



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

MAYRA PACHECO DE SOUZA

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS NO
GENE p15^{INK4b} EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

BELÉM

2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

MAYRA PACHECO DE SOUZA

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS NO
GENE p15^{INK4b} 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: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bárbara do Nascimento Borges

BELÉM

2015



,MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

MAYRA PACHECO DE SOUZA

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS NO
GENE p15^{INK4b} EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

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

BANCA EXAMINADORA

Bárbara do Nascimento Borges - Doutora – Orientadora
Universidade Federal Rural da Amazônia

Danielle Queiroz Calcagno – Doutora – 1º examinador
Universidade Federal do Pará

Maria Lúcia Harada - Doutora - 2º examinador
Universidade Federal do Pará

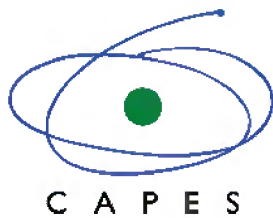
Edivaldo Herculano Correia de Oliveira - Doutor - 3º examinador
Universidade Federal do Pará

Rommel Mario Rodriguez Burbano - Doutor - Suplente
Universidade Federal do Pará

FONTES FINANCIADORAS



Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA



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



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

Aos meus pais Wanderlei e M^a Izaura e meu irmão Udson, pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis.

Um coração com FÉ é melhor que uma mente cheia de razão.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois foi através dele que tirei forças para seguir adiante. Sem Ele nunca chegaria aqui.

À professora Prof. Dra. Bárbara Borges por me orientar, pelo conhecimento e experiência que adquiri, sem seu auxílio eu não teria chegado tão longe, e que gentilmente cedeu o laboratório e ajudou nas interpretações dos resultados e na construção do trabalho.

À direção do HOVET por disponibilizar as amostras dos animais.

À UFRA, CAPES, FAPESPA e CNPq pelo apoio financeiro fundamental para o desenvolvimento nesse trabalho;

Ao prof. Dr. Washington e seus orientados que ajudaram na histopatologia.

Aos meus pais, meu irmão e cunhada que estão sempre ao meu lado cuidando de mim, me apoiando e se preocupando com o meu bem estar.

Aos meus grandes amigos Antônio, Elton, Ray, Jessica e Uiara que de algum jeito colaboraram.

Aos amigos Tati e Leo que ajudaram com as tabelas e também deram força durante esse tempo.

Aos amigos do Labmol a Iane, Natalia, Keitty, Erica, Mariceli, Thamirys, Raissa, Danilo e Wallax. A Verena e Adriana me ajudaram em um momento complicado.

Às outras pessoas que me ajudaram que não foram citadas, porém não são menos importantes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Características básicas adquiridas pela célula tumoral (adaptada de Hanahan & Weinberg, 2011) 14
- Figura 2.** Modificação do nucleotídeo citosina através da metilação do DNA. Adaptado de Cheng (2008). 16
- Figura 3.** Locus do genes p16, p15 e p14 no cromossomo canino 11 baseado do locus do gene em humanos cromossomo 9. O identificados são indicados por quadrados brancos e não identificados exons de p16, p15 e p14 e pretos, respectivamente. Localizações dos primers em exon 2 de p16 utilizados em estudos anteriores estão indicados por punhais (†) Adaptado Fujiwara-Igarashi, 2014. 20
- Figura 4.** Gráfico da distribuição racial dos animais. 27
- Figura 5.** Gráfico da distribuição histopatológica das amostras. 28
- Figura 6 .** Distribuição da paridade dos animais. 29
- Figura 7:** Exemplos de sítios metilados. A) Sítios parcialmente metilados; B) Sítio metilado. 31
- Figura 8 –** Cromatograma da posição do genótipo no cromossomo 11 canino. 1) Homozigoto A; 2) Homozigoto C; 3) Heterozigoto C. 32

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1- Principais tipos de neoplasias mamárias em cadelas.	19
Tabela 2. Sequências de iniciadores usadas para realização da análise de alterações genéticas com suas respectivas temperaturas de anelamento.	24
Tabela 3. Sequências de iniciadores usadas para realização da análise do padrão de metilação com a temperatura de anelamento.	25
Tabela 4. Amostras não tumorais utilizadas nas análises de metilação.	29
Tabela 5. Amostras tumorais utilizadas nas análises de metilação.	30
Quadro 1 – Amostras amplificadas do éxon 1.1 – pareadas.	32
Quadro 2 – Amostras amplificadas do éxon 1.1 – não pareadas.	33
Quadro 3 - Amostras amplificadas do éxon 1.2.	35
Quadro 4 – Amostras amplificadas do éxon 2.	36

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 CÂNCER	13
1.2 EPIGENÉTICA E CÂNCER	15
1.3 NEOPLASIA MAMÁRIA EM CANINOS	17
1.4 O GENE P15 ^{INK4B}	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GERAL	22
2.1.1 Objetivos Específicos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. COLETA DAS AMOSTRAS	23
3.2. EXTRAÇÃO DO DNA	23
3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ANÁLISE DE MUTAÇÕES/POLIMORFISMOS	24
3.4. TRATAMENTO DO DNA COM BISSUFITO DE SÓDIO E BISULFITE SEQUENCING PCR (BSP)	25
3.5. SEQUENCIAMENTO DO DNA	25
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 ANÁLISE DO ESTADO DE METILAÇÃO DO GENE p15 ^{INK4b}	29
4.2 ANÁLISE DE MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS NOS ÉXONS 1.1, 1.2 E 2 DO GENE p15 ^{INK4b}	31
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	43
ANEXO 1	43
ANEXO 2	44
ANEXO 3	45

RESUMO

O câncer é considerado o resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas de uma célula que adquire a capacidade de se proliferar de maneira acelerada. O tumor mamário é o mais frequente na espécie canina representando cerca de 52% de todos os tumores da referida espécie. Sabe-se que o câncer é decorrente de alterações nos genes que controlam o ciclo celular, tais como aqueles que codificam inibidores de cinases dependentes de ciclinas, com destaque para o gene p15^{INK4B}. Sabe-se que este gene sofre alterações genéticas e epigenéticas em diversos tumores humanos, inclusive o de mama. Apesar disso, pouco se sabe sobre suas alterações em tumores mamários caninos. Assim sendo, esta pesquisa teve como objetivo verificar o estado de metilação do gene p15^{INK4B} bem como suas alterações genéticas (mutações/polimorfismos) em tumores mamários em cadelas e correlacionar com dados histopatológicos e clínicos. Foram analisadas 40 amostras de 23 animais submetidos à mastectomia no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia. O DNA total de cada amostra foi extraído pelo método fenol-clorofórmio, e submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida pelo sequenciamento direto, para a análise de mutações dos éxons do gene p15^{INK4B}. Para a análise de metilação, o DNA foi convertido utilizando o bissulfite de sódio e a região promotora do gene de interesse analisada por Bissulfite Sequencing PCR. Para as análises estatísticas foram utilizados os testes Qui-Quadrado Exato de Fisher e Odds Ratio. A metilação do promotor p15^{INK4B} foi observada em 72,7% (8/11) de todas as amostras, sendo que 80% (4/5) das amostras tumorais e 66,7% (6/9) das amostras não tumorais estavam metiladas. Pela análise genética foi observado apenas um polimorfismo (transversão) C→A localizado na posição 4435664 (éxon 1.1) do cromossomo 11 canino. A presença deste polimorfismo, apesar dos resultados não serem estatisticamente significantes, sugere um aumento no risco de desenvolver tumores quando na presença de determinadas características histopatológicas e clínicas. Os demais éxons analisados (1.2 e 2) não apresentaram qualquer tipo de mutação e/ou polimorfismo. Desta forma, pode-se concluir que a metilação da região promotora p15^{INK4B}, bem como alterações genéticas nos éxons 1.2 e 2 parecem não estar relacionados ao desenvolvimento de tumores mamários caninos. Apesar dos resultados sugerirem a presença de um marcador da tumorigênese mamária em cães, mais estudos com um número maior de amostras, são necessários para uma melhor compreensão da influência das alterações genéticas e epigenéticas do gene p15^{INK4B} em tumores mamários de cães.

Palavras Chave: neoplasia mamária, metilação, polimorfismos, cães

ABSTRACT

Cancer is considered the result of the accumulation of genetic and epigenetic alterations of a cell which results in a dysregulated proliferation. Mammary tumors are the most common type of cancer in dogs representing about 52% of all tumors of the species. It is known that cancer is caused by alterations in genes that control the cell cycle, such as those encoding cyclin-dependent kinases inhibitors, as the p15^{INK4B} gene. It is known this gene undergoes genetic and epigenetic alterations in several human tumors, including breast cancer. Despite this, little is known about its changes in canine mammary tumors. Therefore, this study aimed to determine the methylation status of p15^{INK4B} gene and its genetic changes (mutations/polymorphisms) in mammary tumors in female dogs and to correlate the results with histopathological and clinical data. Forty samples from 23 animals undergoing mastectomy at the Veterinary Hospital of the Amazon Federal Rural University were analyzed. The DNA from each sample was obtained by the phenol-chloroform method and subjected to polymerase chain reaction (PCR), followed by direct sequencing for mutation analysis of all exons of the p15^{INK4B} gene. For the methylation analysis, DNA was converted using sodium bisulfite, and the promoter region of the gene analyzed by Bisulfite PCR Sequencing. For statistical analysis, Fisher's exact test, chi-square test and odds ratio were used. The promoter methylation of the p15^{INK4B} was observed in 72.7% (8/11) of all samples, and 80% (4/5) of tumor and 66.7% (6/4) of the non tumoral samples were methylated. For the genetic analysis, only one polymorphism (transversion) C→A located at position 4,435,664 (exon 1.1) of the chromosome 11 canine was observed. The presence of this polymorphism, although the results were not statistically significant, suggests an increased risk of developing tumors in the presence of certain histopathological and clinical characteristics. The remaining analyzed exons (1.2 and 2) did not show mutation and/or polymorphism. Thus, we can conclude that the methylation of p15^{INK4B} promoter region as well as genetic alterations in exons 2 and 1.2 do not seem to be related to the development of canine mammary tumors. Although the results suggest the presence of a marker of mammary tumorigenesis in dogs, further studies with a larger number of samples are needed for a better understanding of the influence of genetic and epigenetic alterations of the p15^{INK4B} gene in mammary tumors of dogs.

