

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE MUTACIONAL DA REGIÃO DOS EXONS 5 A 8
DO GENE SUPRESSOR DE TUMOR *p53* EM NEOPLASIAS
MAMÁRIAS CANINAS**

Simone Crestoni Fernandes
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE MUTACIONAL DA REGIÃO DOS EXONS 5 A 8
DO GENE SUPRESSOR DE TUMOR *p53* EM NEOPLASIAS
MAMÁRIAS CANINAS**

Simone Crestoni Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck

Co-orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
MARÇO DE 2008

Fernandes, Simone Crestoni
F363a Análise mutacional da região dos exons 5 a 8 do gene supressor de tumor *p53* em neoplasias mamárias caninas/ Simone Crestoni Fernandes. -- Jaboticabal, 2008
xviii, 52 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Carlos Roberto Daleck
Banca examinadora: Renata Afonso Sobral, José Jurandir Fagliari
Bibliografia

1. Cão oncogênese. 2. Cão mutação tumor mama. 3. Cão PCR. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

SIMONE CRESTONI FERNANDES – filha de Manoel Fernandes Basan e Blandina Libera Crestoni Fernandes, nascida em 16 de agosto de 1979, na cidade de São Paulo-SP; graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Paulista (UNIP) em dezembro de 2002. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – câmpus de Jaboticabal, em agosto de 2005, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck e co-orientação da Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena.

“Os inventores quase se esqueceram de sua vida, para muitos se lembrarem de seu sonho”.

Alberto Santos Dumont

Cordel:

O MESTRADO DA SIMONE

Sabryna Gouveia Calazans

Foi depois de muito ter pensado
 Que ela tomou uma importante decisão
 A cidade grande ela resolveu deixar
 Até do McDonalds ela abriu mão
 Arrumou a sua mala espalhafatosa
 Seu nécessaire cor-de-rosa
 E foi embora fazer pós-graduação

Quando em Jaboticabal ela chegou
 Muitos amigos já havia conquistado
 E poucos dias depois de sua chegada
 Para a Nutronco ela já tinha se mudado
 Seus parceiros: Ricardo, Sabryna, Gabriela
 E o Banda que não saía do quarto dela
 Só estava começando seu mestrado

De uma coisa estava sabendo
 Ela teria que atender na oncologia
 Tratando os animais com câncer
 Fazendo muita quimioterapia
 Mas não imaginava onde ela iria parar
 Um laboratório de Biologia Molecular
 Isso porque o mestrado era em Cirurgia

Ver a Simone chorando
 Não era nenhuma novidade
 Era PCR que não dava certo
 Ou simplesmente era saudade
 No dia que o experimento terminou
 Quase que o mundo se acabou
 Pois já fazia uma eternidade

“No final tudo dá certo”
 Foi a frase que ela mais ouviu
 O último que disse isso
 Ela quase o agrediu
 Lembrou que era paulistana
 Trabalhou fim de semana
 E não é que ela conseguiu?

Agora a Simone vai partir
 Resolveu voltar pra capital
 Ela virou oncologista
 E vai deixar Jaboticabal
 Muitos amigos vão ficar
 Sua visita vamos esperar
 Em um domingo de carnaval

É assim que se vive a vida
 Todo dia tomando uma decisão
 Acertando ou errando
 Sentindo orgulho ou frustração
 É difícil de compreender
 Indispensável para amadurecer
 Mas aprendendo sempre uma lição!

Dedico este trabalho aos animais, por toda a pureza e força que sempre demonstram na luta contra essa imprevisível doença, o câncer.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Aos meus pais, por confiarem em mim, me darem suporte emocional, apoio incondicional e por sempre investirem em minha educação;
- ❖ À Deus, por me dar saúde e coragem para seguir em frente;
- ❖ À Profa. Janete, minha co-orientadora, com aquela simpatia e sorriso maravilhoso, uma “mãe” que apareceu para me guiar;
- ❖ À família SOV (Serviço de Oncologia Veterinária):
 - Prof. Daleck, meu orientador, por ter me aceito e me recebido na oncologia com os braços abertos, sempre tentando me ensinar uma lição importante sobre a profissão ou sobre a vida;
 - Andriago Barbosa De Nardi, oncoráculo, pelos ensinamentos não só na oncologia, mas em como trabalhar em equipe, sempre apoiando TODAS as pessoas que lhe procuram, com paciência e alma de professor, um exemplo de pessoa pra mim;
 - Sabryna Gouveia Calazans (Recife), minha mãe, irmã, companheira de trabalho e vizinha de quarto, amiga cúmplice em todos os momentos, um exemplo de competência, caráter e simplicidade;
 - Sabrina Marin Rodigheri (Curitiba), oncoirmã e nutroncoirmã, pelas discussões intermináveis sobre os pacientes ou experimento, e pelos papos sobre a vida, amiga para todas as horas;
 - João Humberto Teotônio de Castro, meu querido oncob..., pela rotina dos atendimentos e cirurgias, pelos sucos na cantina, pelas reuniões lá em casa, pela convivência agradável, pelos inúmeros “por que?” e por ter incluído na minha vida a sua esposa Michele, amiga mais que querida;
 - Jane Regina França César, por estar sempre preocupada comigo, me apoiando nas horas mais difíceis;
 - Carlos Alfredo (Colombiano) e Milena, pela agradável convivência;

- Meus Oncoirmãos mais velhos e sumidos: Marcão, Juliana, Patrícia e André;
- Meus Oncoirmãos mais novos: Sabrina (Brasília), Thiago, Carol e Giovani (Colombiano);
- ❖ À Profa. Mirela e à Profa. Rose, por toda a ajuda valiosa no Exame Geral de Qualificação;
- ❖ Ao Prof. Maurício Barbanti, por ceder o Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia II, para realização das extrações e da PCR;
- ❖ À Profa. Eliane, por ceder o Laboratório de Seqüenciamento do Departamento de Tecnologia, para realização do seqüenciamento;
- ❖ Ao Irlan, por sua imensa boa vontade de me socorrer no finalzinho do experimento;
- ❖ Ao Prof. Carlos Barbosa, pelo auxílio na estatística;
- ❖ Aos proprietários e suas cadelas, que participaram desse trabalho;
- ❖ Aos estagiários do SOV, pelo apoio na rotina louca do Hospital;
- ❖ Aos residentes e funcionários do Hospital Veterinário da UNESP Jaboticabal, pelo companheirismo e por tornar o Hospital um ambiente agradável de se trabalhar;
- ❖ Aos pós-graduandos e professores da UNESP Jaboticabal, que me ensinaram a enfrentar os problemas e a rotina da pesquisa;
- ❖ Aos companheiros moleculóides: João (técnico), Elias (Gafa), Maria Eliane (Durva), Vanessa (Lady), Henry, Fábio, André, Leonardo, Eveline, Bruna (Longa), Denise, Cíntia, Aline e os estagiários Livia, Renan (Margarida), Fernanda, Gregório e Larissa, pela harmoniosa convivência diária, fazendo com que os meus intermináveis dias de PCR fossem mais fáceis;
- ❖ À família Obstetrícia: Prof. Wilter, Maricy, Giuliano, Aracele, Danilo (Pooh), Tatiana (Bituca) e Michele, por fazer esse setor ser um lugar tão aberto e agradável pra mim;

- ❖ À família Nutronco:
 - Carmem, mãe da Nutronco, sempre alegre, divertida, acolhedora e amorosa, pelos pães e bolos deliciosos de fim de tarde, pela paciência e amizade;
 - Aos sempre irmãos Sabryna Gouveia Calazans (Recife), Sabrina Marin Rodigheri (Curitiba), Ana Gabriela Valério, Ricardo Souza Vasconcelos, Eduardo Deberaldini (Banda) e Kellen de Sousa Oliveira;
 - Aos Nutroncos mais novos: Jesus (Colombiano) e o casal Fernanda e Sammy;
- ❖ Aos amigos jaboticabas:
 - Da Republica “Ou Não” e agregados: Fernanda (Viúva), Maria Luísa (Malu), Maria Eliane (Durva), Gláucia, Raphael (Consolo), Renato (Salsa), Fabiano e Stélio, e os minhocos Marcelo (Mor), Stael e Fabrício, por tudo o que passamos juntos, pela alegria, amizade sincera, cumplicidade, companheirismo e apoio;
 - Às mais que divertidas e necessárias sessões de quinta na Eva, com a própria, Patricia Pettes (Buneca), Ester (Pinga), Maricy Aparício e Aline, pela amizade e momentos inquecíveis;
 - Aos freqüentadores assíduos da Nutronco e amigos queridos: Soraia, Márcio Brunetto, Márcia (Nutrição) e casal Juliana e Márcio, pelos cafés da tarde, churrascos e tapiocadas;
 - República “Antro do HV”, pela agradável convivência no Hospital, pelos churrascos e “shows”;
- ❖ À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida;
- ❖ À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro (processo nº 2006/01504-9);
- ❖ Aos meus irmãos Ricardo e Wanderley, minha cunhada Márcia e meus sobrinhos Guilherme e Rodrigo, por entenderem minha distância e torcerem sempre por mim;

- ❖ À minha vovozinha Dide (*in memoriam*), pelo exemplo de mulher guerreira que um dia pretendo me tornar;
- ❖ Aos amigos de São Paulo, sempre dando força apesar de toda a distância: Patrícia Coelho, Mariana Lage Marques, Diana Botelho, Carina Farber, Stella Mirisola, Juliana Chaimovich, Paola Martinelli, Victor Gallimberti (Boi), Mariana Julien, Vítor Belíssimo, Fernanda Fruet, Paulo Marcondes, Cristiane Bueno, Hélio Salatino, Vitor Vilutis, Letícia Veiga, Rafael (Cabeção) e Marcela;
- ❖ Ao Skoll, cão doce e meigo que me ensinou o que é amor incondicional;
- ❖ Aos meus amigos caninos, Tapetti, Draco, Esponja, Paçoca, Cocada, Jade, Celso, Fiona, Ben e Bonnie e aos felinos Cacau, Miguel, Yoda e Leka, por me lembrarem sempre como é delicioso conviver com seres tão diferentes entre si, mas tão iluminados!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Neoplasia Mamária.....	2
2.2 Oncogênese Mamária.....	5
2.3 Gene Supressor de Tumor <i>p53</i>	6
2.4 Métodos Moleculares Aplicados à Oncologia.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Seleção dos Pacientes.....	11
3.2 Coleta e Armazenamento das Amostras.....	11
3.3 Extração do DNA Genômico.....	12
3.4 Técnica de PCR.....	12
3.5 Seqüenciamento e Análise dos Resultados.....	14
4. RESULTADOS.....	16
4.1 Idade.....	16
4.2 Raça.....	16
4.3 Tipo Histológico.....	17
4.4 Localização da Neoplasia.....	18
4.4.1 Glândula Mamária Acometida e Número de Glândulas Mamárias Acometidas.....	18
4.5 Tempo de Progressão.....	19
4.6 Características Macroscópicas da Neoplasia.....	19

4.6.1 Tamanho da Neoplasia e Presença de Ulceração.....	19
4.7 Extração de DNA genômico.....	20
4.8 Técnica de PCR.....	21
4.9 Seqüenciamento.....	23
4.9.1 Seqüenciamento do Grupo Controle.....	23
4.9.2 Seqüenciamento do Exon 5.....	25
4.9.3 Seqüenciamento do Exon 6.....	27
4.9.4 Seqüenciamento do Exon 7.....	27
4.9.5 Seqüenciamento do Exon 8.....	27
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	39
APÊNDICES.....	48
A – Protocolo de extração de DNA genômico tecidual	48
B –. Seqüência normal dos exons 5 a 8 do gene <i>p53</i> separada em códons.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação histológica dos tumores mamários caninos, segundo a Organização Mundial de Saúde.....	4
Tabela 2.	Componentes essenciais para realização da técnica de PCR.....	10
Tabela 3.	Seqüências dos pares de “primers” utilizados para amplificação dos exons 5 a 8 do gene <i>p53</i>	13
Tabela 4.	Programa da técnica de PCR utilizado.....	13
Tabela 5.	Condições de amplificação para cada “primer” e o produto de PCR gerado para cada exon analisado do gene <i>p53</i>	22
Tabela 6.	Parâmetros analisados por cadela.....	29
Tabela 7.	Comparação entre as mutações encontradas e os tipos histológicos das neoplasias mamárias caninas.....	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação gráfica da ocorrência de tumores de mama de acordo com a idade em cadelas atendidas no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.....16
- Figura 2. Representação gráfica da incidência de neoplasias mamárias distribuídas conforme a raça, em cadelas atendidas no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.....17
- Figura 3. Representação gráfica da incidência de tumores de mama de acordo com o tipo histológico de cadelas atendidas no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.....17
- Figura 4. Representação gráfica da incidência de tumores de mama de acordo com a glândula mamária acometida de cadelas atendidas no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.....18
- Figura 5. Representação gráfica do número de glândulas acometidas por neoplasias mamárias em relação a cada cadela atendida no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.....18
- Figura 6. Representação gráfica do tempo de progressão das neoplasias mamárias em semanas das cadelas atendidas no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.....19
- Figura 7. Representação gráfica da comparação do tamanho das neoplasias mamárias em relação ao número de casos atendidos no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.....20

