO TUMORAL	C/G	T

SRD: sem raça definida

SI: sem informação

Em relação as frequências alélicas, observamos que os alelos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com frequências igual a 0,5 na população analisada.

Observou-se, ainda, que a presença do alelo G aumentou o risco de desenvolvimento de tumor mamário em 1,6 vezes (OR: 1,6667) porém sem significância estatística ($p = 0,7278$), e que a presença desta mesma alteração, favoreceu o desenvolvimento de tumores de origem mesenquimal em 1,7 vezes (OR: 1,7143), apesar de não ter sido observada significância estatística ($p = 1,0000$).

Apesar de não ser estatisticamente significante, quando realizada a comparação entre a idade ao diagnóstico e a presença do alelo mutado, foi possível concluir que animais jovens

com a presença de G possuíam mais chances de desenvolver um processo tumoral (OR: 6,500; $p = 0,2243$).

Para a análise de status reprodutivo da população foi realizado o teste Exato de Fisher, comparando o grupo de pacientes castradas com o grupo de não castradas, correlacionando com a presença do alelo mutado, onde pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,2576$).

Na avaliação da correlação entre a presença de gestações psicológicas e a presença do alelo G, verificou-se que pacientes que não haviam apresentado pseudocieses, tiveram 2 vezes mais chances de desenvolver um tumor (OR: 2,0000 e $p = 0,9113$), e 3 vezes mais chances desse tumor possuir histogênese mesenquimal (OR: 3,3333 e $p = 0,8529$), apesar da ausência de significância estatística.

Na correlação entre múltiplas gestações e a presença do polimorfismo, observou-se que, as pacientes que nunca gestacionaram, mas eram portadoras do alelo G tinham uma chance 9 vezes maior de desenvolver tumores (OR: 9,6000 e $p = 0,2956$).

Verificou-se ainda que independentemente de não terem feito uso de contraceptivos, pacientes com o polimorfismo G, tiveram um aumento de 1,4 vezes (OR: 1,4667 e $p = 0,8563$) em desenvolver tumores e que pacientes usuárias de terapias hormonais tiveram maiores chances de desenvolver um tumor de origem mesenquimal (OR: 1,5000 e $p = 0,8754$).

Estes resultados são similares aos descritos por Rivera (2009) para a população de English Springer Spaniel (ESS) na Suíça, onde foi observado que a presença do alelo G aumentava o risco de desenvolvimento tumoral em mamas em 1,5 vezes (OR: 1,53). Estes autores reportaram, ainda, que este polimorfismo está localizado em uma região não codificante e que, portanto, sua função era desconhecida. Segundo o autor, tumores que apresentam mutação no *BRCA1* tendem a ser tumores de alto grau e não positivos para receptores de estrógeno e progesterona e, geralmente, estão associados a um pior prognóstico.

Apesar de ainda não se saber o significado funcional deste polimorfismo em cães, estudos realizados em tumores de mama esporádicos em humanos sugerem que alterações na região 5' UTR de *BRCA1* levam a uma diminuição na expressão de mRNA, causada por uma diminuição na eficiência no processo de transcrição (Wang et al., 2007; Signori et al., 2001).

5. CONCLUSÕES

Considerando-se o contexto dos dados estudados e metodologia adotada, foi possível concluir que:

- Não há evidências do envolvimento da hipermetilação da região promotora de *BRCA1* na tumorigênese mamária canina;
- As mutações no Éxon 9 (G>A) e na região 5' UTR (T>C) ainda não descritas na literatura para *BRCA1* foram identificadas, entretanto devido sua baixa frequência, não foi possível caracterizar sua importância no processo tumoral;
- Existe uma tendência a um aumento do risco de desenvolver CMTs em pacientes jovens (4 anos) independentemente de seu status reprodutivo na presença do alelo G (5' UTR C>G). No entanto, provavelmente devido a baixa amostragem, os dados não obtiveram significância estatística.
- Mais estudos precisam ser realizados com um maior número amostral, bem como a investigação de outras alterações genéticas e epigenéticas para melhor caracterizar as alterações que favorecem o desenvolvimento de CMTs.