Keywords: mammary neoplasm, methylation, polymorphisms, dogs

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

O câncer é uma manifestação patológica proveniente de alterações nos genes responsáveis pela regulação do crescimento e diferenciação celular, resultando na perda do controle da proliferação celular e ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástase para tecidos distantes (Ali & Sjöblom, 2009; Iacobuzio-Donahue, 2009).

O câncer de mama constitui a neoplasia maligna mais frequente no gênero feminino. Anualmente, verifica-se mais de um milhão de mulheres são diagnosticadas em todo o mundo, e acima de 410.000 morrerão dessa doença (INCA, 2014).

No Brasil, embora exista uma grande heterogeneidade na distribuição de casos novos e óbitos de câncer de mama, as maiores taxas de incidência e mortalidade ocorrem nas Regiões Sul e Sudeste, enquanto que as menores são observadas nas Regiões Norte e Nordeste (Soares, 2012; INCA, 2014). Para 2014/2015 são estimados, aproximadamente, 75 mil novos casos de câncer mama, e por isso, essa doença é considerada um sério problema de saúde pública e seu controle e prevenção devem ser priorizados no Brasil (INCA, 2014).

Sabe-se que além da exposição a agentes carcinogênicos, o surgimento de tumores pode ocorrer como consequência do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que interferem no controle normal do crescimento e diferenciação celular (Saba, 2007; Conradie, 2010).

Segundo Hanahan & Weinberg (2011), os tumores possuem diversas características em comum, tais como: potencial proliferativo, auto-suficiência dos sinais de crescimento, perda de inibição do crescimento, evasão da apoptose, invasão de tecidos e metástase, angiogênese e potencial replicativo ilimitado, evasão da supervisão imunológica e instabilidade genômica, stresse celular, entre elas estresse metabólico, mitótico, oxidativo e de danos ao DNA (Figura 1).



Figura 1. Características básicas adquiridas pela célula tumoral (adaptada de Hanahan & Weinberg, 2011)

A regulação do crescimento celular é ocasionada por substâncias que incluem fatores de crescimento que transmitem sinais de uma célula para outra. A célula interpreta vários sinais que recebe do ambiente e decide se continua crescendo e se multiplicando, ou para de crescer e se diferencia, após o aparecimento dos sinais.

As mutações podem ocorrer em qualquer uma das etapas de crescimento e diferenciação celular. O acúmulo destas mutações é que pode resultar na desregulação progressiva do crescimento e originar uma célula tumoral.

Atualmente, sabe-se que diversos genes são alterados durante o processo de tumorigênese. Estes podem ser divididos em duas grandes classes: os genes supressores de tumor e os oncogenes (Kinzler, 2011).

Os genes supressores tumorais são inibidores celulares que podem ser subdivididos em dois grandes grupos: os gatekeepers e os caretakers (Dantas, 2009).

Os gatekeepers induzem a morte ou bloqueiam o ciclo celular, suprimindo a proliferação ou promovendo a diferenciação ou induzindo a apoptose. Ao terem suas funções restauradas suprimem a formação de neoplasias, agindo diretamente para impedir o crescimento do tumor (Cowin et al., 2010).

Os caretakers atuam reparando danos no DNA, mantendo a integridade genômica e evitando a instabilidade genética, mas facilitam a ocorrência de mutações nos genes gatekeepers que darão início a carcinogênese (Kontorovich, 2009; Arruda, 2010)

As mutações aparecem quando os danos ao DNA excedem a capacidade dos mecanismos de reparo celular do DNA. Assim, a partir de alterações nos proto-oncogenes que são genes normalmente envolvidos na divisão e na diferenciação celular normal, são originados os oncogenes, resultando em divisões celulares contínuas e desreguladas (Arruda, 2010).

Os oncogenes possuem efeito dominante na célula, ou seja, um único alelo mutado é suficiente para alterar o fenótipo de uma célula normal para tumoral (Kontorovich, 2009; Cowin et al., 2010). Estes genes são responsáveis por aumentar a proliferação celular ao mesmo tempo em que inibem a apoptose, eventos iniciais no desenvolvimento do câncer (Kontorovich, 2009; Negrini, 2010).

1.2. EPIGENÉTICA E CÂNCER

O termo epigenética foi utilizado pela primeira vez em 1940, pelo embriologista e geneticista britânico Conrad Hal Waddington, em seu estudo sobre as causas do desenvolvimento. Inicialmente Waddington definiu este termo como “interações causais entre genes e seus produtos, que levam a um fenótipo”, envolvendo a estrutura da cromatina e seu impacto na função dos genes (Waddington, 1942 apud Slack, 2002).

A epigenética refere-se a mudanças na expressão gênica herdadas, mitóticas ou meioticamente, que não envolvem mudanças na sequência de DNA (Jirtle; Skinner, 2007). Na década de 90, poucos sabiam o significado da palavra epigenética e a maioria dos cientistas acreditava que a essência de todas as doenças humanas estava relacionada a variações na sequência de DNA (Tost, 2009, Taby r & Issa, 2010).

Os mecanismos epigenéticos atuam durante o desenvolvimento e na manutenção de funções celulares específicas durante a vida (Sawan et al., 2008; Auclair & Weber, 2012). Dentre os mecanismos epigenéticos, destacam-se: metilação do DNA, alterações covalente e não covalentes na estrutura das histonas e RNAs não codificantes. Todos atuam de alguma forma na regulação e modificação da expressão gênica (Nowsheen et al., 2012).

O desequilíbrio dos mecanismos epigenéticos promove o desenvolvimento de fenótipo anormal e o aparecimento de eventos genéticos tais como quebras do DNA, mutação e instabilidade do cromossomo que contribuem para o desenvolvimento de doenças, como o câncer que atualmente é doença mais estudada com forte componentes epigenéticos envolvidos (Sawan et al., 2008; Hayatsu et al., 2008).

Uma das modificações epigenéticas melhor descrita em eucariontes é a metilação do DNA, que é uma modificação química covalente resultante da metilação do carbono 5 de citosinas adjacentes às guaninas, os chamados dinucleotídeos CpG (Bernstein et al., 2007). A metilação ocorre quando um grupo metil oriundo da S-adenosil metionina (SAM – doador universal de metil) é adicionado à posição 5' do anel pirimídico da citosina (C), gerando a 5-metil-citosina (m5C), processo este catalisado pelas enzimas DNA Metiltransferases (DNMTs) (Auclair & Weber, 2012)(Figura 2).

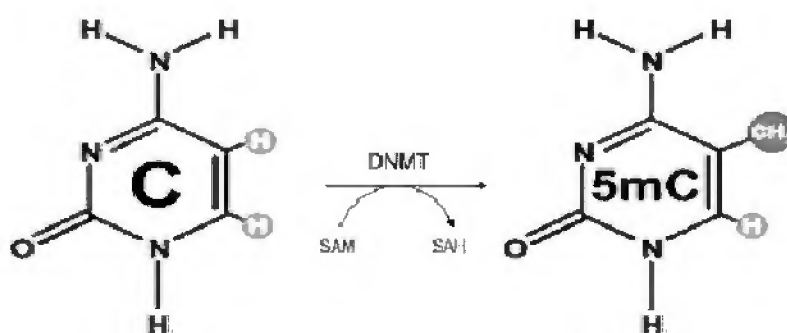


Figura 2. Modificação do nucleotídeo citosina através da metilação do DNA. Adaptado de Cheng (2008).

A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente no contexto de dinucleotídeos CpG. Estes, no genoma dos mamíferos, ocorrem em alta densidade nas chamadas ilhas CpG, que variam entre 0,5 kb e 4 kb em comprimento e são encontradas principalmente em regiões promotoras de genes. Cerca de 60% das regiões promotoras ativas estão associadas com sequências ricas em CpG, sendo que na sua maioria, as ilhas CpG não estão metiladas em tecidos normais, exceto quando necessário (Belshaw, 2008; Lister et al., 2009).

Em tecidos tumorais, genes supressores de tumor são muitas vezes inativados epigeneticamente por metilação, quando comparados com o tecido normal (Newshean et al., 2012). Apesar disso, a primeira alteração epigenética observada em tumores humanos foi a hipometilação do DNA (Feinberg & Volgestein, 1983).

A hipometilação tem sido reportada em elementos repetitivos localizados em sequências satélites ou regiões pericentroméricas, resultando em instabilidade genômica em diversos tipos de tumores (Tost ; Reik; Henikoff, 2009).

Vários trabalhos relatam a presença de hipometilação do DNA associada ao câncer, que incluem o mapeamento das regiões hipometiladas do genoma, a investigação do papel desta hipometilação na carcinogênese, a identificação e testes dos marcadores de câncer, e projeção e o monitoramento de terapias anticâncer (Chernov et al., 2009).

No câncer também ocorrem áreas de densa hipermetilação em ilhas CpG localizadas na região promotora de genes supressores de tumor, como o p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, e BRCA1 (Sawan et al., 2008).

Apesar de ocorrer hipermetilação em muitos genes no câncer, nem todas as regiões promotoras serão afetadas. Esta divergência está associada ao fato de algumas ilhas CpG serem metiladas somente em certos tipos de tumores (Torbenson, 2008).

O estado de metilação de ilhas CpG pode ser utilizado para caracterizar e classificar os tumores, bem como um ponto de partida para o tratamento antineoplásico, pois a metilação do DNA é uma modificação que não envolve mutação e é reversível (Jirtle; Skinner, 2007).

1.3 NEOPLASIA MAMÁRIA EM CANINOS

O câncer de mama é o processo neoplásico mais frequente em caninos (Gupta, 2012), representando cerca de 52% dos processos tumorais malignos (Andrade, 2010).