- Figura 8. Representação gráfica da presença de ulceração das neoplasias mamárias nas cadelas atendidas no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.....20
- Figura 9. Eletroferograma de algumas amostras, evidenciando a integridade do DNA extraído pelo método fenol:clorofórmio.....21
- Figura 10. Eletroferograma de algumas amostras de DNA extraído tratado com RNase.....21
- Figura 11. Eletroferograma de confirmação de alguns produtos amplificados do exon 5 do gene *p53*, mostrando o padrão de migração do fragmento de 273 pb em gel de agarose (1%), com marcador GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas).....22
- Figura 12. Eletroferograma de confirmação de alguns produtos amplificados do exon 6 do gene *p53*, mostrando o padrão de migração do fragmento de 162 pb em gel de agarose (1%), com marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....22
- Figura 13. Eletroferograma de confirmação de alguns produtos amplificados do exon 7 do gene *p53*, mostrando o padrão de migração do fragmento de 144 pb em gel de agarose (1%), com marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....23
- Figura 14. Eletroferograma de confirmação de alguns produtos amplificados do exon 8 do gene *p53*, mostrando o padrão de migração do fragmento de 193 pb em gel de agarose (1%), com marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....23

- Figura 15. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos correspondente ao exon 5 do gene *p53*, do grupo controle controle.....24
- Figura 16. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos correspondente ao exon 6 do gene *p53*, do grupo controle controle.....24
- Figura 17. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos correspondente ao exon 7 do gene *p53*, do grupo controle controle.....24
- Figura 18. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos correspondente ao exon 8 do gene *p53*, do grupo controle controle.....25
- Figura 19. Representação esquemática evidenciando o ponto de mutação no códon 156 (exon 5) do gene *p53* (grupo controle), sem alteração do aminoácido cisteína.....25
- Figura 20. Representação esquemática evidenciando o ponto de mutação no códon 132 (exon 5) do gene *p53*, com alteração do aminoácido lisina para asparagina e a conseqüente mutação “frameshift”.....26
- Figura 21. Representação esquemática evidenciando o ponto de mutação no códon 148 (exon 5) do gene *p53*, com alteração do aminoácido serina para treonina.....26
- Figura 22. Representação esquemática evidenciando o ponto de mutação no códon 253 (exon 7) do gene *p53*, com alteração do aminoácido treonina para serina.....27

Figura 23. Representação esquemática evidenciando o ponto de mutação no códon 285 (exon 8) do gene *p53*, com alteração do aminoácido ácido glutamínico para ácido aspártico.....28

ANÁLISE MUTACIONAL DA REGIÃO DOS EXONS 5 A 8 DO GENE SUPRESSOR DE TUMOR *p53* EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

RESUMO – Visando à contribuição ao estudo da oncologia e ao aumento da sobrevivência de cadelas com neoplasias mamárias, o objetivo deste trabalho é investigar as possíveis alterações no gene supressor de tumor *p53* em tumores de mama relacionando-as com a idade, raça, tipo histológico, número e localização da neoplasia, tempo de progressão e característica macroscópica do tumor (tamanho e presença de úlcera). Foram avaliadas 30 amostras de neoplasias de mama de cadelas. Este material foi distribuído em cinco grupos, de acordo com a classificação histopatológica do tumor (adenoma, tumor misto benigno, carcinoma, tumor misto maligno e sarcoma). O Grupo Controle compreendeu cinco amostras de tecido mamário sem alterações patológicas. As possíveis mutações existentes nos exons 5 a 8 do gene *p53* foi analisado por meio da técnica de PCR (reação em cadeia de polimerase) e seqüenciamento. Foram observadas cinco mutações em neoplasias malignas e uma mutação em neoplasia benigna. Dessas mutações, todas eram “missense” e três delas eram do tipo “frameshift”. Comparando as mutações com os outros parâmetros clínicos, concluiu-se que alterações em *p53* devem ser originadas em um estágio inicial na carcinogênese mamária canina e mutações em *p53* podem estar relacionadas com a malignidade do tumor.

Palavras-chave: cão, oncogênese, mutação, tumor de mama, PCR, polimorfismo

MUTATIONAL ANALYSIS FROM EXONS 5 TO 8 WITHIN *p53* TUMOR SUPPRESSOR GENE IN CANINE MAMMARY NEOPLASMS

ABSTRACT – Aiming at the contribution for oncology's study and the improvement of survival time of bitches with mammary neoplasm, the purpose of this research is investigate the possible alterations in tumor suppressor gene *p53* in mammary neoplasm, relating then with age, breed, tumor histologic classification, neoplasm location (which mammary gland and if they are unique or multiples), progression time and neoplasm macroscopic characteristic (size and ulceration presence). Thirty canine mammary neoplasm patterns were evaluated. This material was distributed in five groups according to histologic classification of the tumor (adenoma, benign mixed tumor, carcinoma, malignant mixed tumor and sarcoma). The Control Group included five mammary tissue patterns with no pathological alterations. Possible mutations at 5 to 8 exons within *p53* gene was analyzed by the PCR technique ("Polymerase Chain Reaction") and sequencing. Five mutations were observed in malignant mammary neoplasm and one mutation in benign neoplasm. About these mutations, all were missense and three of them were frameshift. Comparing the mutations with the other clinical parameters, it was concluded that *p53* alterations must be started in an initial stage in canine mammary carcinogenesis and *p53* mutations can be related with the tumor malignancy.

Keywords: dog, oncogenesis, mutation, mammary tumor, PCR, polymorphism

1. INTRODUÇÃO

De todas as neoplasias em cadelas e mulheres, as neoplasias mamárias são as mais comuns. O câncer de mama é no mundo todo, incluindo o Brasil, um problema de saúde pública, sendo a primeira causa de morte por câncer em mulheres. Aproximadamente 70% dos tumores mamários caninos são considerados malignos. Devido a essa elevada incidência, seu estudo vem crescendo em relação às outras afecções.

Os genes supressores de tumor desempenham um papel fundamental na determinação da oncogênese mamária, e o aumento destes conhecimentos relacionados à biologia molecular, deverá permitir uma atuação melhor no campo da prevenção, diagnóstico, terapêutica e definição dos fatores prognósticos.

Mutações no gene supressor de tumor *p53* representam as mais freqüentes alterações genéticas em neoplasias humanas. A perda da função da *p53* durante a oncogênese, após dano do DNA, pode determinar a progressão inapropriada no ciclo celular e permitir a sobrevivência dessas células que, em condições normais, estariam destinadas a morrer. Neoplasias que possuem o gene *p53* íntegro têm um melhor prognóstico para resposta à quimioterapia e sobrevivência do que neoplasias com mutações em *p53*. No entanto, há pouca pesquisa sobre mutações no gene *p53* em neoplasias caninas.

O presente estudo teve como objetivo detectar possíveis mutações nos exons 5 a 8 do gene supressor de tumor *p53* em neoplasias mamárias caninas, correlacionando-as com a idade, a raça, o tipo histológico, número e localização da neoplasia, o tempo de progressão e a característica macroscópica (tamanho e presença de ulceração).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasia Mamária

As neoplasias mamárias em cadelas e mulheres são as mais comuns (BERGH et al., 1995; KITCHELL, 1995; BENJAMIN et al., 1999; INOUE & SHIRAMIZU, 1999; MISDORP, 2002; DE NARDI et al., 2002). A média de idade de acometimento é de sete a 12 anos, e são raras em cadelas com menos de cinco anos (SONNENSCHNEIN et al., 1991; KITCHELL, 1995; DE NARDI et al., 2002). As raças com maior predisposição são o Poodle, os Spaniels, English setter, Pointer, Fox terrier, Collie, Boxer, Boston terrier, Teckel e Labrador retrievers (KITCHELL, 1995; MISDORP, 2002).

Os tumores mamários caninos são hormônios dependentes e o risco de cadelas castradas desenvolverem neoplasias mamárias antes do primeiro estro é 0,05%, de 8% depois do primeiro estro, e depois do segundo estro o risco chega a 26% (SCHNEIDER et al., 1969; DALECK, 1996). A influência hormonal é comprovada pela presença de níveis elevados de receptores, tanto de estrógeno como de progesterona, identificados nesses tumores (SARTIN et al., 1992; LANA et al., 2007).

As neoplasias mamárias são caracterizadas clinicamente como nódulos solitários ou múltiplos (menos comum). Todas as mamas podem desenvolver um ou mais tumores benignos ou malignos. Aproximadamente 65 a 70% das neoplasias caninas ocorrem nos dois últimos pares de glândulas, provavelmente por causa do grande volume de tecido mamário nessas regiões (LANA et al., 2007).

Em muitos animais com tumores mamários benignos, como os adenomas, o tumor costuma ser pequeno, circunscrito e firme à palpação. As características de malignidade podem ser descritas por crescimento rápido da neoplasia, limites mal definidos, aderência na pele ou em tecidos vizinhos e ulceração ou inflamação (LANA et al., 2007).

A confirmação do diagnóstico inicia-se com a realização do exame físico. Radiografias torácicas nos planos lateral direito, lateral esquerdo e ventrodorsal devem ser realizadas antes da cirurgia para avaliar os pulmões para possível presença de metástase. A citologia aspirativa por agulha fina é válida para diagnosticar carcinoma inflamatório, mas o diagnóstico definitivo é realizado através da biópsia excisional e exame histopatológico (KNAPP et al., 2004).

Precisar o estágio clínico é importante para definir o tratamento e presumir o prognóstico. O estadiamento tem por objetivo avaliar o tumor primário e o linfonodo regional e tentar identificar qualquer metástase a distância. Os órgãos mais comuns de metástases são os pulmões e os linfonodos, mas também podem ocorrer no fígado, coração, rins, pele, cérebro e ossos (KITCHELL, 1995). É utilizado o sistema TNM (Tumor/Linfonodo/Metástase) de estadiamento clínico para cães, proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980).

Aproximadamente 70% dos tumores mamários em cadelas são considerados malignos (DE NARDI et al., 2002). Dentre os tumores benignos, o mais comum é o fibroadenoma ou tumor misto benigno, e dentre os tumores malignos, os mais comuns são os carcinomas simples (BOSTOCK, 1977; MISDORP, 2002). Sarcomas compreendem menos de 10-15% de todos os tumores mamários em cães (MISDORP, 2002) e são menos comuns que os carcinomas (KNAPP et al., 2004). A classificação histológica dos tumores pode ser visibilizada na Tabela 1.

Outra forma maligna é o carcinoma inflamatório. Essa neoplasia se desenvolve com extrema rapidez e invade os vasos linfáticos da pele, resultando em intenso edema e inflamação (PEÑA et al., 2003).

Tabela 1 – Classificação histológica dos tumores mamários caninos, segundo a Organização Mundial de Saúde (MISDORP et al., 1999).

Tumores Malignos	Tumores Benignos
Carcinoma <i>in situ</i>	Adenoma
Carcinoma complexo	Adenoma simples
Carcinoma simples	Adenoma complexo
Carcinoma túbulo-papilífero	Adenoma basalóide
Carcinoma sólido	Fibroadenoma
Carcinoma anaplásico	Fibroadenoma com baixa celularidade
Tipos especiais de carcinoma	Fibroadenoma com alta celularidade
Carcinoma de células fusiformes	Tumor misto benigno
Carcinoma de células escamosas	Papiloma ductal
Carcinoma mucinoso	
Carcinoma rico em lipídeos	
Sarcoma	
Fibrossarcoma	
Osteossarcoma	
Outros sarcomas	
Carcinossarcoma	
Carcinoma ou sarcoma em tumor benigno	

Cirurgia é o tratamento de escolha para todos os cães com neoplasias mamárias, com exceção de carcinomas inflamatórios ou metastáticos (BIRCHARD, 1995; KNAPP et al., 2004). Existe uma variedade de técnicas para remover os tumores mamários e a escolha é feita pelo tamanho, aderência em tecidos vizinhos e número de lesões. As cirurgias são classificadas em Lumpectomia ou Nodulesctomia, Mamectomia, Mastectomia Regional e Mastectomia Unilateral ou Bilateral (LANA et al., 2007).