6. REFERÊNCIAS

- ALI, M.A. & SJÖBLOM, T.: **Molecular pathways in tumor progression: from discovery to functional understanding.** *Mol Biosyst*, 5: 902-908.2009.
- ARNESEN, K.; GAMLEM, H.; GLATTRE, E.; GRONDALEM, J.; MOE, L.; NORDSTOGA, K.: **The Norwegian canine cancer register 1990–1998. Report from the project “Cancer in the dog”.** *European Journal of Companion Animal Practice*; 11: 159–169, 2001.
- BAKER, R.; LUMSDEN, J.H.: **The mammary gland. In Color Atlas of Cytology of the Dog and Cat.** Edited by Baker R, Lumsden JH. St Louis: Mosby; 2000:253–262
- BERGER, A.H.; KNUDSON, A.G.; PANDOLFI, P.P.: **A continuum model for tumour suppression.** *Nature*, 7359: 163-169, 2011.
- BLANCAFORT, P.; JIN, J.; FRYE, S: **Writing and rewriting the epigenetic code of cancer cells: From engineered proteins to small molecules.** *Mol. Pharmacol* 83:563-576, 2013.
- BORGE, K. S.; BORRESEN-DALE, A. L.; LINGAAS, F.: **Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour.** *Veterinary and Comparative Oncology*; 9, 4, 241–250, 2010.
- BOSTOCK, D.E. **Canine and feline mammary neoplasms.** *British Veterinary Journal*, v. 142, p. 506-515, 1986.
- BRODEY, R.S.; GOLDSCHMIDT, M.H.; ROSZEL, J.R; **Canine mammary gland neoplasms. Journal. American.** *Animal Hospital Association*, v. 19, p. 61-89, 1983.
- 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, GEOVANNI D.; LAVALLE, GLEIDICE E.; FERREIRA, ENIO; ESTRELA-LIMA, ALESSANDRA; NARDI, ANDRIGO B. DE; GHEVER, CRISTINA; SOBRAL,RENATA A.; AMORIM, RENNE L.; OLIVEIRA,LUCIANA O.; R. SUEIRO, FELIPE A.; BESERRA, HUGO E. O.; BERTAGNOLLI, ANGÉLICA C.; GAMBA, CONRADO O.; DAMASCENO, KARINE A.; CAMPOS, CECILIA B. ; ARAUJO, MARINA R.; CAMPOS, LILIANE C.; MONTEIRO, LIDIANNE N.; NUNES, FERNANDA C.; HORTA, RODRIGO S.; REIS, DIEGO C.; LUVIZOTTO, MARIA CECILIA R.;

MAGALHÃES, GEORGIA M.; RAPOSO, JOSIANE B.; FERREIRA, ANA M. R.; TANAKA, NEIDE M.; GRANDI, FABRIZIO; UBUKATA, RODRIGO; BATSCHINSKI, KAREN; TERRA, ERIKA M.; SALVADOR, ROSANA C. L.; J ARK, PAULO C.; DELECRODI, JULIANA E. R.; NASCIMENTO, NARA A.; SILVA, DANIELLE N.; SILVA, LAÍS P.; FERREIRA, KELLY CRISTINE R. S.; FREHSE, MICHELE S.; SANTIS, GIOVANA W. DI; SILVA, ELISÂNGELA O.; GUIM, TAINÃ N.; KERR, BEATRIZ; CINTRA, PRISCILA P.; SILVA, FRANCIELE B. F.; LEITE, JULIANA S.; MELLO, MARCELA F. V.; FERREIRA, MARIA DE LOURDES G.; FUKUMASU, HEIDGE; SALGADO, BRENO S.; TORRES, RAFAEL. **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

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D.: **Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão**. Revista Clínica Veterinária, n. 61, p.56-63, 2006.

CROCE, C.M.: **Oncogenes and cancer**. N Engl J Med, 5: 502-511, 2008.

DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca 1 edição, 2008.

EASTON, D.F.; POOLEY, K.A.; DUNNING, A.M, et al. **Genome wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci**. Nature;447:1087–U7, 2007.