Essa enfermidade acomete com mais frequência animais do sexo feminino, entretanto, os machos podem ser afetados, porém em uma incidência muito baixa (Santos, 2013).

Segundo Gupta (2012), as cadelas têm um risco três vezes maior de desenvolver tumores mamários malignos em comparação com a espécie humana, sendo que estes tumores compartilham várias características epidemiológicas, clínicas e biológicas com a espécie humana (Cruz-Casallas, 2009; Shafiee, 2013).

As neoplasias mamárias são raras em cadelas jovens (Cassali, 2011) e sua incidência tende a aumentar com o avanço da idade, sendo observada com maior frequência entre os 6 e os 10 anos (Dobson, 2013).

A etiopatogenia é multifatorial e acredita-se que fatores endócrinos, nutricionais, etários, sexuais, raciais e genéticos podem contribuir com o desenvolvimento neoplásico (Lee, 2010).

Alguns estudos relatam uma predisposição racial para o desenvolvimento de tumores mamários. As raças mais citadas são: Poodles (Toy e miniatura), Spaniels (Inglês Springer, Cocker e a Bretanha), Puli, Setter Inglês, Pointer, Pastor Alemão, Maltês Terrier, Yorkshire Terrier, Dachshund, sugerindo certa predisposição genética (Cruz-Casallas, 2009; Dobson, 2012).

Sabe-se que as neoplasias mamárias são hormônio dependentes e que o uso de progesterona exógena em doses elevadas estimula a síntese de hormônio do crescimento na glândula mamária, provocando o aumento dos alvéolos e lóbulos, propiciando a formação de nódulos (Cassali, 2011; Feliciano, 2012). Segundo Santos (2013), a ovariectomia (OVH) quando realizada antes do primeiro cio, reduz o risco de desenvolvimento da neoplasia mamária para 0,05%. Este risco aumenta significativamente nas fêmeas esterilizadas após o primeiro ciclo estral (8,0%) e o segundo (26%) ciclo estral. No entanto, a realização da OVH após o surgimento de neoplasias mamárias permanece um assunto controverso, uma vez que, não parece ter um efeito significativo na progressão da doença neoplásica (Kadthur, 2011; Shafiee, 2013).

Outro fator importante na carcinogênese mamária é a obesidade, e segundo Kolling (2009), cadelas obesas têm um maior risco de desenvolvimento de tumores de mama que cadelas não obesas (Kolling, 2009; Shafiee, 2013; Rogers, 2014)

Os tumores mamários podem se apresentar como massas de consistência maciça ou flutuante, podendo ser um nódulo único ou múltiplos nódulos, apresentar ulceração cutânea e/ou sinais evidentes de inflamação (Feliciano, 2010; Santos, 2013).

Frequentemente observa-se que tumores de tipos histológicos diferentes podem acometer a glândula mamária simultaneamente, contudo o tipo tumoral de pior prognóstico determina a conduta clínica independentemente do seu tamanho tumoral (Cassali, 2013).

O estadiamento clínico do paciente é realizado de acordo com a sistema TNM da Organização Mundial de Saúde (WHO), avaliando o tamanho tumoral, presença ou

ausência de metástases em linfonodos e órgãos a distância (Owen, 1980), sendo os pulmões o principal sítio de metástases, correspondendo com uma incidência de 25 a 50% (Saba, 2007; Kadthur, 2011).

Segundo Cassali (2011), a classificação histológica mais difundida é a de Withrow & Macewen's (2007) (tabela 1).

Vários estudos envolvendo células tumorais caninas demonstram que as mesmas possuem uma ampla variação de alterações cromossômicas, mutações, duplicações, inversões e também alterações epigenéticas (Uva, 2009), as quais implicam na mudança no padrão de transcrição e expressão gênica (Ehrlich, 2009).

Tabela 1- Principais tipos de neoplasias mamárias em cadelas.

TUMORES MALIGNOS	TUMORES BENIGNOS
Carcinoma (in situ) não infiltrativo	Adenoma :
Carcinoma complexo	Adenoma simples
Carcinoma simples:	Adenoma complexo
Carcinoma tubulopapilar	Adenoma basalóide
Carcinoma sólido	Fibroadenoma:
Carcinoma anaplásico	Fibroadenoma de baixa celularidade
Tipos especiais de Carcinoma:	Fibroadenoma de alta celularidade
Carcinoma epinocelular	Tumor misto benigno
Carcinoma de escamosas	Papiloma ductal
Carcinoma mucinoso	
Carcinoma rico em lipídios	
Sarcoma:	
Fibrossarcoma	
Osteossarcoma	
e outros sarcomas	
Carcinosarcoma	
Carcinoma ou sarcoma em tumor benigno	

1.4. O GENE p15^{INK4b}

O gene p15^{INK4b} codifica uma proteína de 15 kDa e faz parte do locus INK4b-ARF-INK4a, e está localizado no cromossomo humano 9p21. Em caninos, este gene localiza-se no cromossomo 11. Esse locus codifica cinco inibidores de CDK: p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p14^{ARF}, p16^{INK4Aγ} e P12 (Sakellariou, 2008; Li, 2011). As proteínas INK4 principalmente as codificadas por p15^{INK4b}, p16^{INK4A} p14^{ARF} são produzidas quando há necessidade de parada em fases iniciais do ciclo celular, por isso seus genes são apontados como supressores de tumor (Aguirre-Hernández, 2009).

Relatos mostram que o gene p15^{INK4b} está distante 25 kb do gene p16^{INK4A}. Estruturalmente, é composto por dois exons, sendo o éxon 2 estruturalmente homólogo ao do p16^{INK4A} (Sakellariou, 2008).

Esses genes homólogos são considerados supressores tumorais devido à ligação direta com as proteínas CDK4 e CDK6, bloqueando assim a formação de complexos CDK4/6-ciclina D, com isso suprimindo a fosforilação dos membros da família retinoblastoma (Rb) e resultando na interrupção do ciclo celular (Li, 2011).

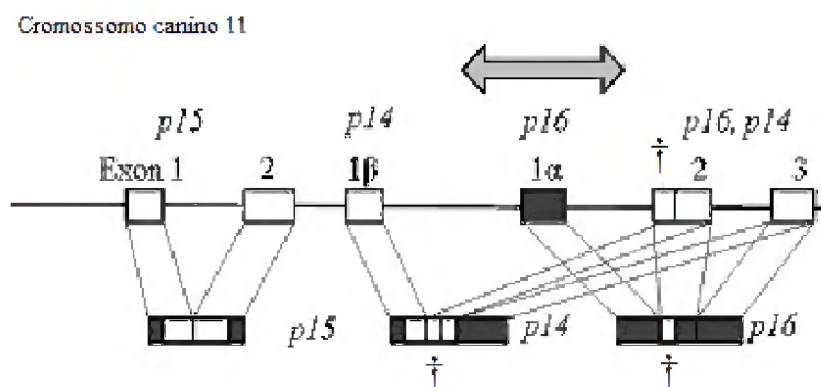


Figura 3. Locus do genes p16, p15 e p14 no cromossomo canino 11 baseada do locus do gene em humanos cromossomo 9. O identificados são indicados por quadrados brancos e não identificados exons de p16, p15 e p14 e pretos, respectivamente. Localizações dos primers em exon 2 de p16 utilizados em estudos anteriores estão indicados por punhais (†) Adaptado Fujiwara-Igarashi, 2014.

Estudos em camundongos, mostram que o p15^{INK4b} cumpre um papel de backup para p16^{INK4A}, que é transcrito em níveis muito baixos em condições fisiológicas normais. Assim que os níveis de transcrição de p16^{INK4A} aumentam, há um deslocamento seguido de degradação da proteína p15 (Krimpenfort, 2007; Yu, 2009).

A inativação de genes supressores de tumor é reconhecida como um evento central na iniciação e progressão da neoplasia (Azzato, 2008). As perdas de alelos no cromossoma 9p21 são frequentes em muitos tipos de tumor, sugerindo que pelo menos um gene de supressão tumoral relacionado com esse locus está envolvido no desenvolvimento de malignidades humanas (Sinha, 2008; Yu, 2009).

Um estudo feito na Índia, em mulheres com câncer de mama, mostrou que os genes supressores tumorais p16^{INK4A} e p15^{INK4b} apresentam-se silenciados por deleções homozigóticas (10%), por perda da heterozigotidade (43-58%) e mais raramente por mutações pontuais (Jung, 2013).

Em células de câncer de mama, a região onde localiza-se o gene p15^{INK4b} está sujeita a frequentes metilações nas ilhas CpG da região promotora do mesmo. Nessa mesma região podemos encontrar a hipermetilação do gene p16^{INK4A} que acontece em cerca 15-50 % que resulta no silenciamento transcricional e redução da expressão gênica (Yu, 2009).

No caso do gene p15^{INK4b}, mais pesquisas precisam ser realizadas para entender melhor o papel deste gene no desenvolvimento da tumorigenese mamária em cães, visto que alguns estudos nesses animais descrevem que mutações pontuais podem afetar sua função ou possibilitar seu silenciamento epigenético (Fujiwara-Igarashi, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Verificar a ocorrência de alterações genéticas e epigenéticas do gene p15^{INK4b} em tumores mamários caninos de Belém (PA).

2.1.1. Objetivos específicos

- Verificar o padrão de metilação da região promotora do gene p15^{INK4b}.
- Verificar a presença de mutações e polimorfismos nos exons do gene p15^{INK4b}.
- Correlacionar a presença de alterações moleculares encontradas com dados histopatológicos e dados etiológicos (idade, raça, uso de contraceptivo, pseudociese, castração, paridade).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA DAS AMOSTRAS COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 40 amostras de 23 animais submetidos à cirurgia no Hospital Veterinário Professor Mario Teixeira (HOVET) da Universidade Federal Rural da Amazônia, a partir de Agosto de 2011.

De cada animal, foram coletadas amostras de tecido neoplásico e não-neoplásico e ambos, foram armazenadas a -20°C em microtubos contendo solução de RNA Later® (Ambion Inc.) até a extração de ácidos nucleicos.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) (Protocolo 001/2013 CEUA – 23084.000265/2013-53 UFRA) (ANEXO 1). Os proprietários dos animais assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de doação das amostras (ANEXO 2).

3.2. EXTRAÇÃO DO DNA

Parte do tecido coletado foi utilizado para extração de DNA, a qual foi feita pelo protocolo padrão fenol-clorofórmio-isoamil descrito por Sambrook & Russell (2000).

- Transferiu-se de tecido mamário para um microtubo de 1,5 ml cerca de 20 mg.
- Adicionou-se 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.
- Adicionou-se a mistura, 700 µl de fenol-clorofórmio para a precipitação de proteínas homogeneizando por inversão durante 10 minutos, e os microtubos foram centrifugados à 14.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo.
- Foram adicionados 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 foram adicionados 70 µl de acetato de sódio (AcNa) 3M pH 4,8 e 700 µl de isopropanol para a precipitação do DNA.
- A amostra foi centrifugada à 14.000 rpm durante 10 minutos descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 300 µl de etanol 70% e o material centrifugado durante 5

minutos à 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente para que não houvesse perdas do precipitado de DNA. O DNA foi incubado em estufa à 37 °C e dissolvido em tampão de TE pH 8.

3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ANÁLISE DE MUTAÇÕES/POLIMORFISMOS

O DNA obtido foi utilizado para fazer o screening molecular do gene p15^{INK4b}. Fragmentos dos éxons do gene foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando iniciadores específicos, de acordo com Fujiwara-Igarashi (2014) (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências de iniciadores usadas para realização da análise de alterações genéticas com suas respectivas temperaturas de anelamento.

Éxon	Forward 5'- 3'	Reverse 5'- 3'	Tm(°C)	Fragmento amplificado (pb)
1.1	p15usEXON1-F1 TGCCCTAACATTAATTTCTTC TCAG	p15usEXON1- R1GACCTTTGACCAGAATGAAG AGATA	53,7°	399
1.2	p15usEXON1-F2 GGACATGTAATTTGAACCCA GATAG	p15usEXON1-R2 TCCTAATCTCCCTTCCTAGACAC TT	53,7°	303
2	p15usEXON2-F ATCAACAAAGTATAACGGAC TCCTG	p15dsEXON2-R ACATTTGTAGCCTCCCTTCAACT	53,7°	500

3.4. TRATAMENTO DO DNA COM BISSUFITO DE SÓDIO E BISULFITE SEQUENCING PCR (BSP)

Para análise do padrão de metilação, o DNA genômico obtido foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio segundo o protocolo descrito por Herman et al. (1996), posteriormente modificado por Borges (2010). Após, foi realizada PCR com iniciadores específicos para a amplificação da região promotora parcial do gene-alvo (Tabela 3).

Tabela 3. Sequências de iniciadores usadas para realização da análise do padrão de metilação com a temperatura de anelamento.

Gene	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'	Tm(°C)	Fragmento amplificado (pb)
p15 ^{INK4b}	GTGAGGTTGTGGGGTT TAG	AACCTCCCAATACAAATAA TTCA	51°	354

3.5. SEQUENCIAMENTO DO DNA

Os produtos obtidos da Bissulfite sequencing PCR e da PCR para análise genética foram purificados com o kit comercial (Life Technologies) seguindo as instruções do fabricante.

O DNA foi sequenciado pelo método didesoxiterminal, de acordo com a metodologia descrita por Sanger et al. (1977). Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard (Applied Biosystems) versão 3.1 e o sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems).

A identificação das alterações no fragmento sequenciado foi realizada no programa BioEdit v. 5.0.6 (HALL, 1999) pelo alinhamento das sequencias obtidas com

os éxons correspondentes de uma amostra da literatura para comparação e detecção das alterações genéticas (Fujiwara-Igarashi, 2014).

Para as alterações no padrão de metilação, foram feitas análises quantitativas no programa BiQ Analyzer

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As possíveis associações entre os padrões de metilação e as alterações nucleotídicas com os dados histopatológicos e clínicos dos pacientes foram realizadas no programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007), utilizando os testes Qui-Quadrado Exato de Fisher e Odds Ratio. Em todos os testes, valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foram analisadas 40 amostras proveniente de 23 animais, sendo 17 (39%) não tumorais e 23 (61%) tumorais (Anexo 3).

Todos os animais estudados eram fêmeas, com uma média de idade de 9,5 anos variando entre 4 e 15 anos. Considerando os animais com idade igual ou maior que 7 anos como idosos, e os abaixo de 7 anos como jovens, a população estudada foi composta por 79% de idosos e 21% de jovens.

Em relação a raça, percebeu-se uma predominância de animais sem raça definida (SRD) com (11/23, 43,58%), seguida de animais das raças Poodle toy (3/23,50%), Poodle (2/23,33%), Cocker Spaniel (1/23,17%), Dachshund (1/23,17%), Pinscher (1/23,17%), Rottweiler (1/23,17%), Schnauzer (1/23,17%), Yorkshire (1/23,17%) e Pastor Alemão (1/23,17%) (Figura 4).

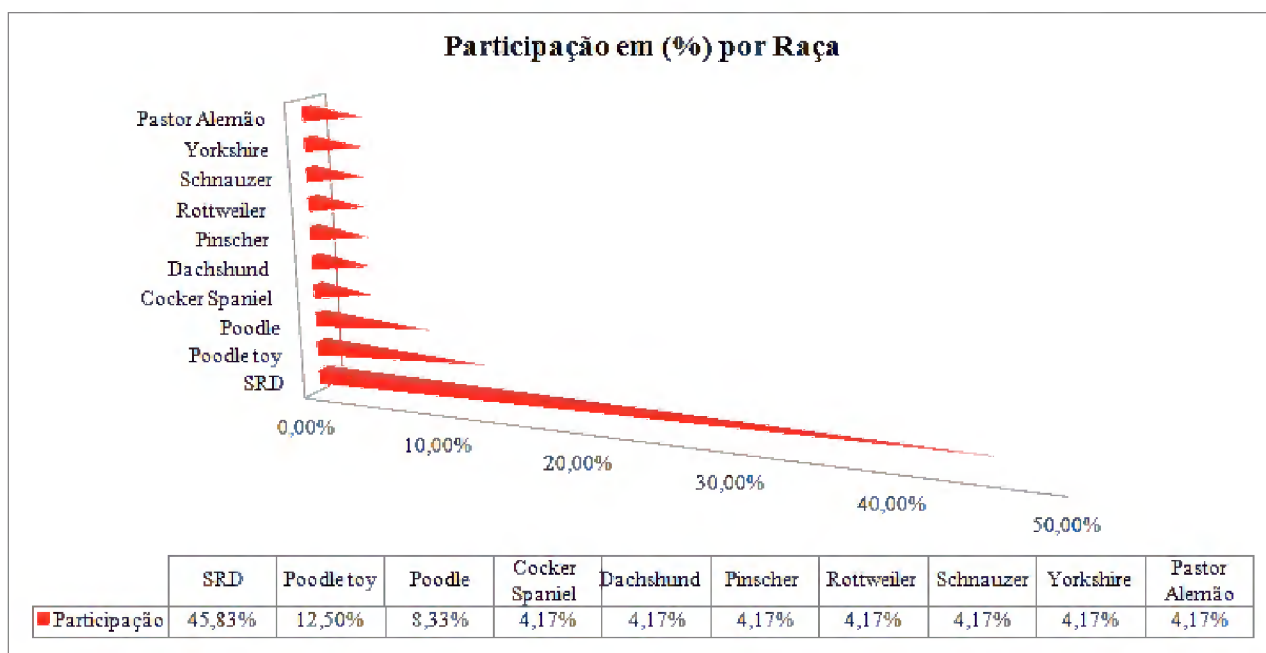


Figura 4. Gráfico da distribuição racial dos animais.

Em relação a histopatologia das amostras, estas foram divididas em benignas e malignas. Das benignas apenas Adenoma Tubular 2,5% (1) e entre as malignas foram divididas entre o tipo mesenquimal 9 (22%) e epitelial 16 (39%). Desses encontramos:

Carcinossarcoma 7 (17,5%), Adenocarcinoma 3 (7,5%), Adenocarcinoma Tubulopapilar 7,5% (3), Adenocarcinoma Papilífero 7,5% (3), Tumor Misto 5,0% (2), Fibroadenocarcinoma 2,5% (1), Fibrosarcoma 2,5% (1), Osteocondrosarcoma 2,5% (1) e Carcinoma Inflamatório 2,5% (1) (Figura 5).

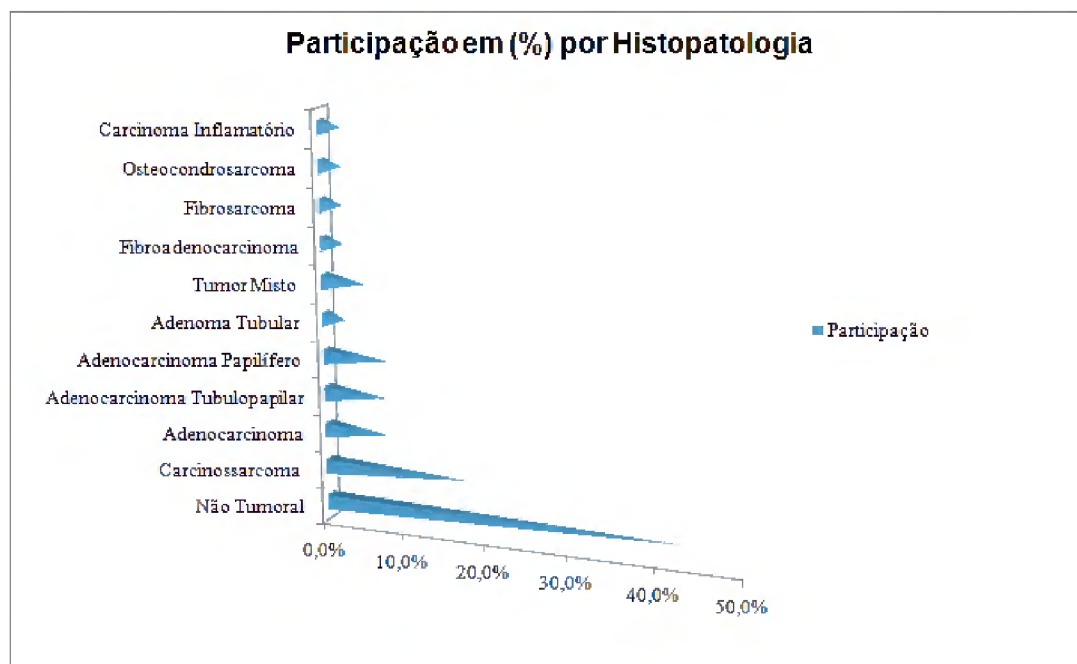


Figura 5. Gráfico da distribuição histopatológica das amostras.

Outras características analisadas nos animais desse estudo foram quanto a pseudociese, a qual estava presente em 29% dos animais, e a castração sendo que esta última foi pouco praticada na população, visto que apenas dois animais (9%) eram castrados e, a maioria, eram animais inteiros ou não castrados (21/91%).

O baixo número de castrações, um fator importante para o controle populacional, influenciou o número de gestações dos animais analisados, com nove animais com histórico de gestação duas primíparas (9%) e sete múltíparas (30%), enquanto 14 (61%) não tinham histórico gestacional (nulíparas) (Figura 6).

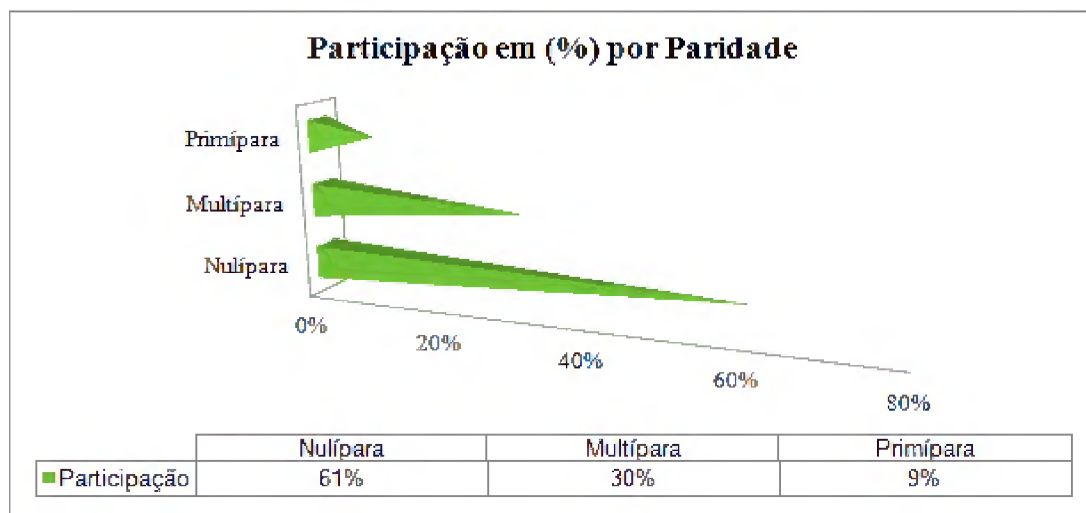


Figura 6. Distribuição da paridade dos animais.

4.1. ANÁLISE DO ESTADO DE METILAÇÃO DO GENE $p15^{INK4b}$

Foram analisadas 11 amostras, sendo cinco de tecido tumoral e seis de tecido não tumoral (Tabelas 4 e 5), para as quais foram obtidos fragmentos de 354 pb contendo 11 sítios CpG.

Tabela 4. Amostras não tumorais utilizadas nas análises de metilação.

AMOSTRAS	IDADE	RAÇA	STATUS DE METILAÇÃO
BNB 01	15	SRD	Metilado
BNB 03	10	SRD	Metilado
BNB 07	10	Poodle	Metilado
BNB 10	12	SRD	Metilado
BNB 12	12	SRD	Não metilado
BNB 14	10	Pincher	Metilado

Tabela 5. Amostras tumorais utilizadas nas análises de metilação.

AMOSTRAS	IDADE	RAÇA	STATUS DE METILAÇÃO	HISTOPATOLÓGICO
BNB 02	15	SRD	Não metilado	Carcinosarcoma
BNB 08	8	Poodle	Metilado	Fibroadenocarcinoma
BNB 09	4	Poodle	Metilado	Carcinosarcoma
BNB 11	12	SRD	Metilado	Carcinosarcoma
BNB 13	12	SRD	Metilado	Adenocarcinoma

A metilação do promotor do gene $p15^{INK4B}$ foi observada em 72,7% (8/11) das amostras analisadas, sendo que 80% (4/5) das amostras tumorais e 66,7% (05/06) das amostras não tumorais estavam metiladas (Figura 7).

Não foram observadas correlações entre o padrão de metilação e os dados histopatológicos.

Sabe-se que a metilação do locus INK4/ARF, onde se encontra o gene $p15^{INK4B}$ é um dos principais mecanismos de inativação destes genes em doenças hematológicas malignas e neoplasias (Sakellariou et al., 2008; Aguirre-Hernández et al., 2009,).

Segundo o estudo de Jung (2013), dentre os diversos genes metilados em câncer de mama humano, o $p15^{INK4B}$ era o terceiro gene mais metilado em amostras neoplásicas (25%) e o mais metilado em amostras não neoplásicas (28,3%). Tal resultado é similar ao observado no presente estudo, uma vez que a frequência de hipermetilação foi alta tanto em tecidos tumorais quanto não tumorais.

Segundo Johnson et al., (2014), alguns padrões de metilação do DNA estão envolvidos com o processo de envelhecimento e contribuem para um aumento na suscetibilidade de doenças, tais como câncer. Apesar do baixo número amostral analisado, observamos que 78,7 % (8/11) das amostras eram provenientes de animais senis cujo gene se apresentou metilado.

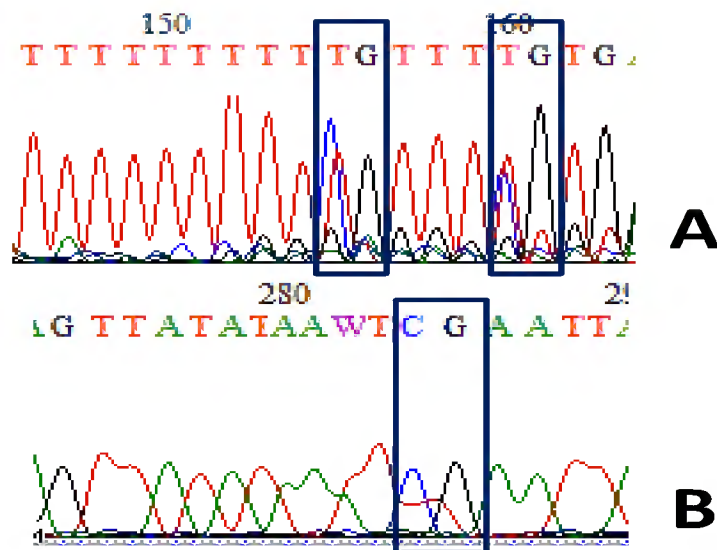


Figura 7: Exemplos de sítios metilados. A) Sítios parcialmente metilados; B) Sítio metilado.

4.2 ANÁLISE DE MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS NOS ÉXONS 1.1, 1.2 E 2 DO GENE $p15^{\text{INK4B}}$

Foram analisadas 34 amostras, sendo 22 pareadas e 11 não pareadas. Todos os animais eram fêmeas, com uma média de idade de 10,57 anos, variando entre 5 a 15 anos. Dados relacionados com a etiologia da neoplasia mamária em cães foram obtidos, tais como: raça, uso de contraceptivos, histórico de pseudociese, de castração, e o número de gestações.

- **Éxon 1.1**

Foi observada uma substituição C→A (transversão) na posição 4435664 do cromossomo 11 canino (Figura 8) em 15 das amostras analisadas (Quadros 1 e 2).

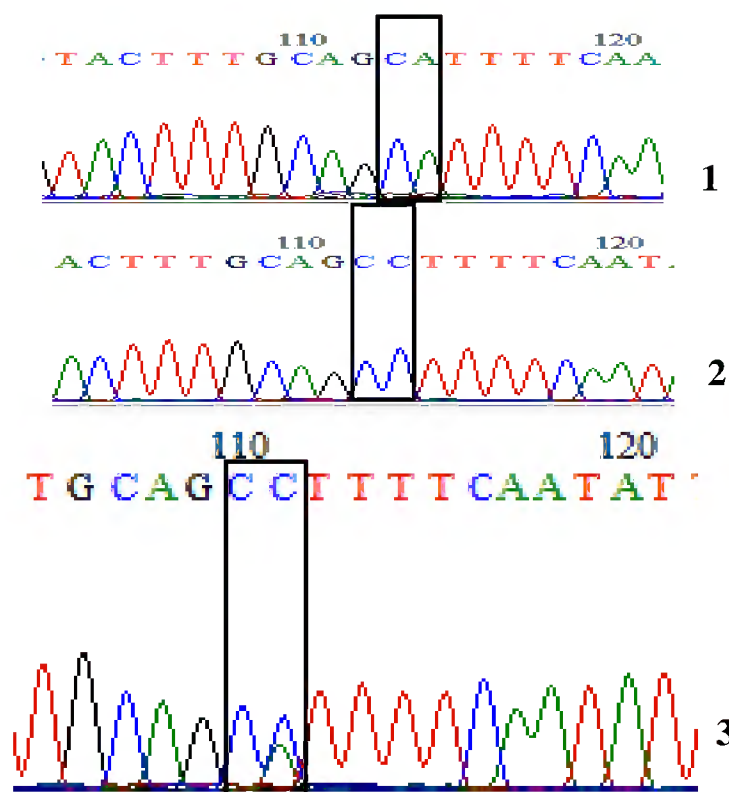


Figura 8 – Cromatograma da posição do genótipo no cromossomo 11 canino. 1) Homozigoto A; 2) Homozigoto C; 3) Heterozigoto C.

Quadro 1 – Amostras amplificadas do éxon 1.1 – pareadas.

Amostras	Raça	Idade	Tipo histopatológico	Genótipo	Anticoncepcional	Pseudociese	Castração	Paridade
BNB03	SRD	10	não tumoral	C/A	N	N	Castrada	Nulipara
BNB04	SRD	10	Adenocarcinoma Pouco diferenciado	C/A	N	N	Castrada	Nulipara
BNB05	SRD	7	não tumoral	C/A	S	S	Inteira	Multipara
BNB06	SRD	7	Tumor Misto: Mioepiteioma/Carcinossarcoma	C/A	S	S	Inteira	Multipara
BNB07	Poodle	10	não tumoral	A/A	N	N	Inteira	Nulipara
BNB08	Poodle	10	Fibroadenocarcinoma	A/A	N	N	Inteira	Nulipara
BNB10	SRD	12	Carcinossarcoma Grau III	C/C	S	S	Inteira	Multipara
BNB11	SRD	12	não tumoral	C/C	S	S	Inteira	Multipara
BNB15	Pincher	10	não tumoral	A/A	N	S/D*	Inteira	Nulipara
BNB16	Pincher	10	Adenocarcinoma Papilífero	A/A	N	S/D*	Inteira	Nulipara
BNB17	SRD	10	não tumoral	A/A	S	N	Inteira	Multipara
BNB18	SRD	10	Tumor misto: Miocondrosteóide/Carcinomatoso	A/A	S	N	Inteira	Multipara
BNB21	SRD	15	não tumoral	A/A	N	N	Inteira	Multipara
BNB22	SRD	15	Fibroadenocarcinoma / Adenocarcinoma papilífero	A/A	N	N	Inteira	Multipara
BNB23	SRD	15	não tumoral	C/C	N	N	Inteira	Nulipara
BNB24	SRD	15	Osteocondrosarcoma	C/C	N	N	Inteira	Nulipara
BNB 45	SRD	15	não tumoral	A/A	N	S	Inteira	Primípara
BNB 46	SRD	15	Carcinossarcoma grau II	A/A	N	S	Inteira	Primípara
BNB 175	Poodle	S/D*	não tumoral	C/A	N	N	Inteira	Multipara
BNB 176	Poodle	S/D*	Tecido neoplásico mamário/Adenocarcinoma	C/A	N	N	Inteira	Multipara
N57	Rotweiler	5	não tumoral	A/A	S	N	Inteira	Nulipara
N58	Rotweiler	5	Adenocarcinoma tubolo papilífero grau II	A/A	S	N	Inteira	Nulipara
N69	Rotweiler	5	Adenocarcinoma tubolo papilífero grau III	A/A	S	N	Inteira	Nulipara
S/D* - Sem definição								
SRD - Sem raça definida								

Quadro 2 – Amostras amplificadas do éxon 1.1 – não pareadas.

Amostras	Raça	Idade	Tipo histopatológico	Genótipo	Anticoncepcional	Pseudociese	Castração	Paridade
BNB09	Poodle toy	4	Carcinossarcoma	C/A	N	N	Inteira	Nulípara
BNB12	SRD	12	não tumoral	A/A	S	S	Inteira	Múltipara
BNB19	Dachshund	9	Carcinossarcoma Grau III	A/A	N	N	Inteira	Nulípara
BNB20	SRD	4	Fibrosarcoma	C/A	S	N	Inteira	Nulípara
BNB25	Poodle toy	5	Carcinossarcoma Grau III	C/C	N	S	Inteira	Nulípara
BNB 48	Cocker	13	Tecido mamário neoplásico/Carcinossarcoma	A/A	S	N	Inteira	Primípara
BNB 50	SRD	8	não tumoral	C/A	N	S	Inteira	Múltipara
BNB125	SRD	5	Tecido mamário alterado	C/A	N	N	Castrada	Nulípara
BNB 132	Poodle	S/D*	Adenoma tubular	C/A	S/D*	S/D*	Inteira	S/D*
BNB 169	Schnauzer	8	Carcinoma indiferenciado (Carcinoma inflamatório mamário)	C/A	N	S	Inteira	Nulípara
BNB145	yorkshire	8	Adenocarcinoma tubulo papilífero grau III	A/A	N	N	Inteira	Múltipara
S/D* - Sem definição								
SRD - Sem raça definida								

Foi observado que os animais de raça pura portadores do alelo mutante apresentaram um maior risco para o desenvolvimento de tumor mamário (OR: 2,000; $p=0,7503$ / IC 95%=0,3342-11,9696), embora este não seja estatisticamente significativo. Esse resultado é corroborado pelos trabalhos de Cruz-Casallas et al (2009) e Dobson (2012), que sugerem uma predisposição genética para o desenvolvimento de tumores mamários em cães de raças puras especialmente: Poodles (Toy e miniatura), Cocker Spaniels, Puli, Setter Inglês, Pointer, Pastor Alemão, Maltês Terrier, Yorkshire Terrier e Dachshund.

Verificamos neste trabalho que a idade parece ter um papel importante no desenvolvimento de neoplasia mamária em cadelas, visto que o risco de desenvolver tumores mamários em animais acima de 7 anos (idosos) portadores do alelo homozigoto A é maior do que os animais abaixo de 7 anos (jovens), apesar de ser não significativo estatisticamente (OR=1,5000/ $p=0,8908$ / Fisher $p=0,5557$). Esses resultados são corroborados pelos dados de Shafiee et al, (2013), que descrevem a incidência aumentada para este tipo de tumor em animais após os 5 anos de idade, com um pico na idade de 10 a 12 anos, o que provavelmente se deve à maiores cuidados com animais, resultando em cães de idade mais avançada e com maior predisposição a esse tipo de patologia.

Em relação a origem histológica do tipo de câncer mamário, foi observado que amostras tumorais com o alelo homozigoto A tinham o dobro do risco de formar tumores de origem epitelial (OR= 2,400 / $p=0,6193$ / Fisher $p=0,3110$) mesmo não sendo estatisticamente significativo.

Quanto a ocorrência de pseudociese, foi observado que os animais que não apresentaram pseudociese e possuíam alterações no éxon 1.1 tinha três vezes mais risco de desenvolver câncer de mama (OR= 3,3333, $p=0,6761$ / Fisher=0,3462), mesmo com um risco não estatisticamente significativo. A pseudociese, conhecida como gravidez psicológica, é considerada um fenômeno fisiológico da cadela que eventualmente acontece, geralmente ocasionando o crescimento dos alvéolos glandulares mamários. Assim considerando-se que o leite retido cronicamente pode conter compostos químicos que tem efeito carcinogênico sobre o epitélio adjacente, estes podem atuar como indutores e ou promotores de neoplasia mamária (Gupta, 2012; Santos et al, 2013).

O desenvolvimento da primeira gravidez parece representar um importante evento no processo de maturação das células da mama, tornando-as potencialmente mais protegidas em relação à ação de substâncias cancerígenas. Assim, a nuliparidade incidiria em fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (Oliveira Filho et al., 2010; Aktipis et al., 2012).

Com relação à paridade, as cadelas nulíparas com o alelo homozigoto alterado apresentaram seis vezes mais risco (OR= 6,6667/ $p= 0,1766$; Fisher $p=0,0882$) de desencadear um processo neoplásico mamário em comparação as múltíparas. Mesmo não sendo estatisticamente significativo, esse resultado mostrou ser semelhante ao de Soares (2012), onde estudo em mulheres sugeriram que a multiparidade modestamente diminui o risco de câncer de mama e a nuliparidade foi associada a um pequeno aumento no risco de câncer com a taxa de incidência multivariável de 1,3 (IC 95% = 0,9-2,1).

Esses dados, são semelhantes dos de Kolling et al., (2009), onde a nuliparidade não foi associada a um aumento em câncer mama, mas sim a um aumento do risco para todos os tipos de tumores. Com isso, a forma como a paridade influencia o risco de desenvolvimento de câncer de mama ainda é controversa.

De uma forma geral, tem-se verificado a crescente evidência da etiologia hormonal para o tumor de mama em cadelas, sendo que o índice de risco varia entre cadelas castradas e não castradas, e depende ainda da fase em que a intervenção cirúrgica é efetuada, visto que a ovariectomia (OVH) reduz o risco de desenvolver tumores mamários a 0,05% se for realizada antes do primeiro estro (cio) (Kadthur, 2011; Shafiee et al., 2013).

Considerando os resultados deste trabalho, pode-se observar que a frequência de animais portadores da alteração encontrada e inteiros (não castrados), em comparação àqueles castrados, não foi significativa de acordo com o teste de Fisher ($p=0,2895$).

Os contraceptivos orais e injetáveis são compostos à base de progesterona e estrógenos e são encontrados com frequência na posse de proprietários, objetivando prevenir o aparecimento do estro (cio) de animais. Altas doses ou a administração prolongada desses hormônios exógenos estimulam o crescimento do tumor mamário (Sorenmo et al., 2009). Com base nisso, foi analisada a influência deste evento com a presença do alelo mutado. Observou-se que animais que utilizaram contraceptivos e tinham o alelo homozigoto A apresentaram um maior risco ($OR=1,7500/p=0,9758/$ Fisher $p=0,4842$) em comparação aos animais que não usaram contraceptivos, sendo sem significância. Esse resultado é corroborado pelo trabalho de Pinheiro et al, (2013) onde foi observado que 66% dos cães que receberam contraceptivos orais durante cinco a sete anos, desenvolveram nódulos mamários.

• Éxon 1.2

Foram analisadas 32 amostras (Quadro 3) das quais nenhuma apresentou qualquer tipo de mutação e/ou polimorfismo nesta região.

Quadro 3 - Amostras amplificadas do éxon 1.2.

Amostras	Raça	Idade	Tipo histopatológico	Anticoncepcional	Pseudociese	Castração	Paridade
BNB04	SRD	10	Adenocarcinoma pouco diferenciado	N	N	Castrada	Nulipara
BNB05	SRD	7	não tumoral	S	S	Inteira	Multipara
BNB09	Poodle toy	4	Carcinossarcoma	N	N	Inteira	Nulipara
BNB11	SRD	12	não tumoral	S	S	Inteira	Multipara
BNB12	SRD	12	não tumoral	S	S	Inteira	Multipara
BNB13	SRD	12	Adenocarcinoma papilífero Grau III	S	S	Inteira	Multipara
BNB15	Pincher	10	não tumoral	N	S/D*	Inteira	Nulipara
BNB16	Pincher	10	Adenocarcinoma Papilífero	N	S/D*	Inteira	Nulipara
BNB17	SRD	10	não tumoral	S	N	Inteira	Multipara
BNB18	SRD	10	Tumor misto : Miocondrosteóide/Carcinomatoso	S	N	Inteira	Multipara
BNB19	Dashund	9	Carcinossarcoma Grau III	N	N	Inteira	Nulipara
BNB20	SRD	4	Fibrosarcoma	S	N	Inteira	Nulipara
BNB21	SRD	15	não tumoral	N	N	Inteira	Multipara
BNB22	SRD	15	Fibroadenocarcinoma / Adenocarcinoma papilífero	N	N	Inteira	Multipara
BNB23	SRD	15	não tumoral	N	N	Inteira	Nulipara
BNB24	SRD	15	Osteocondrosarcoma	N	N	Inteira	Nulipara
BNB25	Poodle toy	5	Carcinossarcoma Grau III	N	S	Inteira	Nulipara
BNB 45	SRD	15	não tumoral	N	S	Inteira	Primipara
BNB 46	SRD	15	Carcinossarcoma grau II	N	S	Inteira	Primipara
BNB 48	Cocker	13	Carcinossarcoma	S	N	Inteira	Primipara
BNB 50	SRD	8	não tumoral	N	S	Inteira	Multipara
BNB125	SRD	5	Tecido mamário alterado	N	N	Castrada	Nulipara
BNB 132	Poodle	S/D*	Adenoema tubular	S/D*	S/D*	Inteira	S/D*
BNB144	Yorkshire	8	não tumoral	N	N	Inteira	Multipara
BNB145	Yorkshire	8	Adenocarcinoma tubolo papilífero grau III	N	N	Inteira	Multipara
BNB 169	Schnauzer	8	Carcinoma indiferenciado (Carcinoma inflamatório mamário)	N	S	Inteira	Nulipara
BNB 175	Poodle	S/D*	não tumoral	N	N	Inteira	Multipara
BNB 176	Poodle	S/D*	Tecido neoplásico mamário/Adenocarcinoma	N	N	Inteira	Multipara
N57	Rotweiler	5	não tumoral	S	N	Inteira	Nulipara
N58	Rotweiler	5	Adenocarcinoma tubolo papilífero grau II	S	N	Inteira	Nulipara
N69	Rotweiler	5	Adenocarcinoma tubolo papilífero grau III	S	N	Inteira	Nulipara
N 71	SRD	8	não tumoral	N	S	Inteira	Multipara
S/D* - Sem definição							
SRD - Sem raça definida							

- **Éxon 2**

Neste éxon foram amplificadas apenas 10 amostras (Quadro 4), sendo que nenhuma apresentou mutação e/ou polimorfismos. Apesar do baixo número amostral, esses resultados corroboram os de Camacho et al. (2010) que não observaram nenhuma alteração genética no éxon 2 em amostras de sangue de cães com câncer de mama das raças Bernese, Flat-coated retrievers, Golden retrievers e labrador.

Quadro 4 – Amostras analisadas do éxon 2.

Amostras	Raça	Idade	Tipo histopatológico	Anticoncepcional	Pseudociese	Castração	Paridade
BNB03	SRD	10	não tumoral	N	N	Castrada	Nulipara
BNB04	SRD	10	Adenocarcinoma Pouco diferenciado	N	N	Castrada	Nulipara
BNB06	SRD	7	Tumor Misto: Mioepiteioma/Carcinossarcoma	S	S	Inteira	Multipara
BNB09	Poodle toy	4	Carcinossarcoma	N	N	Inteira	Nulipara
BNB20	SRD	4	Fibrosarcoma	S	N	Inteira	Nulipara
BNB22	SRD	15	Fibroadenocarcinoma / Adenocarcinoma papilífero	N	N	Inteira	Multipara
BNB24	SRD	15	Osteocondrosarcoma	N	N	Inteira	Nulipara
BNB 45	SRD	15	não tumoral	N	S	Inteira	Primípara
SRD - Sem raça definida							

5. CONCLUSÃO

Este é um estudo inédito sobre as alterações genéticas e epigenéticas do gene p15^{INK4B} em neoplasias de mama em cães de Belém. A partir dos resultados obtidos e dos métodos utilizados, pode-se concluir que:

- A metilação do p15^{INK4B} em amostras de tumores mamários de cadelas, parece estar mais relacionada com a idade do que com o processo tumorigênico;

- Os fatores que influenciam na tumorigênese mamária, como: idade, raça, uso de anticoncepcional, a paridade, pseudociese e tipo de histopatológico podem aumentar o risco de desenvolver tumores em pacientes portadores da alteração C→A do éxon 1.1 do gene, apesar de não ter alcançado a significância estatística.

- Mais estudos, com um número maior de amostras, são necessários para uma melhor compreensão da influência das alterações genéticas e epigenéticas do gene p15^{INK4B} nos tumores mamários de cães.

6. REFERÊNCIAS

- AGUIRRE-HERNÁNDEZ, J., MILNE, B.; QUEEN C. Disruption of chromosome 11 in canine fibrosarcomas highlights an unusual variability of CDKN2B in dogs. **BMC Veterinary Research**, 5:27. 2009.
- ALI, M.A.; SJÖBLOM, T. Molecular pathways in tumor progression: from discovery to functional understanding. **Molecular Biosystems**, v. 5, p.902-908, 2009.
- ANDRADE, F. H. E., FIGUEIROA, F. C., BERSANO, P. R. O., BISSACOT, D. Z., ROCHA, N. S. Malignant mammary tumor in female dogs: enviromental contaminants. **Diagnostic Pathology** 5: 45, 2010.
- ARRUDA S. M, COSTA ACF, SILVA NS, ROCHA VCM, ROSALES-RODRIGUEZ CA, ESTRELA- LIMA A, MOREIRA ELT, MADRUGA C, FERREIRA-NETO, JS, SILVA MCA, OLIVEIRA, EMD. Tipificação genética, através da técnica de Spoligotyping, de isolados de Mycobacterium bovis em animais abatidos na região metropolitana de Salvador, Bahia Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.2, p.233-237, abr./jun., 2010
- AUCLAIR, G.; WEBER, M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. **Biochimie**, p. 1-10., 2012.
- AYRES, M.; AYRES, M.J.; AYRES, D.L.; SANTOS, A. de A. dos. **BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas de ciências bilógicas e médicas**. Belém Sociedade Civil mamiraua/CNPQ. 2009.
- AZZATO, M. ; LESUEUR, F. Effects of common germline genetic variation in cell cycle control genes on breast cancer survival: results from a population-based cohort. **Breast Cancer Research**. 10:R47. 2008
- BELSHAW, N. J.; JOHNSON, I. T. Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. **Food Chem Toxicol.**, v. 46, p. 1346-1359, 2008.
- BERNSTEIN B., MEISSNER A, LANDER ES (2007) The mammalian epigenome. **Cell**, 4: 669-681.
- CAMACHO, C.; MUKHERJEE, B.; MCELLIN, B.; HU, B. Loss of p15/Ink4b accompanies tumorigenesis triggered by complex DNA double-strand breaks, **Carcinogenesis**, TEXAS, 1889-1896. 2010.
- CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.B.; FERREIRA E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, A. C.; SALGADO, B. S. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CHENG, X.; BLUMENTHAL, R. M. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. **Structure**, v. 16, p. 341-350, 2008.

CHERNOV, A. V.; SOUNNI, N. E., et al. Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP2/TIMP-2 axis in cancer cells. **J Biol Chem**, v.284, n.19, p.12727-34, 2009.

CONRADIE, R. Restriction point control of the mammalian cell cycle via the cyclin E/Cdk2:p27 complex. **FEBS Journal** 357-367, 2010.

COWIN, P.A.; ANGLÉSIO, M.; ETEMADMOGHADAM, D.; BOWTELL, D.D. Profiling the cancer genome. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.11. p. 133-159, 2010.

CRUZ-CASALLAS, P.; BRAVO, D. T.; OCHOA J. A., Prevalence of neoplasm in canines in the university of the Llanos, during 2004 to 2007. *Rev.MVZ. Córdoba*. 2009.

DANTAS, E. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 263-269, 2009.

DOBSON, J. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs, **ISRN Veterinary Science**, 23: 2012.

EHRlich, M. (2009). DNA hypomethylation in cancer cells. **National Institutes of Health**. U.S.A., p. 239–259, December, 2009.

FEINBERG AP & VOGELSTEIN B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, 301: 89–92. 1983.

FELICIANO, M. Neoplasia mamária em cadelas – revisão de literatura. **Revista Científica eletrônica de Medicina Veterinária**, 18: 12, 2012.

FUJIWARA-IGARASHI, A., GOTO-KOSHINO, Y. Prognostic significance of the expression levels of the p16, p15, and p14 genes in dogs with high-grade lymphoma. **The Veterinary Journal** 199: 236–244, 2014.

GUPTA, K., SOOD, N., K., UPPAL, S. K., MOHINDROO, J., MAHAJAN, S., RAGHUNATH, M., SINGH, K. Epidemiological Studies on Canine Mammary Tumour and its Relevance for Breast Cancer Studies. **IOSR Journal of Pharmacy** (2): 322–333, 2012.

HALL TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser**, 41: 95-98, 1999.

HANAHAN D. & WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144: 646-674. 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** 93: 9821-9826, 1996.

HAYATSU, H. The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research. **Mutat Res.**, v. 659, p. 77-82, 2008.

IACOBUZIO-DONAHUE CA. Epigenetic changes in cancer. **Annu Rev Pathol**, 4: 229- 249. 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2014 – **Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional do Câncer - Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer, Rio de Janeiro, 2014. 7p.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 253-262, 2007.

JOHNSON K. C ., KESTLER D. C., CHENG C. Age-related DNA methylation in normal breast tissue and its relationship with invasive breast tumor methylation. **Landes Bioscience**,9:2, 268–275; 2014.

JUNG, E.; KIM, I. . Comparison of Methylation Profiling in Cancerous and Their Corresponding Normal Tissues from Korean Patients with Breast Cancer. **Annals of laboratory Medicine**, 33:431-440. 2013.

KADTHUR, J. C., RAO, S., SONNAHALLIPURA, B.M., THIMMANAHALLI, D.S., LAXMIKANTH, S.M. Prognostic value of Ki-67 proliferation antigen in canine malignant mammary gland tumours. **Braz J Vet Pathol**, 4: 36-40, 2011.

KINZLER, K.W., JIAO, Y., SHI, C., EDIL, B.H., DE WILDE, R.F., KLIMSTRA, D.S., MAITRA, A., SCHULICK, R.D., TANG, L.H., WOLFGANG, C.L., CHOTI, M.A., VELCULESCU, V.E., DIAZ, L.A., JR., VOGELSTEIN, B., HRUBAN, R.H., and Papadopoulos, N.. Daxx/Atrx, Men1, and Mtor pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. **Science** 331, 1199–1203. 2011

KRIMPENFORT P, QUON KC, MOOI WJ, LOONSTRA A, BERNS A: Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. **Nature**, 413:83-86. 2007.

KOLLING, F., SANTOS, J. The influence of nutritional risk factors in the development of breast cancer in outpatients from the countryside of Rio Grande do Sul, Brazil. **Scientia Medica**.19 (3): 115-121, 2009.

KONTOROVICH, T., COHEN, Y., NIR, U., FRIEDMAN, E. Promoter methylation patterns of ATM, ATR, BRCA1, BRCA2 and P53 as putative cancer risk modifiers in Jewish BRCA1/BRCA2 mutation carriers. **Breast Cancer Res Treat**.116: 195–200, 2009.

LEE, E., MULLER, W. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2: 1-18, 2010.

LI, J., POI M.J, MING-DAW T . B. Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor P16(INK4A) and Their Relevance to Cancer. **Biochemistry** 50: 5566–82. 2011

LISTER, R.; PELIZZOLA, M.; DOWEN, R. H.; HAWKINS, R. D.; HON, G.; TONTIFILIPPINI, J.; NERY, J. R.; LEE, L.; YE, Z.; NGO, Q.-M.; EDSALL, L.; ANTOSIEWICZBOURGET, J.; STEWART, R.; RUOTTI, V.; MILLAR, A. H.; THOMSON, J. A.; REN, B.; ECKER J. R. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, p. 315-322, 2009.

NEGRINI, S. Genomic instability [mdash] an evolving hallmark of câncer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 1: 220–228, 2010.

NOWSHEEN, S.; AZIZ, K.; TRAN, P. T. et al. Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. **Cancer letters**, p. 1-10., 2012.

OLIVEIRA FILHO J. C. , KOMMERS, G. D. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães, **Pesq. Vet. Bras.** 30(2):177-185, 2010

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

PINHEIRO AL. B., LAUTER D. S.L, ; MEDEIROS G. C.; Câncer de Mama em Mulheres Jovens: Análise de 12.689 Casos. **Revista Brasileira de Cancerologia** . 59(3): 351-359, 2013.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v.447, n.7143, p.425-32, 2007.

ROGERS, A. Diet and Breast Cancer: Studies in Laboratory Animals. **The Journal of nutrition**, 1-3, 2014.

SABA, C.F., ROGERS, K.S., NEWMAN, S.J., MAULDIN, G.E. & VAIL, D.M. Mammary gland tumors in male dogs. **J Vet Intern Med**, 21(5), 1056-1059, 2007.

SANGER F., NICKLEN S, COULSON AR (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors **Proc Nat Acad Sci USA**, 74:5463-5467

SANTOS, A. LOPES, C. et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Veterinary Research**, 9: 1-11, 2013.

SAKELLARIOU, S.; LIAKAKOS, T. ; GHICONTI, I.; HADJIKOKOLIS, S. Immunohistochemical Expression of P15 (INK4B) and SMAD4 in Advanced Gastric Cancer, **Anticancer Research**, Greece , 1079-1083, 2008.

SAWAN, C.; VAISSIÈRE, T.; MURR, R.; HERCEG, Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutat Res.**, v. 642, p. 1-13, 2008.

SINHA, S. ; CHUNDER, N. Frequent Deletion and Methylation in SH3GL2 and CDKN2A Loci are Associated with Early- and Late-onset Breast Carcinoma. **Annals of Surgical Oncology** 15 (4) : 1070–1080. 2008.

SHAFIEE, R. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. **Cancer Cell International**, 13: 1- 79, 2013.

SLACK JM. Conrad Hal Waddington: the last renaissance biologist? **Nat Rev Genet**, 3: 889-895. 2002.

SOARES, P. M. Características das mulheres com câncer de mama assistidas em serviços de referência do Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Epidemiologi.**(3) 595-60, 2012.

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

TORBENSON, M. ; VIVEKANANDAN, P. Epigenetic instability is rare in fibrolamellar carcinomas but common in viral-associated hepatocellular carcinomas. **Mod Pathol.**, v. 21, p. 670-675, 2008.

TOST, J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. **Mol Biotechnol**, 2009.

UVA, P. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC Genomics**. 10: 135, 2009.

WITHROW, S. J.; MACEWEN'S, E.G. Small Animal Clinical Oncology. **Mssouri: Saunders Elsevier**. 4ª edição, 2007.

YU, W. Chromosomal changes in aggressive breast cancers with basal- like features. **National Institutes of Health**, 29-37, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1

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:

ANEXO 2



ANEXO 3

AMOSTRAS PAREADAS	RAÇA	IDADE	TIPO HISTOLÓGICO	ANTICONCEPCIONAL	PSEUDOCIESE	CASTRANÇA	PARIDADE
BNB01	SRD	15	Não Tumoral	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB02	SRD	15	Carcinossarcoma	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB03	SRD	10	Não Tumoral	Não	Não	CASTRADA	NULÍPARA
BNB04	SRD	10	Adenocarcinoma	Não	Não	CASTRADA	NULÍPARA
BNB05	SRD	7	Não Tumoral	Sim	Sim	INTEIRO	MULTÍPARA
BNB06	SRD	7	Tumor Misto	Sim	Sim	INTEIRO	MULTÍPARA
BNB07	Poodle toy	10	Não Tumoral	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB08	Poodle toy	10	Fibroadenocarcinoma	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB10	SRD	12	Não Tumoral	Sim	Sim	INTEIRO	MULTÍPARA
BNB11	SRD	12	Carcinossarcoma	Sim	Sim	INTEIRO	MULTÍPARA
BNB12	SRD	12	Não Tumoral	Sim	Sim	INTEIRO	MULTÍPARA
BNB13	SRD	12	Adenocarcinoma Papilífero	Sim	Sim	INTEIRO	MULTÍPARA
BNB15	Pincher	10	Não Tumoral	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB16	Pincher	10	Adenocarcinoma Papilífero	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB17	SRD	10	Não Tumoral	Sim	Não	INTEIRO	MULTÍPARA
BNB18	SRD	10	Tumor Misto	Sim	Não	INTEIRO	MULTÍPARA
BNB21	SRD	15	Não Tumoral	Não	Não	INTEIRO	MULTÍPARA
BNB22	SRD	15	Adenocarcinoma Papilífero	Não	Não	INTEIRO	MULTÍPARA
BNB23	SRD	15	Não Tumoral	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB24	SRD	15	Osteocondrosarcoma	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB 45	Pastor Alemão	15	Não Tumoral	Não	Sim	INTEIRO	PRIMÍPARA
BNB 46	Pastor Alemão	15	Carcinossarcoma	Não	Sim	INTEIRO	PRIMÍPARA
BNB 50	SRD	8	Adenocarcinoma	Não	Sim	INTEIRO	MULTÍPARA
N71	SRD	8	Não Tumoral	Não	S/D	S/D	MULTÍPARA
BNB 132	POODLE	S/D	Adenoma Tubular	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB139	POODLE	s/D	Adenoma Tubular	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB144	Yorkshire	8	Não Tumoral	Não	Não	INTEIRO	MULTÍPARA
BNB145	Yorkshire	8	Adenocarcinoma Tubolo Papilífero	Não	Não	INTEIRO	MULTÍPARA
BNB 175	POODLE	S/D	Não Tumoral	Não	Sim	INTEIRO	NULÍPARA
BNB 176	POODLE	S/D	Adenocarcinoma	Não	Sim	INTEIRO	NULÍPARA
N57	Rotweiler	5	Não Tumoral	Sim	Não	INTEIRO	NULÍPARA
AMOSTRAS NÃO PAREADAS	RAÇA	IDADE	TIPO HISTOLÓGICO	ANTICONCEPCIONAL	PSEUDOCIESE	CASTRANÇA	PARIDADE
N58	Rotweiler	5	Adenocarcinoma Tubolo Papilífero	Sim	Não	INTEIRO	NULÍPARA
N69	Rotweiler	5	Adenocarcinoma Tubolo Papilífero	Sim	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB09	Poodle toy	4	Carcinossarcoma	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB 48	Cocker	13	Carcinossarcoma	Sim	Não	INTEIRO	PRIMÍPARA
BNB19	Dashund	9	Carcinossarcoma	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB20	SRD	4	Fibrosarcoma	Sim	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB25	Poodle toy	5	Carcinossarcoma	Não	Não	INTEIRO	NULÍPARA
BNB125	SRD	5	Não Tumoral	Não	Não	CASTRADA	NULÍPARA
BNB 169	Schnauzer	8	Carcinoma Inflamatório	Não	Sim	INTEIRO	NULÍPARA
S/D* - Sem definição							
SRD Sem raça definida							