Segundo GRAHAM e MYERS (1999), após um ano da intervenção cirúrgica, 48% dos cães morrem ou são eutanasiados por causa de recidivas ou metástases. Outro estudo relata que 55% dos cães morreram de câncer mamário após intervenção cirúrgica (SARTIN et al., 1992). O prognóstico para as

neoplasias mamárias caninas é variável. A média de sobrevida após a excisão cirúrgica do carcinoma mamário foi de 7 a 16 meses. O prognóstico é particularmente desfavorável para o sarcoma e o carcinoma inflamatório (KNAPP et al., 2004). Apesar da crescente investigação clinicopatológica, pouco se sabe sobre o prognóstico dos tumores mamários caninos (BENJAMIN et al., 1999). Com base nesses resultados, a quimioterapia antineoplásica pode ser usada como terapia adjuvante à intervenção cirúrgica de rotina (SARTIN et al., 1992). Contudo, são necessários estudos adicionais para determinar os agentes quimioterápicos mais apropriados (LANA et al., 2007).

2.2 Oncogênese Mamária

A oncogênese resulta do desequilíbrio entre o número de células que são geradas pela divisão celular e aquelas que são eliminadas pelo processo de morte celular programada (apoptose). Para existir harmonia nesse balanço, deve haver um equilíbrio das forças que controlam positivamente e daquelas que regulam negativamente. Há também um terceiro grupo importante, os genes de reparo, cuja alteração determina, em parte, a mutabilidade do genoma ou a sua instabilidade (LOPES et al., 1999). Porém, os mecanismos da oncogênese mamária canina ainda não estão muito bem entendidos (INOUE & SHIRAMIZU, 1999).

Os proto-oncogenes geralmente estão envolvidos na regulação positiva da proliferação celular e quando mutados são chamados oncogenes (SILVA, 2004). Mutações em proto-oncogenes estão freqüentemente associadas a um ganho de função, sendo necessária apenas uma alteração em um dos dois alelos da célula para a manifestação do fenótipo alterado (CAMARGO et al., 1998).

Os genes supressores de tumor, ao contrário dos proto-oncogenes, atuam restringindo a proliferação celular e a inativação desses genes está associada a uma perda de função. Para ocorrer mutação em gene supressor de tumor, há necessidade de inativação dos dois alelos para a manifestação do fenótipo mutado. Nesse caso, o primeiro alelo é geralmente inativado por mutação gênica e

o segundo alelo é perdido por deleção cromossômica envolvendo a região na qual o gene em questão está localizado (perda de heterozigose) (CAMARGO et al., 1998).

O oncogene, o gene supressor de tumor afetado por mutação e o tipo de mutação envolvido variam de acordo com o tipo de tumor. Mutações germinativas relacionadas ao câncer são detectadas com maior frequência em genes supressores de tumor do que em proto-oncogenes, isso porque mutações em proto-oncogenes geralmente têm efeito dominante sobre a carcinogênese, sendo extremamente letais. Considerando a necessidade de inativação dos dois alelos para que haja o desenvolvimento da neoplasia, indivíduos com mutações germinativas em genes supressores de tumor apresentam maior probabilidade de desenvolver neoplasias e geralmente o fazem mais precocemente, uma vez que uma das mutações é herdada e basta a ocorrência de um único evento mutacional (que inativa o alelo normal) para que haja o início de um processo carcinogênico (CAMARGO et al., 1998). O indivíduo que herda de um dos pais um gene defeituoso apresentará essa alteração em um dos alelos em todas as células do organismo. Como a mutação herdada é de origem germinativa, leva a uma maior incidência de outros tipos de tumores em outros sítios (LOPES et al., 1999).

2.3 Gene Supressor de Tumor *p53*

O gene supressor de tumor *p53* monitora a integridade do DNA sendo chamado de “guardião do genoma” (LANE, 1992). A função do *p53* é bloquear a divisão celular, caso seja detectado pela célula algum dano no material genético. Esta pausa no ciclo celular permite que a célula utilize mecanismos de reparo para que o erro seja corrigido, bloqueando a transcrição da fase G1 para fase S e não permitindo a sua propagação para as células-filhas. Caso esta tentativa de reparo não obtenha sucesso, a *p53* conduz a célula para o processo de apoptose (LOPES et al., 1999; SILVA, 2004).

A perda da função da *p53* durante a oncogênese, após dano do DNA, pode determinar a progressão inapropriada no ciclo celular e permitir a sobrevivência

dessas células que, em condições normais, estariam destinadas a morrer (LOPES et al., 1999). Células cancerígenas com mutações em *p53* entram na fase S, duplicam o dano no DNA e separam os cromossomos anormalmente (LEVINE et al., 1994).

A mutação do gene *p53* têm sido relatada na patogênese de numerosas neoplasias humanas e caninas (LEE & KWEON, 2002). Esse gene é o que mais se apresenta alterado em câncer humano e encontra-se mutado em aproximadamente 50% das neoplasias (LOPES et al., 1999; SILVA, 2004; LANA et al., 2007). Acredita-se que em parte dos 50% restantes a via de sinalização da *p53* esteja comprometida por outros mecanismos (SILVA, 2004). Essas mutações são consideradas um importante indicador de pobre prognóstico e curta taxa de sobrevida (BERGH et al., 1995; ELLEDGE & ALLRED, 1998). Algumas vezes, as mutações podem ocorrer num estágio inicial do desenvolvimento tumoral, podendo indicar uma grande propensão da lesão progredir, apesar de serem necessários mais estudos para tal discussão (LEE & KWEON, 2002). A expressão do gene *p53* é ativada em resposta a um dano do DNA, causado por diferentes agentes mutagênicos como a luz ultravioleta, radiação ionizante e carcinógenos químicos (KASTAN et al., 1991; SILVA, 2004).

Nos cães, mutações no gene *p53* já foram relatadas em linfossarcoma (VELDHOEN et al., 1998), papiloma oral (MAYR et al., 1994), tumor colo-retal epitelial (WOLF et al., 1997), carcinoma de células escamosas (TEIFKE & LÖHR, 1996), osteossarcoma (SAGARTZ et al., 1996; JOHNSON et al., 1998; LEVINE & FLEICHLI, 2000) adenoma de glândula perianal (MAYR et al., 1997), carcinoma de tiróide (DEVILEE et al., 1994), melanoma (ROELS et al., 2001; KOENIG et al., 2002) e tumor venéreo transmissível (CHOI & KIM, 2002). São raras as mutações nos exons 5 a 8 do gene *p53* em hemangiopericitoma, mastocitoma, histiocitoma e sarcoma granulocítico (MAYR et al., 1999).

A análise do perfil de mutações do gene *p53* em humanos em diferentes tipos de tumores tem sido amplamente utilizada para estabelecer correlações epidemiológicas com agentes mutagênicos. Mutações do tipo transversões na

base guanina para timina são características da atuação de agentes carcinógenos externos presentes no fumo e no álcool e freqüentemente encontrados no gene *p53* em tumores de pulmão, fígado, cabeça e pescoço. Já nos tumores de pele, o tipo de mutação encontrado com maior freqüência no gene *p53* é a transição de duas citosinas para duas timinas, a qual é reconhecidamente causada por lesões no DNA induzidas pela radiação ultravioleta (CAMARGO et al., 1999).

Estudos sobre alterações no gene *p53* em tumores mamários caninos demonstram que mutações podem estar envolvidas no desenvolvimento desses tumores e contribuírem para a definição do prognóstico (MAYR et al., 1998; LEE & KWEON, 2002). Alguns estudos que analisaram mutações no gene *p53* em neoplasias caninas detectaram mutações pontuais, inserções e deleções, igualmente demonstrados por estudos em neoplasias humanas (DEVILEE et al., 1994; MAYR et al., 1994; MAYR et al., 1997; CHU et al., 1998; MAYR et al., 1998; VELDHOEN et al., 1998). Outros estudos afirmam que a maioria das mutações no *p53* é do tipo “missense”, em cães e em humanos (DEVILEE et al., 1994; LEE & KWEON, 2002; SILVA, 2004). Também foram identificadas mutações “nonsense”, “splicing” e “frameshift” nos exons 4 a 7 do gene *p53* em neoplasias mamárias caninas (CHU et al., 1998). Não foi detectada nenhuma alteração na região do exon 1 no *p53* (MAYR et al., 2000b), sendo que a maioria das mutações foram encontradas nos exons 5 a 8 (MAYR et al., 1993; LEVINE et al., 1994; GREENBLATT et al., 1994; VAN LEEUWEN et al., 1996; HAINAUT et al., 1998; VELDHOEN et al., 1998; MAYR et al., 1999; MAYR et al., 2000a). A análise dos exons 4 e 10 é justificada quando mutações nos exons 5 a 8 não são encontradas (GREENBLATT et al., 1994). Todos esses estudos indicam que a mutação no gene *p53* está associada à progressão do tumor (LEE & KWEON, 2002) e mostram aumento no potencial de malignidade e piora do prognóstico (MUTO et al., 2000; LEE et al., 2004). Na maioria dos estudos sobre câncer de mama humano observa-se que tanto o período pré-recidiva como o período de sobrevida estão significativamente reduzidos naqueles pacientes que apresentam mutações no gene *p53* (SILVA, 2004).

As alterações no *p53* podem resultar no início da carcinogênese mamária canina e foram detectadas mutações não só em carcinomas mamários, mas também em tumores benignos de mama. No entanto, não há evidência de qualquer relação entre alterações no *p53*, os tipos histológicos dos tumores, ou entre as raças dos cães (MUTO et al., 2000). As mutações genéticas tendem a acumular-se com o aumento da idade, enquanto o reparo do DNA se torna menos eficiente, aumentando a suscetibilidade às neoplasias (SUEIRO et al., 2004).

2.4 Métodos Moleculares Aplicados à Oncologia

A oncologia molecular oferece, atualmente, diversas metodologias para o aprimoramento do diagnóstico, monitoramento e prognóstico do câncer (SEUÁNEZ et al., 2004). A principal técnica desenvolvida foi a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), criada em 1983 por Kary Mullis. Este método consiste na amplificação *in vitro* de um trecho específico do genoma (BARTLETT & STIRLING, 2003). Para a realização da técnica de PCR são necessários vários reagentes que, após serem misturados, são submetidos a ciclos com variação de temperatura e com repetições que variam de 25 a 35 vezes (Tabela 2). Cada ciclo se divide em três fases: desnaturação (separação da dupla fita de DNA), anelamento (pareamento do “primer” à fita molde de DNA) e extensão (síntese da nova fita) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001; SEUÁNEZ et al., 2004).

Após obter uma grande quantidade do fragmento desejado, podem-se utilizar outros métodos para procurar mutações como, por exemplo, o Seqüenciamento. A metodologia mais comum para seqüenciamento de DNA foi estabelecida por Frederick Sanger e colaboradores, em 1977. Essa técnica baseia-se na inibição da síntese de uma molécula de DNA a partir de um DNA molde (que normalmente é o produto de PCR), não permitindo que a DNA polimerase continue a extensão incorporando novos nucleotídeos. A reação de seqüenciamento é semelhante à técnica de PCR, com exceção do uso dos quatro dideoxirribonucleotídeos (ddNTP). O ddNTP, ao contrário do dNTP, não possui o radical hidroxila no carbono 3 da desoxirribose, não permitindo que a enzima

polimerase continue incorporando nucleotídeos à fita molde. Cada ddNTP está marcado com um fluorocromo de cor diferente, sendo captado pelo aparelho. Outra diferença da técnica de PCR é que é utilizado apenas um “primer” por vez, pareando apenas uma das extremidades do DNA molde (STIRLING, 2003; SEUÁNEZ et al., 2004).

Tabela 2 – Componentes essenciais para realização da técnica de PCR (baseado em SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Reagente	Função
Enzima DNA polimerase	Enzima responsável pela síntese da nova cadeia. A DNA polimerase mais utilizada é a <i>Taq</i> DNA polimerase, isolada do microorganismo <i>Thermophilus aquaticus</i> (bactéria que habita fontes termais e, portanto, resistente à temperaturas elevadas).
Os quatro desoxirribonucleotídeos (dNTP)	Monômeros de moléculas de DNA necessários para a construção da nova cadeia de DNA.
Um par de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)	Pequenas moléculas de DNA em fita simples contendo de 20 a 30 nucleotídeos, complementares a uma região específica do DNA molde. São utilizados dois “primers” diferentes que pareiam em sítios complementares, flanqueando a região de interesse.
DNA genômico	É o DNA molde, que vai ser amplificado.
Cátion bivalente	O mais usual é o Mg^{2+} . Necessário para a atuação da DNA polimerase.
Cátion monovalente	Já é padronizado que o tampão de PCR contém KCl.
Tampão	Para manter o pH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção dos Pacientes

Foram avaliadas 30 cadelas com diagnóstico de neoplasia mamária, de diferentes idades e raças, atendidas no Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) – câmpus de Jaboticabal.

A avaliação clínica dos animais realizou-se mediante exame físico, exames radiográficos de tórax para detecção de possíveis metástases pulmonares, hemograma (realizado em contador automático de células Coulter ACT-8), mensuração da atividade sérica de alanina amino transferase (ALT; método cinético UV) e do teor sérico de creatinina (método de Basques-Lustosa) e exame citológico do nódulo mamário submetido à aspiração por agulha fina. As análises laboratoriais foram efetuadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto”, da mesma Instituição.

Os pacientes foram classificados quanto à idade, raça, diagnóstico histopatológico, número e localização da neoplasia, tempo de progressão e característica macroscópica (tamanho e presença de úlcera). O tumor foi medido com auxílio de paquímetro, graduando o diâmetro do nódulo em centímetros.

Ainda nesta pesquisa foram considerados espécimes de glândulas mamárias sem alterações patológicas de cinco cadelas entre sete e 10 anos de idade, sem raça definida e clinicamente sadias, provenientes do Canil Municipal de Sertãozinho – São Paulo, constituindo o grupo controle.

3.2 Coleta e Armazenamento das Amostras

Os animais foram submetidos à mastectomia regional ou radical unilateral de acordo com a localização do(s) nódulo(s) para exérese do(s) mesmo(s). Os nódulos foram divididos em duas partes. A primeira metade foi armazenada em tubos tipo “ependorf” com capacidade para 2,0 mL e mantidos em freezer à temperatura de -24°C, para extração do DNA. A outra metade foi fixada em

formalina 10% para realização de exame histopatológico, conforme a rotina do Departamento de Patologia Veterinária (FCAV/UNESP).

3.3 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de parte do nódulo congelado como discutido no item 3.2. O protocolo utilizado baseou-se no citado por PEARSON e STIRLING (2003) e se encontra no Apêndice A.

Após a extração, realizou-se eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE 1X (Tris-HCL 89mM; EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM, pH 8,3), corado com brometo de etídeo (0,05 µg/mL). Aplicou-se 2,0 µL de DNA genômico diluídos em 3,0 µL de tampão de corrida (Tris-HCL 0,1 M, pH 6,8; azul de bromofenol 0,02%; glicerol 50%) durante aproximadamente uma hora em tensão de 100V. As bandas visibilizadas nos géis foram fotodocumentadas em aparelho Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) para análise da integridade do DNA extraído.

As amostras que apresentavam RNA foram tratadas com RNase (Ribonuclease A - Sigma[®]) para melhorar a qualidade do DNA e realizar quantificação mais fidedigna pelo espectrofotômetro.

Amostras diluídas na proporção de 2,0 µL de DNA em 98 µL de água foram quantificadas em espectrofotômetro Beckman-DU[®], que permite estimar a pureza do DNA pela razão entre leituras de absorbâncias feitas a 260 e 280nm (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). A partir dessa quantificação, as amostras foram diluídas para concentração de 100 ng/µL em tampão TE (100mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM de EDTA pH 8,0) e estocadas a -24°C até o momento da realização da técnica de PCR.

3.4 Técnica de PCR

Foi realizada técnica de PCR para amplificação dos exons 5 a 8, com os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) baseados no descrito por Chu et al. (1998) (Tabela 3).

Tabela 3 – Seqüências dos pares de “primers” utilizados para amplificação dos exons 5 a 8 do gene *p53*.

Par de “primers”	Seqüência de bases
P5 “foward”	5’ GACCTGTCCATCTGTCCT 3’
P5 “reverse”	5’ GCCTTGTCCCATCTGTAG 3’
P6 “foward”	5’ TGATTCTCCCGATGGC 3’
P6 “reverse”	5’ AGACCCCTCAGATGCCAA 3’
P7 “foward”	5’ ACCCTGGGCCTACCTTCTA 3’
P7 “reverse”	5’ AGGGTGGCAGGCAGGTC 3’
P8 “foward”	5’ GCTTCTCTTCTCACCTG 3’
P8 “reverse”	5’ CTCCTTACCTCCTTGT 3’

Foram misturados 10 pM de cada “primer” (Operon) com aproximadamente 100 ng do DNA genômico, 2 mM de Sulfato de Magnésio (Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1 U de *Taq* DNA Polimerase “high fidelity” (Invitrogen) e 1X PCR “buffer” (Invitrogen), num volume final de 25 µL. O programa da PCR foi realizado em termociclador (T1 Thermoblock – Biometra® e ATC 201® – Nyxtechnik) e constituiu-se de 40 ciclos (Tabela 4).

Tabela 4 – Programa da técnica de PCR utilizado.

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	5 minutos
2	95°C	1 minuto
3	x°C	30 segundos
4	72°C	1 minuto
5	72°C	5 minutos
6	4°C	∞

x: temperatura de anelamento do “primer”

passos 2 a 4 são repetidos 40 vezes

∞: tempo infinito (para armazenar)

As amostras foram purificadas por um protocolo a base das enzimas Exonuclease I (EXO - USB[®]) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP - USB[®]). Misturou-se 5,0 µL de PCR + 0,5 µL de EXO (10 U/µL) + 1,0 µL de SAP (1U/µL) + 0,5 µL do Tampão de diluição da SAP + 3,0 µL de Água MilliQ, para um total de 10 µL de reação.

O produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE 1X (Tris-HCL 89mM; EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM, pH 8,3), corado com brometo de etídeo (0,05 µg/mL), aplicando-se 2,0 µL de cada produto amplificado e 2,0 µL de tampão de corrida (Tris-HCL 0,1 M, pH 6,8; azul de bromofenol 0,02%; glicerol 50%) durante aproximadamente uma hora em tensão de 100V e posteriormente visibilizados e fotodocumentados em aparelho GELDOC 2000 (BioRad).

As amostras após purificação e eletroforese foram armazenadas em geladeira (4°C).

3.5 Seqüenciamento e Análise dos Resultados

Para verificar as possíveis ocorrências de mutações no gene em estudo, foi realizado o seqüenciamento dos produtos amplificados com os “primers” P5F, P5R, P6F, P6R, P7F, P7R, P8F e P8R (Tabela 3).

A reação foi elaborada em um volume de 10 µL consistindo de: 3 µL de tampão 5X (400 mMol/L Tris-HCl, pH 9,0; 10 mMol/L MgCl₂), 0,25 µL de Dynamic Terminator (GE), 0,5 µL de cada “primer” (10 pmol/µL), 10 ng do fragmento de DNA e água Milli-Q estéril. As amostras foram levadas ao termociclador, utilizando-se o mesmo programa adotado para a técnica de PCR (Tabela 2).

Após a técnica de PCR, as amostras foram submetidas ao seqüenciamento automático de DNA utilizando o aparelho ABI 3700 DNA Analyzer-Applied Biosystems, em sistema capilar.

As seqüências obtidas foram analisadas pelo “Sequencing Analysis 3.4”, e a montagem das seqüências, verificação da qualidade das bases dos cromatogramas e arquivos gerados no formato FASTA, foram realizados pelo

pacote de programas “Phred/Phrap/Consed”. A tradução de seqüência DNA/proteína foi realizada pela ferramenta de tradução “Swiss-Prot” (<http://br.expasy.org/tools/dna.html>). O programa de alinhamento Clustal W (<http://clustalw.genome.ad.jp>) foi utilizado para comparar as seqüências geradas neste experimento com as depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

4. RESULTADOS

4.1 Idade

A ocorrência de tumores de mama de acordo com a idade, dos 30 animais estudados, variou de quatro a 15 anos ($10 \pm 2,75$) (Figura 1).

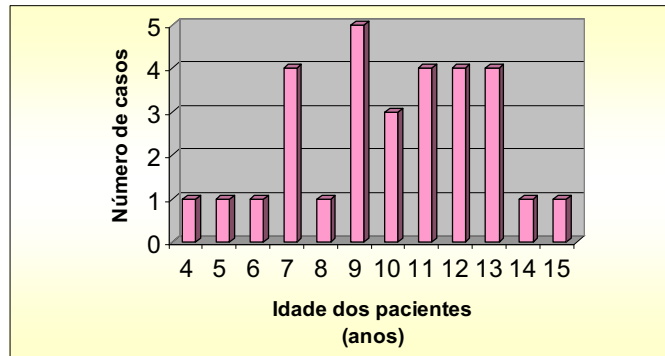


Figura 1 – Representação gráfica da ocorrência de tumores de mama de acordo com a idade em cadelas atendidas no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.

4.2 Raça

Verificou-se maior incidência de neoplasias mamárias em cães sem raça definida (31%), seguidas por aqueles da raça Poodle (24%), Husky siberiano (8%) e Teckel (7%) (Figura 2). A alta taxa de incidência dos tumores mamários em cadelas sem raça definida pode ser explicada pelo fato dos atendimentos ocorrerem em hospital-escola. Normalmente, a maior procura desse tipo de atendimento é por proprietários de animais carentes, pois os serviços são mais baratos quando comparados às clínicas particulares.

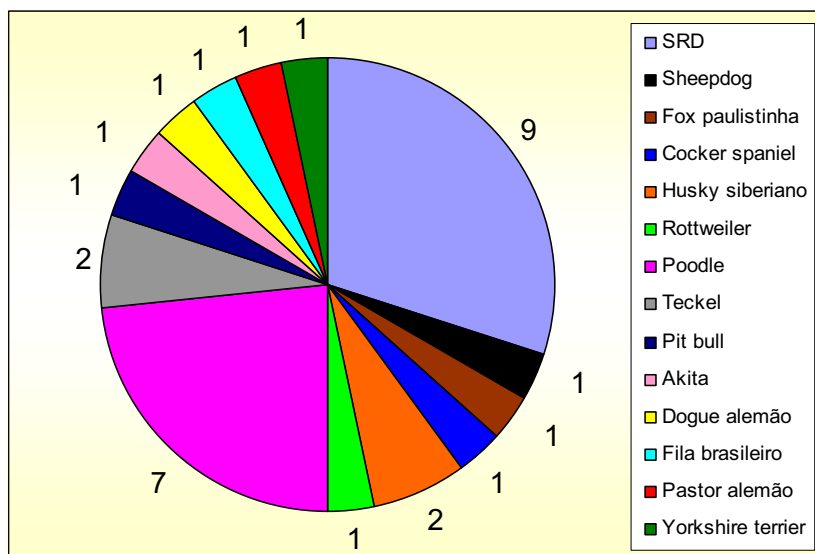


Figura 2 - Representação gráfica da incidência de neoplasias mamárias distribuídas conforme a raça, em cadelas atendidas no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel".

4.3 Tipo Histológico

Nota-se uma maior incidência de neoplasias malignas (76%) em relação às benignas (24%) (Figura 3).

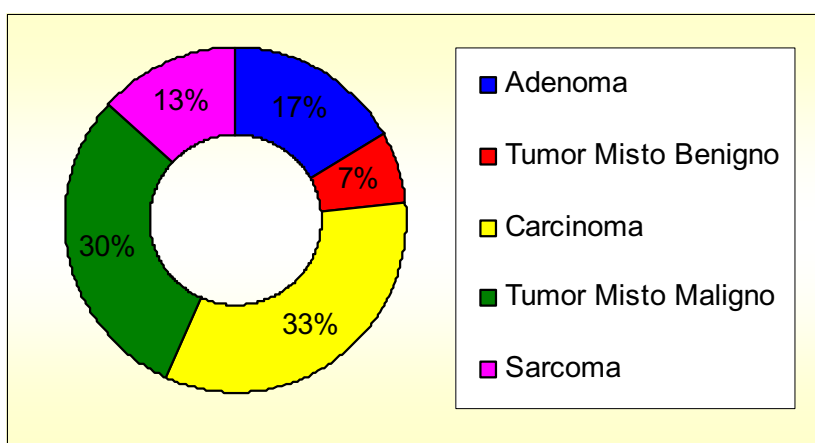


Figura 3 – Representação gráfica da incidência de tumores de mama de acordo com o tipo histológico de cadelas atendidas no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel".

4.4 Localização da Neoplasia

4.4.1 Glândula Mamária Acometida e Número de Glândulas Mamárias Acometidas

Observou-se que a glândula mais acometida foi a mama inguinal (62%), quando comparada às outras glândulas (Figura 4).

As neoplasias mamárias acometeram preferencialmente múltiplas glândulas (87% dos casos) (Figura 5).

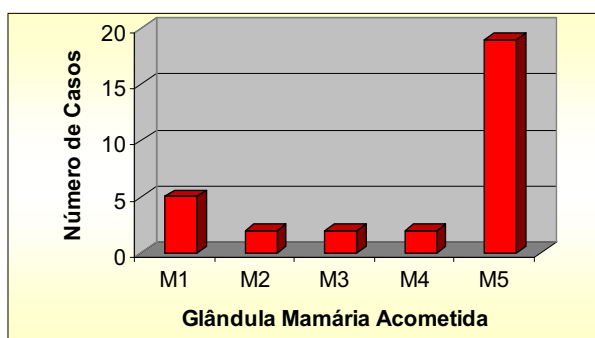


Figura 4 – Representação gráfica da incidência de tumores de mama de acordo com a glândula mamária acometida de cadelas atendidas no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, onde M1= Mama Torácica Cranial, M2= Mama Torácica Caudal, M3= Mama Abdominal Cranial, M4= Mama Abdominal Caudal, M5= Mama Inguinal.

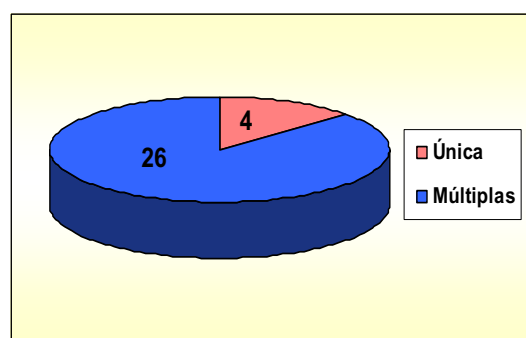


Figura 5 – Representação gráfica do número de glândulas acometidas por neoplasias mamárias em relação a cada cadela atendida no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.

4.5 Tempo de Progressão

O tempo de progressão das neoplasias mamárias atendidas variou de 1 a 192 semanas (Figura 6).

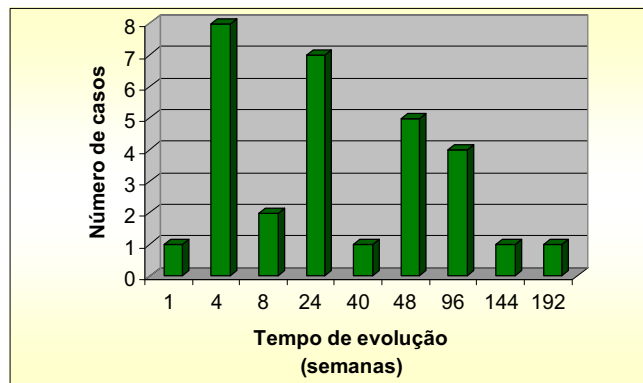


Figura 6 – Representação gráfica do tempo de progressão das neoplasias mamárias, em semanas, das cadelas atendidas no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.

4.6 Características Macroscópicas da Neoplasia

4.6.1 Tamanho da Neoplasia e Presença de Ulceração

Para melhor visibilização, as neoplasias foram separadas em três grupos: tumores pequenos (0,2 a 2 cm), médios (3 a 6 cm) e grandes (7 a 30 cm). A incidência maior foi de tumores médios (43,3%), quando comparados aos pequenos (26,7%) e grandes (30%) (Figura 7).

A maioria das neoplasias mamárias não apresentava ulceração (83%) (Figura 8).

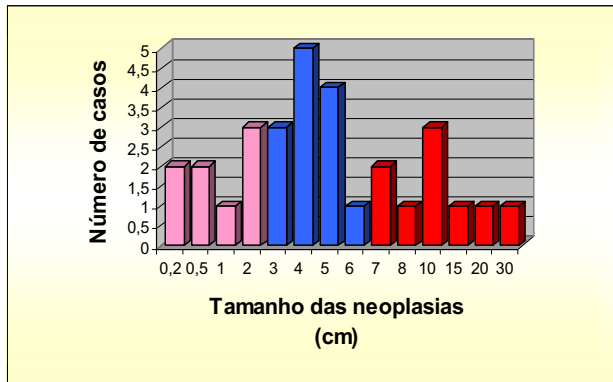


Figura 7 – Representação gráfica da comparação do tamanho das neoplasias mamárias em relação ao número de casos atendidos no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.

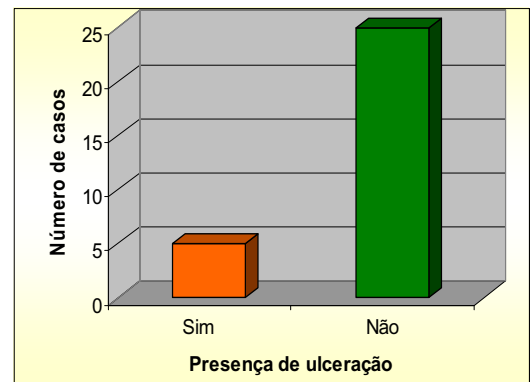


Figura 8 – Representação gráfica da presença de ulceração das neoplasias mamárias nas cadelas atendidas no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.

4.7 Extração de DNA Genômico

Foi realizada a extração de DNA genômico de todas as 30 amostras de neoplasias mamárias e das cinco amostras do grupo controle (Figuras 9 e 10).

As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em um aparelho Eppendorf BioPhotometer®, onde 2 μL das amostras eram diluídos em 98 μL de água MiliQ. O grau de pureza do DNA apresentou razão de leituras de absorvância (A260/A280) variando de 1,50 a 1,70 e a concentração média de DNA obtida foi de 667 ng/ μL . Após a quantificação, o DNA foi diluído em água buscando-se obter uma solução de uso de aproximadamente 20 ng/ μL .

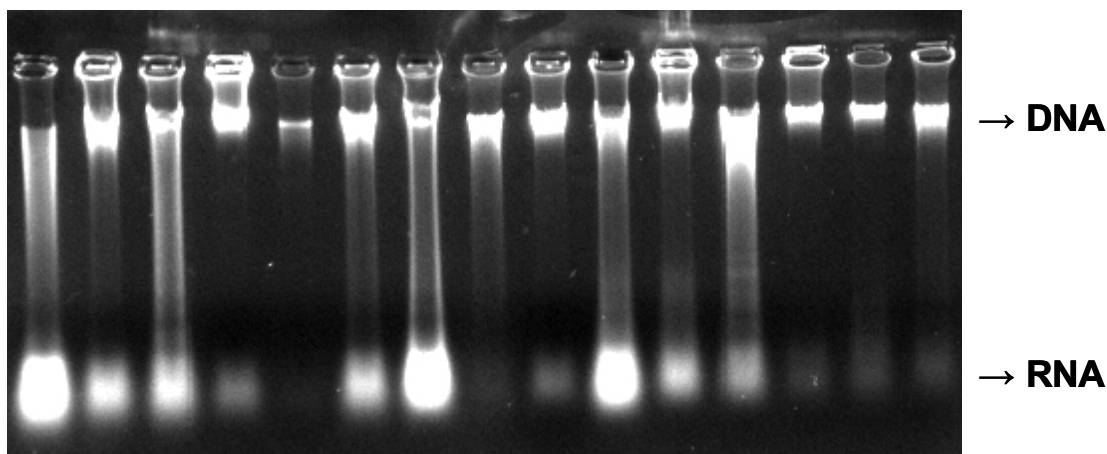


Figura 9 – Eletroferograma de algumas amostras, evidenciando a qualidade do DNA extraído pelo método fenol:clorofórmio.

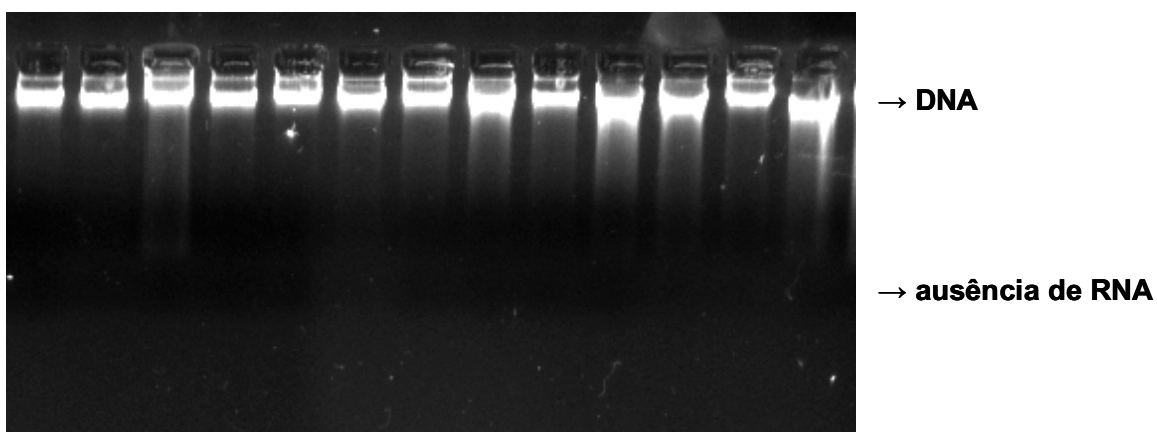


Figura 10 – Eletroferograma de algumas amostras de DNA extraído tratado com RNase.

4.8 Técnica de PCR

Para a amplificação dos quatro fragmentos foi necessário otimizar a técnica de PCR. Nesse processo, a temperatura de anelamento dos “primers” foi detectada por meio de um gradiente de temperatura em termociclador (ATC 401 – Apollo Instrumentation[®]) e, posteriormente, o número de ciclos foi ajustado para evitar a formação de bandas inespecíficas. Depois de determinadas as condições ideais da reação, os fragmentos foram amplificados normalmente e posteriormente purificados (Tabela 5 e Figuras 11, 12, 13 e 14).

Tabela 5 – Condições de amplificação para cada “primer” e o produto de PCR gerado para cada exon analisado do gene *p53*.

Par de “primer”	Fragmento Amplificado	Temperatura de Anelamento	Produto de PCR gerado (pb)
P5F e P5R	Exon 5	60,5°C	273
P6F e P6R	Exon 6	62°C	162
P7F e P7R	Exon 7	63°C	144
P8F e P8R	Exon 8	62°C	193

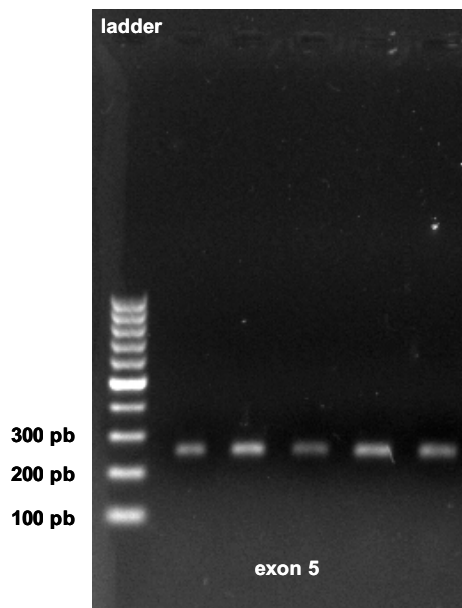


Figura 11 – Eletroferograma de confirmação de alguns produtos amplificados do exon 5 do gene *p53*, mostrando o padrão de migração do fragmento de 273 pb em gel de agarose (1%), com marcador GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas).

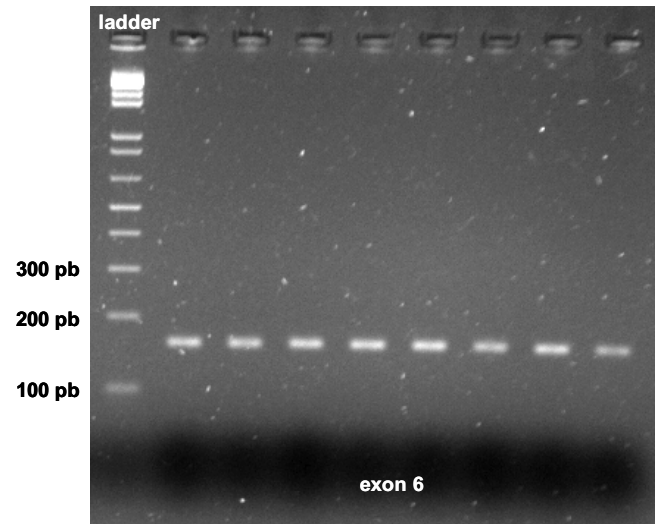


Figura 12 – Eletroferograma de confirmação de alguns produtos amplificados do exon 6 do gene *p53*, mostrando o padrão de migração do fragmento de 162 pb em gel de agarose (1%), com marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

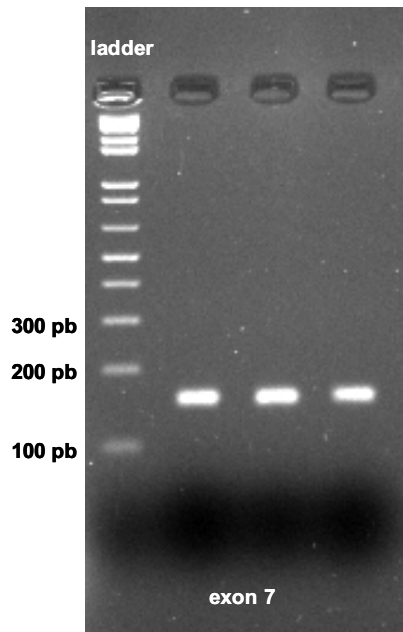


Figura 13 – Eletroferograma de confirmação de alguns produtos amplificados do exon 7 do gene *p53*, mostrando o padrão de migração do fragmento de 144 pb em gel de agarose (1%), com marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

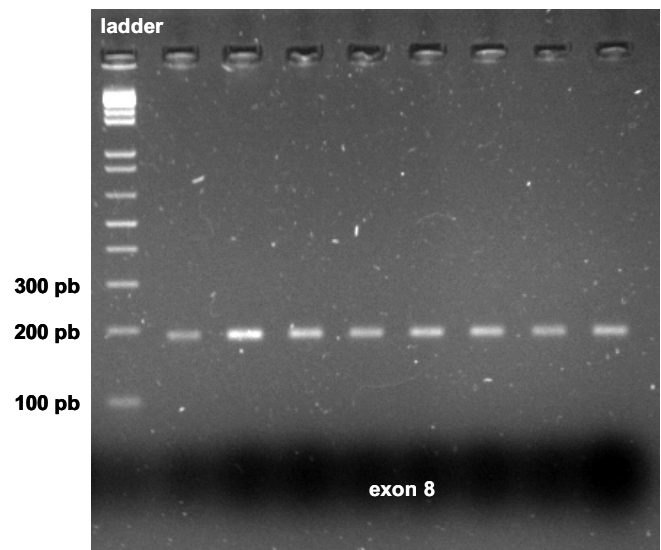


Figura 14 – Eletroferograma de confirmação de alguns produtos amplificados do exon 8 do gene *p53*, mostrando o padrão de migração do fragmento de 193 pb em gel de agarose (1%), com marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4.9 Seqüenciamento

4.9.1 Seqüenciamento do Grupo Controle

Foi realizado um consenso entre os cinco controles para cada exon, e a seqüência-consenso foi analisada com a seqüência normal (Chu et al., 1998). Para melhor visualização, as seqüências foram alinhadas no programa Clustal W 1.83 (<http://align.genome.jp/>) (Figuras 15, 16, 17, 18).

Houve uma transição T:C no códon 156 (exon 5) em todas as seqüências do grupo controle (Figura 15). A mutação pode ser classificada como silenciosa, pois não ocorreu alteração do aminoácido (Figura 19).

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

P5      TACTCCCCTCTCCTCAACAAGTTGTTTTGCCAGCTGGCGAAGACCTGCCCCGTGCAGCTG
GC5     TACTCCCCTCTCCTCAACAAGTTGTTTTGCCAGCTGGCGAAGACCTGCCCCGTGCAGCTG
*****

P5      TGGGTCAGCTCCCCACCCACCCAATACCTGTGTCCGCGCTATGGCCATCTATAAGAAG
GC5     TGGGTCAGCTCCCCACCCACCCAATACCTGCGTCCGCGCTATGGCCATCTATAAGAAG
*****

P5      TCGGAGTTCGTGACCGAGGTTGTGCGGCGCTGCCCCACCATGAACGCTGCTCTGACAGT
GC5     TCGGAGTTCGTGACCGAGGTTGTGCGGCGCTGCCCCACCATGAACGCTGCTCTGACAGT
*****

P5      AGTGACG
GC5     AGTGACG
*****

```

Figura 15 – Alinhamento das seqüências de nucleotídeos correspondente ao exon 5 do gene *p53*, do grupo controle. A alteração do nucleotídeo está em destaque (sublinhada).

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

P6      GTCTTGCCCCCTCCTCAGCATCTCATCCGAGTGGAAGGAAATTTGCGGGCCAAGTACCTGG
GC6     GTCTTGCCCCCTCCTCAGCATCTCATCCGAGTGGAAGGAAATTTGCGGGCCAAGTACCTGG
*****

P6      ACGACAGAAACACTTTTCGACACAGTGTGGTGGTGCCTTATGAGCCACCCGAG
GC6     ACGACAGAAACACTTTTCGACACAGTGTGGTGGTGCCTTATGAGCCACCCGAG
*****

```

Figura 16 – Alinhamento das seqüências de nucleotídeos correspondente ao exon 6 do gene *p53*, do grupo controle.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

P7      GTTGGCTCTGACTATAACCACCATCCACTACAACATCATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGA
GC7     GTTGGCTCTGACTATAACCACCATCCACTACAACATCATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGA
*****

P7      GGCATGAACCGGCGGCCATCCTCACTATCATCACCCCTGGAAGACTCCAG
GC7     GGCATGAACCGGCGGCCATCCTCACTATCATCACCCCTGGAAGACTCCAG
*****

```

Figura 17 – Alinhamento das seqüências de nucleotídeos correspondente ao exon 7 do gene *p53*, do grupo controle.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

P8      TGGAAACGTGCTGGGACGCAACAGCTTTGAGGTACGCGTTTGTGCCTGTCCCGGGAGAGA
GC8     TGGAAACGTGCTGGGACGCAACAGCTTTGAGGTACGCGTTTGTGCCTGTCCCGGGAGAGA
*****

P8      CCGCCGACTGAGGAGGAGAATTTCCACAAGAAGGGGGAGCCTTGTCTGAGCCACCCC
GC8     CCGCCGACTGAGGAGGAGAATTTCCACAAGAAGGGGGAGCCTTGTCTGAGCCACCCC
*****

P8      CGGGAGTACCAAGCGAG
GC8     CGGGAGTACCAAGCGAG
*****

```

Figura 18 – Alinhamento das seqüências de nucleotídeos correspondente ao exon 8 do gene *p53*, do grupo controle.

Cys
156
 ...TGT...
 ↓
Cys
156
 ...TGC...

Figura 19 – Representação esquemática evidenciando o ponto de mutação no códon 156 (exon 5) do gene *p53* (grupo controle), sem alteração do aminoácido cisteína.

4.9.2 Seqüenciamento do Exon 5

Ocorreu uma transição T:C no códon 156 (exon 5) em todas as seqüências do grupo controle e das amostras tumorais (Figura 15). A mutação pode ser classificada como silenciosa, pois não ocorreu alteração do aminoácido (Figura 19). Como já citado no item 4.9.1, essa alteração ocorreu em todas as cadelas do grupo controle e considerou-se como seqüência normal o códon TGC, e não o códon TGT citado por Chu et al., 1998.

Observou-se alteração (Inserção de C) no códon 132 em três amostras (cadelas 15, 22 e 70). Como houve alteração no aminoácido, essa mutação foi

classificada como “missense” (Figura 20). A inserção foi de apenas um aminoácido, ocorrendo, portanto, alteração em toda a seqüência do gene. Devido a esses extensivos “missense” códons, essa mutação foi classificada como “frameshift”.

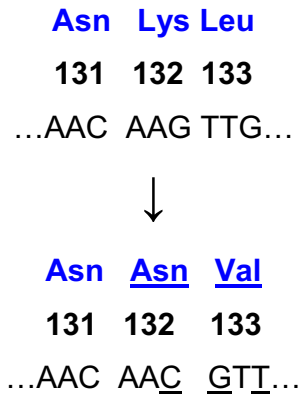


Figura 20 – Representação esquemática evidenciando o ponto de mutação no códon 132 (exon 5) do gene *p53*, com alteração do aminoácido lisina para asparagina e a conseqüente mutação “frameshift”.

Na cadeia 59 evidenciou-se transversão C:G no códon 148. Como ocorreu alteração do aminoácido, a mutação foi classificada como “missense” (Figura 21).



Figura 21 – Representação esquemática evidenciando o ponto de mutação no códon 148 (exon 5) do gene *p53*, com alteração do aminoácido serina para treonina.

4.9.3 Seqüenciamento do Exon 6

Não foi encontrada nenhuma mutação no exon 6.

4.9.4 Seqüenciamento do Exon 7

No códon 253 observou-se uma transversão T:A (cadeia 65), com alteração de aminoácido (mutação “missense”) (Figura 22).

Thr
253
...ACT...
↓
Ser
253
...ICT...

Figura 22 – Representação esquemática evidenciando o ponto de mutação no códon 253 (exon 7) do gene *p53*, com alteração do aminoácido treonina para serina.

4.9.5 Seqüenciamento do Exon 8

Foi encontrada uma transversão C:G no códon 285, na cadeia 34. Como houve uma alteração de aminoácido, a mutação foi classificada como “missense” (Figura 23).



Figura 23 – Esquema evidenciando o ponto de mutação no códon 285 (exon 8) do gene *p53*, com alteração do aminoácido ácido glutamínico para ácido aspártico.

O resultado das amostras e a comparação das mutações (localização e tipo) com o tipo histológico do tumor podem ser observados respectivamente nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Parâmetros analisados por cadelas.

C	Idade (anos)	Raça	Tipo Histológico	Mama	Única/ Múltipla	TP (semanas)	Tamanho (cm)	PU	Mutações
9	5	Sheepdog	Carcinoma	M5	M	4	3	Não	Ausente
14	11	SRD	Carcinoma	M5	M	40	1	Não	Ausente
15	10	SRD	Misto Maligno	M5	M	192	5	Não	E5-C132-"missense"(F)
22	11	Fox paulistinha	Misto Maligno	M5	M	24	3	Não	E5-C132-"missense"(F)
25	11	Cocker spaniel	Misto Maligno	M5	M	96	4	Não	Ausente
26	15	SRD	Misto Maligno	M3	M	96	4	Não	Ausente
28	12	Husky siberiano	Adenoma	M5	M	4	10	Não	Ausente
31	12	Husky siberiano	Misto Maligno	M1	M	4	7	Não	Ausente
34	9	Rottweiler	Misto Maligno	M5	M	24	6	Sim	E8-C285-"missense"

continua...

...continuação

36	9	Poodle	Misto Benigno	M5	M	4	0,5	Não	Ausente
37	8	SRD	Adenoma	M1	U	8	5	Não	Ausente
41	12	Poodle	Misto Benigno	M5	M	144	8	Não	Ausente
52	9	Teckel	Carcinoma	M5	M	48	2	Não	Ausente
53	6	Pitbull	Carcinoma	M5	M	96	10	Sim	Ausente
55	7	Poodle	Adenoma	M5	M	96	2	Não	Ausente
56	12	SRD	Carcinoma	M5	M	48	10	Sim	Ausente
57	13	SRD	Sarcoma	M5	M	48	3	Sim	Ausente
58	13	Poodle	Misto Maligno	M5	M	48	4	Não	Ausente

continua...

...continuação

59	4	Poodle	Adenoma	M5	M	1	0,2	Não	E5-C148-"missense"
60	10	Akita	Sarcoma	M5	M	24	20	Não	Ausente
61	9	Dogue alemão	Misto Maligno	M1	M	24	30	Sim	Ausente
62	9	Teckel	Carcinoma	M4	M	24	5	Não	Ausente
63	13	SRD	Sarcoma	M1	U	4	15	Não	Ausente
65	7	Fila brasileiro	Carcinoma	M2	U	48	7	Não	E7-C253-"missense"
70	11	Pastor alemão	Carcinoma	M4	M	24	4	Não	E5-C132-"missense"(F)
72	7	Yorkshire terrier	Adenoma	M3	M	8	0,5	Não	Ausente
73	13	Poodle	Sarcoma	M2	U	4	5	Não	Ausente

Continua...

...continuação

74	10	Poodle	Carcinoma	M5	M	4	0,2	Não	Ausente
75	14	SRD	Misto Maligno	M1	M	24	4	Não	Ausente
78	7	SRD	Carcinoma	M5	M	4	2	Não	Ausente

C= cadela; SRD= sem raça definida; M1= mama torácica cranial; M2= mama torácica caudal; M3= mama abdominal cranial; M4= mama abdominal caudal; M5= mama inguinal; U= uma mama acometida; M= mais de uma glândula mamária acometida; TP= tempo de progressão; PU= presença de ulceração; E= exoni; C= códon; F= "frameshift".

Tabela 7 – Comparação entre as mutações encontradas e os tipos histológicos das neoplasias mamárias caninas.

LOCALIZAÇÃO		TIPO DA MUTAÇÃO	MALIGNOS (n=23)				BENIGNOS (n=7)	
exon	códon		Carcinoma (n=10)	Sarcoma (n=4)	Misto Maligno (n=9)	Adenoma (n=5)	Misto Benigno (n=2)	
5	132	AAG → AACG (Lys → Asn)	1	-	2	-	-	
		mutação "missense" ("frameshift")						
5	148	AGC → ACC (Ser → Thr)	-	-	-	1	-	
		mutação "missense"						
7	253	ACT → TCT (Thr → Ser)	1	-	-	-	-	
		mutação "missense"						
8	285	GAG → GAC (Glu → Asp)	-	-	1	-	-	
		mutação "missense"						

5. DISCUSSÃO

A condução dessa pesquisa justifica-se devido à elevada incidência de neoplasias mamárias malignas em cadelas e em mulheres (BERGH et al., 1995; KITCHELL, 1995; BENJAMIN et al., 1999; INOUE & SHIRAMIZU, 1999; MISDORP, 2002; LANA et al., 2007) e por existirem poucos estudos sobre mutações no gene *p53* nas neoplasias mamárias (WAKUI et al., 2001).

As neoplasias mamárias prevaleceram em cadelas de sete a 12 anos de idade, como constatado por SONNENSCHNEIN et al. (1991), KITCHELL, (1995) e DE NARDI et al. (2002) e acometeram preferencialmente o último par de glândulas mamárias, concordando com LANA et al. (2007). Mas a maioria dos tumores acometeu mais de uma glândula mamária (87% dos casos), discordando de LANA et al (2007). Com relação ao tipo histológico da neoplasia, houve uma maior ocorrência de neoplasias malignas (76%) em relação às benignas (24%), como constatado por DE NARDI et al. (2002), que encontraram uma porcentagem de aproximadamente 70% de neoplasias malignas.

Alguns estudos analisaram mutações no gene *p53* em neoplasias caninas e humanas e detectaram mutações pontuais, inserções e/ou deleções (DEVILEE et al., 1994; MAYR et al., 1994; MAYR et al., 1997; CHU et al., 1998; MAYR et al., 1998; VELDHOEN et al., 1998; MUTO et al., 2000), igualmente ao presente estudo. Entretanto, não foi encontrada nenhuma deleção.

A prevalência de mutações em *p53* é extremamente variável entre os tipos tumorais, variando de 0 a 60% na maioria dos cânceres humanos (CHU et al., 1998). No presente trabalho, foram encontradas seis mutações em 30 neoplasias mamárias; cinco em 23 neoplasias malignas e uma em sete neoplasias benignas. A frequência dessas mutações nesse estudo assemelha-se às de outros estudos (VAN LEEUEWN et al., 1996; CHU et al., 1998; MAYR et al., 1999; MUTO et al., 2000; WAKUI et al., 2001; LEE & KWEON, 2002). Nesses estudos, a porcentagem de mutações em neoplasias malignas foi maior quando comparada às neoplasias

benignas, com exceção de WAKUI et al. (2001) que analisaram apenas carcinomas.

A maioria dos pesquisadores relatou as mutações pontuais (substituições) do tipo transição como sendo mais comuns (MILLIKAN et al., 1995; CHU et al., 1998; MAYR et al., 1999; MUTO et al., 2000; WAKUI et al., 2001; LEE & KWEON, 2002). As únicas exceções foram VAN LEEUEWN et al. (1996), que observaram três transversões e nenhuma transição em nove carcinomas mamários e MUTO et al. (2000), que encontraram a mesma quantidade de transições e transversões para os tumores benignos. Concordando com VAN LEEUEWN et al. (1996) e MUTO et al. (2000), no presente estudo encontraram-se apenas transversões, tanto nas neoplasias malignas quanto nas benignas. Em um tumor benigno e quatro malignos ocorreram transversão de G:C e um maligno ocorreu transversão de A:T.

Alguns pesquisadores afirmam que a maioria das mutações em *p53* é do tipo “missense”, em cães e em humanos (DEVILEE et al., 1994; VAN LEEUEWN et al., 1996; MUTO et al., 2000; WAKUI et al., 2001; LEE & KWEON, 2002; SILVA, 2004), como foi também demonstrado nesse estudo. Observaram-se 6 mutações “missense” e nenhuma mutação “nonsense” e silenciosa. Alguns estudos excluíram as mutações silenciosas das análises, alegando não demonstrar uma função no desenvolvimento do tumor (MAYR et al., 1999). Concordando com GREENBLATT et al. (1994), consideraram-se as mutações silenciosas, pois, apesar de não alterar o fenótipo, essa mutação pode servir como um marcador de dano genético e/ou defeito no reparo do DNA.

A maioria das mutações está localizada em uma das quatro regiões que são mais freqüentemente afetadas no câncer humano, conhecidas como domínio evolutivo altamente conservado ou “hot spot” (VAN LEEUWEN et al., 1996; CHU et al., 1998; MUTO et al., 2000; WAKUI et al., 2001; LEE & KWEON, 2002). No presente trabalho, cinco mutações ocorreram nos “hot spots” e apenas uma não acometeu essa região, discordando dos autores citados. Mas a mutação, que não está localizada em “hot spot”, está localizada no mesmo códon 148 onde MUTO et

al. (2000) também encontrou alteração e, coincidentemente, ambas mutações foram detectadas em adenomas. Como essas regiões são comparadas às regiões humanas, é possível que os “hot spots” caninos sejam diferentes dos humanos. São necessários mais estudos, com um grande número de animais, para certificação da região mais freqüentemente acometida.

As alterações em *p53* podem ocorrer no início da carcinogênese mamária canina, pois foram detectadas mutações não só em carcinomas mamários, mas também em um tumor benigno de mama. As mutações genéticas tendem a acumular com o aumento da idade, enquanto que o reparo do DNA se torna menos eficiente, aumentando a suscetibilidade às neoplasias (SUEIRO et al., 2004).

A mutação no gene *p53* está associada à progressão do tumor (LEE & KWEON, 2002) e mostra um aumento no potencial de malignidade e piora do prognóstico (MUTO et al., 2000; LEE et al., 2004). Na maioria dos estudos sobre câncer de mama humano observa-se que tanto o período pré-recidiva como o período de sobrevivência estão significativamente reduzidos naqueles que apresentam mutações no gene *p53* (SILVA, 2004).

Comparando as mutações com os parâmetros clínicos e baseando-se nas informações anteriormente citadas, pode-se observar que as neoplasias malignas foram mais comumente acometidas do que as neoplasias benignas e que a maioria das mutações ocorreram em neoplasias com um tempo de progressão maior e com características de agressividade (como por exemplo, ulceração e por nenhum tumor possuir tamanho pequeno), com algumas exceções. A cadela 59 possuía neoplasia benigna e pequena. Mas como o tempo de progressão era muito curto, se torna difícil prever a agressividade da neoplasia. Possivelmente essa neoplasia estaria evoluindo rapidamente e aumentando seu possível potencial de malignidade.

Concordando com MUTO et al. (2000) e WAKUI et al. (2001), também não foi encontrada associação entre mutações com as raças das cadelas. São necessários mais estudos, com um número maior de animais por raça, para

afirmar se existe alguma relação ou alguma predisposição racial para alguma mutação no gene *p53*.

Como ocorreu transição de T:C no códon 156 (exon 5), em todas as seqüências do grupo controle e das glândulas mamárias neoplásicas, considerou-se como seqüência normal o códon TGC, e não o códon TGT citado por Chu et al., 1998. Essa alteração pode ser explicada como uma característica evolutiva, já que a pesquisa de Chu et al. (1998) foi realizada no Canadá e na Holanda, e não no Brasil. Infelizmente não há nenhuma publicação, até o momento, sobre a seqüência normal do gene *p53* canino no Brasil.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou mutações no gene *p53* tanto em neoplasias malignas quanto nas benignas. Comparando essas mutações com os parâmetros clínicos (quantidade de glândulas mamárias acometidas, tempo de progressão e características macroscópicas da neoplasia), concluiu-se que alterações no *p53* podem ocorrer em um estágio inicial na carcinogênese mamária canina e estar relacionadas com a malignidade do tumor.

Em relação ao polimorfismo encontrado em todas as seqüências do grupo controle e das glândulas mamárias neoplásicas no códon 156 (exon 5), concluiu-se que a seqüência normal é o códon TGC, e que provavelmente essa alteração demonstra uma característica evolutiva.

7. REFERÊNCIAS

BARTLETT, J.M.S.; STIRLING, D. A short history of the polymerase chain reaction. In: **PCR Protocols**. 2^a ed. Totowa: Humana Press, p. 3-6, 2003.

BENJAMIN, S.A.; LEE, A.C., SAUNDERS, W.J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology**. v.36, n.5, p.423-436, 1999.

BERGH, J.; NORBERG, T., SJÖGREN, S.; LINDGREN, A.; HOLMBERG, L.; Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. **Nature Medicine**. v.1, n.10, p.1029-1034, 1995.

BIRCHARD, S. J. Definitive surgical treatment for cancer. In: BONAGURA, J.D. **Kirk's Current Veterinary Therapy XII - Small Animal Practice**. 12^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995, p.462-464.

BOSTOCK, D. E. Neoplasm of the skin and mammary gland in dogs and cats. In: KIRK, R.W. **Kirk's Current Veterinary Therapy VI - Small Animal Practice**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1977, p.493-496.

CAMARGO, A. A.; NETO, E. D.; SIMPSON, A. J. G. Mutação e Câncer. In: ROSSI, B. M.; PINHO, M. **Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião**. 1^a ed. São Paulo: Lemar, 1999, p.111-123.

CHOI, Y.K.; KIM, C.J. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 gene in canine transmissible venereal tumor. **Journal of Veterinary Science**. v.3, n.4, p.285-292, 2002.

CHU, L.L.; RUTTEMAN, G.R.; KONG, J.M.; GHAREMANI, M.; SCHMEING, M.; MISDORP, W.; VAN GARDEREN, E.; PELLETIER, J. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. **Breast Cancer Research and Treatment**. v.50, p.11-25, 1998.

DALECK, C. R. Tumor Mamário Canino. **Clínica Veterinária**. v.1, n.2, p.12-14, 1996.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**. v.7, n.2, p.15-26, 2002.

DEVILEE, P.; VAN LEEUWEN, I.S.; VOESTEN, A.; RUTTEMAN, G.R.; VOS, J.H.; CORNELISSE, C.J. The canine p53 gene is subject to somatic mutations in thyroid carcinoma. **Anticancer Research**. v.14, n.5A, p.2039-2046, 1994.

ELLEDGE, R.M.; ALLRED, D.C. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. v.52, p.79-98, 1998.

GRAHAM, J.C.; MYERS, R.K. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.13, p.416-418, 1999.

GREENBLATT, M.S.; BENNETT, W.P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Research**. v.54, p.4855-4878, 1994.

HAINAUT, P.; HERNANDEZ, T.; ROBINSON, A.; RODRIGUEZ-TOME, P.; FLORES, T.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C.C.; MONTESANO, R. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cells lines: updated compilation, revised formats and new visualization tools. **Nucleic Acids Research**. v.26, p.205-213, 1998.

INOUE, M.; SHIRAMIZU, K. Immunohistochemical detection of p53 and c-myc proteins in canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**. v.120, n.2, p.169-175, 1999.

JOHNSON, A.S.; COUTO, A.G.; WEGHORST, C.M. Mutation of the p53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. **Carcinogenesis**. v.19, n. 1, p.213-217, 1998.

KASTAN, M.B.; ONYEKWERE, O.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; CRAIG, R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Research**. v.51, p.6304-6311, 1991.

KITCHELL, B. E. Mammary tumors. In: BONAGURA, J.D. **Kirk's Current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice**. 12^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995, p.1098-1103.

KNAPP, D. W.; WATERS, D. J.; SCHMIDT, B. R. Tumores do Sistema Urogenital e das Glândulas mamárias. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., v.1, 2004, p.574-580.

KOENIG, A.; BIANCO, S.R.; FOSMIRE, S.; WOJCIESZYN, J.; MODIANO, J.F. Expression and significance of p53, Rb, p21/*waf-1*, p16/*ink-4a*, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. **Veterinary Pathology**. v.39, n.4, p.458-472, 2002.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4^a ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, p. 619-636.

LANE, D.P. p53, guardian of the genome. **Nature**. v.358, p.15-16, 1992.

LEE, C.H.; KWEON, O.K. Mutations of p53 Tumor Suppressor Gene in Spontaneous Canine Mammary Tumors. **Journal of Veterinary Science**. v.3, n.4, p.321-325, 2002.

LEE, C.H.; KIM, W.H.; LIM, J.H.; KANG, M.S.; KIM, D.Y.; KWEON, O.K. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**. v.5, n.1, p.63-69, 2004.

LEVINE, A.J.; PERRY, M.E.; CHANG, A.; SILVER, A.; DITTMER, D.; WU, M.; WELSH, D. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumor suppressor gene in tumorigenesis. **British Journal of Cancer** v.69, p.409-416, 1994.

LEVINE, A.J.; FLEICHLI, M.A. Inactivation of p53 retinoblastoma family pathways in canine osteosarcoma cell lines. **Veterinary Pathology**. v.37, n.1, p.54-61, 2000.

LOPES, A.; NAKAGAWA, W. T.; MELLO, C. A. L. de. Oncogenes e Genes Supressores de Tumor: Um Equilíbrio Necessário. In: ROSSI, B. M.; PINHO, M. **Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião**. 1^a ed. São Paulo: Lemar, p.125-142, 1999.

MAYR, B.; HECZKO, U.; SCHELLANDER, K.; SCHLEGER, W.; REIFINGER, M. Sequence of an exon of the feline p53 gene-mutation in a lymphosarcoma. **British Veterinary Journal**. v.149, p.387-390, 1993.

MAYR, B.; SCHELLANDER, K.; SCHLEGER, W.; REIFINGER, M. Sequence of an exon of the p53 gene – mutation in a papilloma. **British Veterinary Journal**. v.150, n.1, p.81-84, 1994.

MAYR, B.; SCHAFFNER, W.; BOTTO, I.; REIFINGER, M.; LOUPAL, G. Canine tumor suppressor gene p53 – mutation in a case of adenoma of circumanal glands. **Veterinary Research Communications**. v.21, n.5, p.369-373, 1997.

MAYR, B.; DRESSLER, A.; REIFINGER, M.; FEIL, C. Cytogenetic alterations in eight mammary tumors and tumor-supressor gene p53 mutation in one mammary tumor from dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v.59, n.1, p.69-78, 1998.

MAYR, B.; REIFINGER, M.; BREM, G.; FEIL, C. SCHLEGER, W.; Cytogenetic, ras, and p53: studies in cases of canine neoplasms (hemangiopericytoma, mastocytoma, histiocytoma, chloroma). **The Journal of Heredity**. v.90, n.1, p.124-128, 1999.

MAYR, B.; BLAUENSTEINER, J.; EDLINGER, A.; REIFINGER, M.; ALTON, K.; SCHAFFNER, G.; BREM, B.G. Presence of p53 mutations in feline neoplasms.

Research in Veterinary Science. v.68, p.63-69, 2000a.

MAYR, B.; RESCH, S.; HEPERLE, G.; BREM, G.; REIFINGER, M.; SCHAFFNER, G. Comparative studies in the promoter and exon 1 regions of tumour suppressor p53 in several mammalian species: absence of mutations in a panel of spontaneous domestic animal tumours. **Journal of Veterinary Medicine.** Série A, v.47, n. 0, p.293-597, 2000b.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HÉLIMEN, E.; LIPSCOMB, T.P. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **Armed Forces Institute of Pathology**, v. 7, n. 1 , p. 1-59, 1999.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals.** 4^a ed. Iowa: Blackwell Publishing Company, p.575-606, 2002.

MILLIKAN, R.; HULKA, B.; THOR, A.; ZHANG, Y.; EDGERTON, S.; ZHANG, X.; PEI, H.; HE, M.; WOLD, L.; MELTON, J.; BALLARD, D.; CONWAY, K.; LIU, E.T. p53 mutations in benign breast tissue. **Journal of Clinical Oncology.** v.13, n.9, p.2293-2300, 1995.

MUTO, T. WAKUI, H.; TAKAHASHI, S. MAEKAWA, T.; MASAOKA, T.; USHIGOME, S.; FURUSATO, M. p53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. **Veterinary Pathology**, v.37, n.3, p.248-253, 2000.

OWEN, L. M. TNM Classification of tumors in domestic animals. **World Health Organization**, Geneva, p. 26-32, 1980.

PEARSON, H.; STIRLING, D. DNA extraction from tissue. In: BARTLETT, J.M.S.; STIRLING, D. **PCR Protocols**. 2^a ed. Totowa: Humana Press, p. 33-34, 2003.

PEÑA, L. PEREZ-ALENZA, M.D.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; NIETO, A. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.78, p.141-148, 2003.

ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. p53 expression and apoptosis in melanomas of dogs and cats. **Research in Veterinary Science**, v.70, p.19-25, 2001.

SAGARTZ, J.E.; BODLEY, W.L.; GAMBLIM, R.M.; COUTO, C.G.; TIERNEY, L.A.; CAPEN, C.C. p53 tumor suppressor protein overexpression in osteogenic tumors of dogs. **Veterinary Pathology**, v.33, n.2, p.213-221, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3^a ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 720p., 2001.

SARTIN, E.A.; BARNERS, S.; KWAPIEN, R.P.; WOLFE, L.G. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v.53, n.11, p.2196-2200, 1992.

SEUÁNEZ, H.N.; MOREIRA, M.A.M.; OTAZÚ, I.B.; BRAGGIO, E.; RENAULT, I.Z. Métodos moleculares de diagnóstico. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. 1^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.13-27, 2004.

SCHNEIDER, R.; DORN, C.R.; TAYLOR, DON. Factors influencing mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**. v.43, n.6, 1249-1261, 1969.

SILVA, R.L.A. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. 1^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.29-42, 2004.

STIRLING, D. Sequencing – a technical overview. In: BARTLETT, J.M.S.; STIRLING, D. **PCR Protocols**. 2^a ed. Totowa: Humana Press, p. 33-34, 2003.

SONNENSCHNEIN, E.G.; CLICKMAN, L.T.; GOLDSCHMIDT, M.H. Body conformation diet and risk of breast cancer in pet dogs: A case-control study. **American Journal Epidemiology**, v.133, p.694-703, 1991.

SUEIRO, F.A.R.; ALESSI, A.C.; VASSALO, J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. **Journal of Comparative Pathology**. v.131, p.207-213, 2004.

TEIFKE, J.P.; LÖHR, C.V. Immunohistochemical detection of p53 overexpression in paraffin wax-embedded squamous cell carcinomas of cattle, horses, cats and dogs. **Journal of Comparative Pathology**. v.114, p.205-210, 1996.

VAN LEEUWEN, I.S.; HELLMÈN, E.; CORNELISSE, C.J.; et al. p53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumor tissues in the dog. **Cancer Research**. v.16, n.6B, p.3737-3744, 1996.

VELDHOEN, N.; STEWART, J.; BROWN, R.; MILNER, J. Mutations of the p53

gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene**. v.16, p.249-255,1998.

WAKUI,S.; MUTO, T.; YOKOO, K.; YOKOO, R.; TAKAHASHI, H.; MASAOKA, T.; HANO, H.; FURUSATO, M. Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. **Anticancer Research**. v.21, p.611-616, 2001.

WOLF, J.C.; GINN, P.E.; HOMER, B.; FOX, L.E.; KURZMAN, I.D. Immunohistochemical detection of p53 tumor suppressor gene protein in canine epithelial colorectal tumors. **Veterinary Pathology**, v.34, n.5, p.394-404, 1997.

APÊNDICES

A- PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TECIDUAL

(modificado de PEARSON & STIRLING, 2003)

1. Colocar o fragmento tumoral congelado de aproximadamente 0,3 cm de tamanho em tubo tipo eppendorf de 1,5 mL;
2. Acrescentar no tubo 300 µL de TNE 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 150 mM de NaCl e 10 mM EDTA pH 8,0);
3. Adicionar ao tubo uma solução de lise composta por 30 µL de Tris-HCl 1M, 10 µL de SDS 20% e 20 µL de proteinase K (20 mg/ml);
4. Inverter o tubo várias vezes;
5. Incubar a 55°C cerca de 12 horas ou até o tecido estar completamente digerido, agitando periodicamente;
6. Resfriar as amostras à temperatura ambiente;
7. Adicionar 350 µL fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1);
8. Homogenizar a solução em vortex;
9. Centrifugar por 10 minutos a 14000 rpm;
10. Remover o sobrenadante cuidadosamente, transferindo para tubos novos;
11. À camada aquosa obtida no passo anterior, adicionar 300 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
12. Agitar em vortex até formar uma solução uniforme;
13. Centrifugar por 10 minutos a 14000 rpm;
14. Transferir o sobrenadante para novos tubos;

15. Adicionar 700 μL de etanol absoluto gelado;
16. Misturar a solução invertendo o tubo gentilmente;
17. Armazenar a -20°C por várias horas ou “overnight”;
18. Centrifugar por 10 minutos a 14000 rpm;
19. Descartar o sobrenadante por decantação;
20. Adicionar 150 μL de etanol 70%;
21. Inverter o tubo várias vezes;
22. Centrifugar por 10 minutos a 14000 rpm;
23. Descartar o sobrenadante por decantação;
24. Retirar todo o álcool existente no tubo com a ajuda de uma micropipeta até ficar completamente seco;
25. Deixar à temperatura ambiente ou em estufa 37°C por alguns minutos;
26. Adicionar 150 μL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA pH 8,0);
27. Misturar;
28. Incubar “overnight” à temperatura ambiente;
29. Agitar os tubos por alguns segundos;
30. Estocar em freezer.

B- SEQÜÊNCIA NORMAL DOS EXONS 5 A 8 DO GENE *p53* SEPARADA EM CÓDONS

Legenda:

Nucleotídeos destacados em **amarelo**: “hot spots” (VAN LEEUWEN et al., 1996)

EXON 5

seqüência normal (LEE & KWEON, 2002)

TACTCCCCTCTCCTCAACAAGTTGTTTTGCCAGCTGGCGAAGACCTGCCCCGTGCAGCTGTGG
GTCAGCTCCCCACCCCCACCCAATACCTGTGTCCGCGCTATGGCCATCTATAAGAAGTCGGAG
TTCGTGACCGAGGTTGTGCGGCGCTGCCCCACCATGAACGCTGCTCTGACAGTAGTGACG

seqüência normal separada em códons (MUTO et al, 2000)

Tyr	Ser	Pro	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu	Phe	Cys	Gln	Leu	Ala
126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138
TAC	TCC	CCT	CTC	CTC	AAC	AAG	TTG	TTT	TGC	CAG	CTG	GCG
Lys	Thr	Cys	Pro	Val	Gln	Leu	Trp	Val	Ser	Ser	Pro	Pro
139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151
AAG	ACC	TGC	CCC	GTG	CAG	CTG	TGG	GTC	AGC	TCC	CCA	CCC
Pro	Pro	Asn	Thr	Cys	Val	Arg	Ala	Met	Ala	Ile	Tyr	Lys
152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164
CCA	CCC	AAT	ACC	TGT	GTC	CGC	GCT	ATG	GCC	ATC	TAT	AAG
Lys	Ser	Glu	Phe	Val	Thr	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro
165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177
AAG	TCG	GAG	TTC	GTG	ACC	GAG	GTT	GTG	CGG	CGC	TGC	CCC
His	His	Glu	Arg	Cys	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp			
178	179	180	181	182	183	184	185	186	187			
CAC	CAT	GAA	CGC	TGC	TCT	GAC	AGT	AGT	GAC			

EXON 6**seqüência normal (LEE & KWEON, 2002)**

GTCTTGCCCCTCCTCAGCATCTCATCCGAGTGGAAGGAAATTTGCGGGCCAAGTACCTGGACG
ACAGAAACACTTTTCGACACAGTGTGGTGGTGCCTTATGAGCCACCCGAG

seqüência normal separada em códons (MUTO et al, 2000)

Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn
188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
CTT	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTC	ATC	CGA	GTG	GAA	GGA	AAT

Leu	Arg	Ala	Lys	Tyr	Leu	Asp	Asp	Arg	Asn	Thr	Phe	Arg
201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213
TTG	CGG	GCC	AAG	TAC	CTG	GAC	GAC	AGA	AAC	ACT	TTT	CGA

His	Ser	Val	Val	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Glu
214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224
CAC	AGT	GTG	GTG	GTG	CCT	TAT	GAG	CCA	CCC	GAG

EXON 7**seqüência normal (LEE & KWEON, 2002)**

GTTGGCTCTGACTATACCACCATCCACTACAACACTACATGTGTAACAGTTCCCTGCATGGGAGGC
ATGAACCGGCGGCCATCCTCACTATCATCACCCCTGGAAGACTCCAG

seqüência normal separada em códons (MUTO et al, 2000)

Val	Gly	Ser	Asp	Tyr	Thr	Thr	Ile	His	Tyr	Asn	Tyr	Met
225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237
GTT	GGC	TCT	GAC	TAT	ACC	ACC	ATC	CAC	TAC	AAC	TAC	ATG

Cys	Asn	Ser	Ser	Cys	Met	Gly	Gly	Met	Asn	Arg	Arg	Pro
238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
TGT	AAC	AGT	TCC	TGC	ATG	GGA	GGC	ATG	AAC	CGG	CGG	CCC

Ile	Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser	Ser
251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261
ATC	CTC	ACT	ATC	ATC	ACC	CTG	GAA	GAC	TCC	AGT

EXON 8**seqüência normal (LEE & KWEON, 2002)**

TGGAAACGTGCTGGGACGCAACAGCTTTGAGGTACGCGTTTGTGCCTGTCCCGGGAGAGACC
 GCCGGACTGAGGAGGAGAATTTCCACAAGAAGGGGGAGCCTTGTCTGAGCCACCCCCCGG
 GAGTACCAAGCGAG

seqüência normal separada em códons (MUTO et al, 2000)

Gly	Asn	Val	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	Val
262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274
GGA	AAC	GTG	CTG	GGA	CGC	AAC	AGC	TTT	GAG	GTA	CGC	GTT
Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg	Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu
275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287
TGT	GCC	TGT	CCC	GGG	AGA	GAC	CGC	CGG	ACT	GAG	GAG	GAG
Asn	Phe	His	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	Cys	Pro	Glu	Pro	Pro
288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
AAT	TTC	CAC	AAG	AAG	GGG	GAG	CCT	TGT	CCT	GAG	CCA	CCC
Pro	Gly	Ser	Thr	Lys	Arg							
301	302	303	304	305	306							
CCC	GGG	AGT	ACC	AAG	CGA							