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.

INCA: **Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil**. Revista Brasileira de Cancerologia 60(1): 63, 2014

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

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

GALANTY, Y.; BELOTSEKOVSKAYA, J.; COATES, S.; POLO, K.M.; MILLER, S.P.: **Mammalian SUMO E3-ligases *PIAS1* and *PIAS4* promote responses to DNA double-strand breaks**. Nature 462, 935–939, 2009.

- HANAHAH, D & WEINBERG, R.A.: **The hallmarks of cancer.** Cell, 100: 57-70. 2000.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R.A.: **Modelling the molecular circuitry of cancer.** Nat. Rev. Cancer;2:331, 341, 2002.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R.A.: **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell, 144: 646-674. 2011.
- HATZIAPOSTOULOU, M.; ILIOPOULOS, D.: **Epigenetic aberrations during oncogenesis.** Cell. Mol. Life Sci 68: 1681-1702, 2011.
- HERMAN, J.G.; GRAFF, J.R.; MYÖHÄNEN, S.; NELKIN, B.D.; BAYLIN, S.B.: **Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.** Proc Natl Acad Sci USA, 93: 9821-9826, 1996.
- JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; THUN, M.J.: **Cancer statistics, 2009.** CA Cancer J Clin 59:225–249, 2011.
- JOVANOVIĆ, J.; RONNEBERG, J.A.; TOST, J.; KRISTENSEN, V.: **The epigenetics of breast cancer.** Molecular Oncology, 4: 242-254, 2010.
- KARAMI, F. & MEHDIPOUR, P.: **A Comprehensive Focus on Global Spectrum of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Breast Cancer.** BioMed Research International, 2013.
- LANA SE., RUTTEMAN GR., WITHROW SJ. **Tumors of the mammary gland.** WITHROW SJ., VAIL DM. Withrow & MacEwen`s Small Animal Clinical Oncology. 4^o ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 619-636, 2007.
- LANGHE, C.P.; van DIJK, C.M.; TOLLENAAR, R.A.: **Regions of focal DNA hypermethylation and long range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina associated domains.** Nat Genet 44: 40-46, 2012.
- LEVITT, N.C.; HICKSON, I.D.: **Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity.** Trends Mol Med, 8: 179-186, 2002.
- LINDBLAD-TOH, K.; WADE, C.M.; MIKKELSEN, T.S.; KARLSSON, E.K.; JAFFE, D.B.; KAMAL, M.; CLAMP, M.; CHANG, J.L.; KULBOKAS, E.J.; ZODY, M.C.: **Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog.** Nature, 438:803-819, 2005.

LIU, J.; PROLLA, G.; ROSTAGNO, A.: **Initiation of translation from a downstream in-frame AUG codon on BRCA1 can generate the novel isoform protein DeltaBRCA1(17aa).** *Oncogene*, 19: 2767 – 2773, 2000.

LUO, J.; SOLIMINI, N.L.; ELLEDGE, S.J.: **Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction.** *Cell*, 136: 826-837, 2009.

MARKS, P.A.; RIFKIND, R.A.; RICHON, V.M.; BRESLOW, R.; MILLER, T.; KELLY, W.K.: **Histone deacetylases and cancer: causes and therapies.** *Nature Reviews*; 1:194-202, 2001.

McPHERSON, K.; STEEL, C.M.; DIXON, J.M.: **ABC of Breast Diseases Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics.** *BMJ* V. 321 (9), 2000.

MISDORP W., ELSE RW., HELLMÉN E., LIPSCOMB E. **Definitions and explanatory notes. Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat.** Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 18-27, 1999.

OLIVEIRA AM, ROSS JS, FLETCHER JÁ: **Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers.** *Am J Clin Pathol*, 12: 16-28, 2005.

OSBORNE, C.; WILSON, P & TRIPATHY, D.: **Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications.** *Oncologist*, 9: 361-377. 2004.

OWEN LN. **The TNM Classification of tumors in domestic animals.** 1 ed. Geneva: World Health Organization, 1980.

PETO, J.; COLLINS, N.; BARFOOT, R.; SEAL, S.; WARREN, W.; RAHMAN, N.; EASTON, D.F.; EVANS, C.; DEACON, J.; STRATTONS, M.R.: **Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer.** *Journal of the National Cancer Institute*, 91: 943–949, 1999.

RIVERA, P.; MELIN, M.; BIAGI, T.; FALL, T.; HAGGSTROM, J.; LINDBLAD-TOH, K.; von EULER, H.: **Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2.** *Cancer Research*, 69: 8770–8774. 2009.

SHAFIEE, et al.: **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.

SADIKOVIC, B.; AL-ROMAIIH, K.; SQUIRE, J.A.; ZIELENSKA, M.: **Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer.** *Curr Genomics*, 6: 394-408, 2008.

SANGEETA, C.; JAYANTA, K.P.: **Role of 5- and 3-untranslated regions of mRNAs in human diseases.** *Biol. Cell*, 101, 251–262, 2009.

SHIKHAR, S.; KELLYAND, T.K.; JONES, P.A.: **Epigenetics in cancer.** *Carcinogenesis* vol. 31 no.1 pp.27–36, 2010

SIGNORI, E.; BAGNI, C.; PAPA, S.; et al: **A somatic mutation in the 5'UTR of BRCA1 gene in sporadic breast cancer causes down modulation of translation efficiency.** *Oncogene*, 20: 4596 – 4600, 2001.

SUGIURA, T.; MATSUYAMA, S.; AKIYOSI, H.; TAKENAKA, S.; YAMATE, J.; KUWAMURA, M.; AOKI, M.; SHIMADA, T.; OHASHI, F.; KUBO, K.: **Expression patterns of the BRCA1 splicing variants in canine normal tissues and mammary gland tumors.** *J Vet Med Sci.* , 69(6):587-92, 2007.

SOBCZAK, K.; KRZYZOSIAK, W.J.: **Structural determinants of BRCA1 translational regulation.** *J Biol Chem* , 277: 17349 – 17358, 2002.

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

SORENMO, K. et al. **Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence.** *Veterinary and Comparative Oncology*, 7, 3, 162–172. 2009.

SCULLY, R.; LIVINGSTON, D.M.: **In search of the tumoursuppressor functions of BRCA1 and BRCA2.** *Nature* 408, 429–432, 2000.

SZABO, C. I.; WAGNER, L.A.; FRANCISCO, L.V.; ROACH, J.C.; ARGONZA, R.; KING, M.C.; OSTRANDER, E. A.: **Human, canine and murine BRCA1 genes: sequence comparison among species.** *Human Molecular Genetics*, Vol. 5, No. 9 1289–1298, 1996.

TABY, R & ISSA, J-PJ. **Cancer Epigenetics.** *CA Cancer J Clin*, 60: 376-392. 2010.

- TAPIA, T.; SMALLEY, S.V.; KOHEN, P.; MUNOZ, A.; SOLIS, L.M.; CORVALAN, A.; FAUNDESZ, P.; DEVOTO, L.; CAMUS, M.; ALVAREZ, M.; CARVALHO, P.: **Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors.** Epigenetics 3, 157–163 (2008)
- VAN DER GROEP, P.; VAN DER WALL, E.; VAN DIEST, P.J.: **Pathology of hereditary breast cancer.** Cell Oncol., 34:71–88, 2011.
- VAN HEEMST, D.; DEN REIJER, P.M. & WESTENDORP, R.G.: **Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers.** Eur J Cancer, 15: 2144-2152. 2007.
- VOGELSTEIN B & KINZLER KW. **Cancer genes and the pathways they control.** Nat Med, 10: 789-799. 2004.
- WANG, J.; LU, C.; MIN, D.: **Mutation in the 5' UTR of BRCA1 in Chinese breast cancer patients.** The Journal of International Medical Research, 35: 564 – 573, 2007.

ANEXO I

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: (13)210-5165 ceua@ufra.edu.br www.comissao.ufra.edu.br/ceua

ANEXO II

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^ª. 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: