

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE METÁSTASE INTRAOCULAR E
PULMONAR EM CADELAS PORTADORAS DE CARCINOMA
MAMÁRIO E CORRELAÇÃO COM MUTAÇÃO E EXPRESSÃO DE
E-CADERINA

LUCIANA MOURA CAMPOS PARDINI

BOTUCATU - SP

Junho de 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE METÁSTASE INTRAOCULAR E
PULMONAR EM CADELAS PORTADORAS DE CARCINOMA
MAMÁRIO E CORRELAÇÃO COM MUTAÇÃO E EXPRESSÃO DE
E-CADERINA

LUCIANA MOURA CAMPOS PARDINI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Animal para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Joaquim Tilton Ranzani
Co-orientadora: Dra. Adriana Camargo Ferrasi

BOTUCATU - SP

Junho de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pardini, Luciana Moura Campos.

Análise da ocorrência de metástase intraocular e pulmonar em cadelas portadoras de carcinoma mamário e correlação com mutação e expressão de E-caderina / Luciana Moura Campos Pardini. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Joaquim Tilton Ranzani

Coorientador: Adriana Camargo Ferrasi

Capes: 50501003

1. Mamas - Doenças. 2. Cão - Doenças. 3. Moléculas de adesão celular. 4. Metástase.

Palavras-chave: CDH1; Cadelas; Carcinoma mamário; E-caderina; Metástase.

Nome do autor: Luciana Moura Campos Pardini

Título: “Análise da ocorrência de metástase intraocular e pulmonar em cadelas portadoras de carcinoma mamário e correlação com mutação e expressão de E-caderina”.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. José Joaquim Tilton Ranzani

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária - FMVZ/UNESP - Botucatu - SP.

Profa. Adj. Dra. Noeme Sousa Rocha

Membro

Departamento de Clínica Veterinária – Serviço de Patologia - FMVZ/UNESP - Botucatu - SP.

Prof. Ass. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Membro

Depto. de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - FCA/UNESP - Botucatu - SP.

Data da Defesa: 03 de junho de 2015.

*Dedico este trabalho aos animais,
por darem sentido à minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais: Maria Inês e José Raphael, que sempre incentivaram, apoiaram e aconselharam cada passo e decisão que tive que tomar na minha vida.

Aos meus irmãos Júnior e Renata e minhas sobrinhas Isabela e Marina.

Ao meu orientador, Prof. José Joaquim Tilton Ranzani, por tantas oportunidades e ensinamentos ao longo da minha vida acadêmica.

À minha co-orientadora, Dra. Adriana Camargo Ferrasi, por todo incentivo, dedicação e paciência; por ter-me aberto as portas do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, tornando possível a realização deste projeto.

Às belas amigas que construí ao longo do caminho, em especial Aline Galvani e Tatiany Silveira, tão fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos colegas de Oftalmologia: Úrsula, Micaella, Inajara e Rodrigo, pelo apoio e credibilidade que sempre depositam em mim.

À Ive, por uma amizade que resiste ao tempo e às transformações.

À amiga Gabriela, por ter-me acolhido, me mostrando um novo mundo e na companhia das amigas da República Toma Conta: Anne, Paula, Maíra, Izabela e Taís pude viver tantos momentos inesquecíveis.

A todos os professores, pós-graduandos, alunos e funcionários que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização deste projeto.

À FAPESP, por ter financiado meus sonhos, não somente meus estudos.

À UNESP de Botucatu, onde conquistei o que de mais importante tenho na vida: minha profissão. Hoje deixo essa casa, já com muita saudade, mas levarei sempre no coração, a gratidão por tudo que vivi aqui.

E por último, mas não menos importante, agradeço ao Nelsinho, meu cachorro tão especial. Meu companheiro de todos os dias e todas as horas, minha fonte inesgotável de amor.

Muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários caninos.....	09
Tabela 2 - Agrupamento por estádios de tumores mamários caninos.....	09

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
CAPÍTULO 1.....	03
Introdução.....	04
Revisão Bibliográfica.....	06
Objetivos.....	19
CAPÍTULO 2.....	20
Manuscrito para publicação.....	21
CAPÍTULO 3.....	40
Conclusões finais.....	41
Referências Bibliográficas.....	42
Anexos.....	47

PARDINI, L. M. C. **Análise da ocorrência de metástase intraocular e pulmonar em cadelas portadoras de carcinoma mamário e correlação com mutação e expressão de E-caderina.** Botucatu, 2015. 56p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Introdução: A E-caderina é uma proteína transmembranosa, codificada pelo gene *CDH1*, que desempenha um papel importante na adesão intercelular de tecidos epiteliais. A perda da função ou expressão diminuída de E-caderina pode implicar em metástases e progressão do câncer. Nas neoplasias mamárias, metástases pulmonares ocorrem com maior frequência, porém as metástases oculares, especialmente na coroide, são relativamente comuns, mas pouco diagnosticadas clinicamente. **Metodologia:** Vinte e oito cadelas de diferentes raças, não-castradas, com idade superior a 5 anos, com diagnóstico de carcinoma mamário ao exame citopatológico, sem metástases pulmonares e/ou oculares, foram submetidas à mastectomia radical e ovariosalpingohisterectomia (OSH), sendo reavaliadas após três e seis meses de pós-operatório. O padrão de expressão relativa do gene *CDH1* em tecidos tumorais e normais, foi avaliado pelo sistema *TaqMan Universal PCR Master Mix*; o padrão de metilação foi realizado utilizando-se a técnica de MSP-PCR; o sequenciamento do DNA, análise das mutações e polimorfismos foram realizados a partir do sangue periférico, utilizando-se a técnica de reação de terminação em cadeia pelo *kit BigDye Terminator v.3 Cycle Sequencing*. Análises imunohistoquímicas foram realizadas para avaliar a expressão da E-caderina. **Resultados:** Nenhuma das 28 cadelas estudadas apresentou metástase ocular ou pulmonar com três ou seis meses de pós-operatório. Em 57,1% dos casos uma menor expressão relativa do gene *CDH1* foi identificada. Em 100% dos casos verificou-se o *status* metilado para o gene *CDH1*, reafirmando a hipótese de que células não-tumorais podem contribuir para estes resultados. Em 46,5% dos casos identificou-se expressão reduzida de E-caderina pela técnica de imunohistoquímica. Foram identificados 3 histotipos tumorais: carcinoma complexo, tubulopapilífero e carcinoma em tumor misto. Em 100% dos casos de carcinoma tubulopapilífero identificou-se expressão reduzida do gene *CDH1* tanto pela qPCR quanto pela imunohistoquímica. No sequenciamento do gene, 6 animais (21,4%) apresentaram mutações silenciosas nos *exons* 3, 7 e 13, sendo que no *exon* 13 pode ser observada a presença de duas variações genéticas, também silenciosas. Foi identificada também uma mutação no *intron* 7. **Conclusões:** O presente estudo evidencia a diminuição da expressão de E-caderina em tumores de mama caninos, principalmente no carcinoma tubulopapilífero. Essa redução da expressão está, de alguma forma, relacionada à progressão do tumor, mas não se associa à ocorrência de metástases pulmonares e/ou oculares no tempo de seguimento deste estudo. Pouco provavelmente, essa alteração no padrão de expressão observado, é decorrente de mutações de ponto da região traduzida do gene *CDH1*.

Palavras-chave: Cadelas, Carcinoma mamário, Metástase ocular, Mutação, Metilação, E-caderina, *CDH1*.

PARDINI, L. M. C. **Analysis of intraocular and pulmonary metastasis in female dogs suffering from mammary carcinoma and correlation with E-cadherin mutation and expression.** Botucatu, 2015. 56p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Introduction: E-cadherin is a transmembrane protein, encoded by *CDH1* gene, that has an important role in intercellular adhesion of epithelial tissues. Loss of function or decreased expression of E-cadherin may lead to cancer progression and metastasis. In mammary epithelial neoplasms, lung metastases occur more frequently, but the ocular metastasis, especially in the choroid, are relatively common but underdiagnosed clinically. **Methods:** Twenty-eight dogs of different breeds, non-castrated, older than five years, diagnosed with breast cancer by cytopathological examination, without pulmonary and/or ocular metastasis, have undergone to radical mastectomy and ovariopalingohysterectomy (OSH), and re-evaluated after three and six months postoperatively. The pattern of relative expression of *CDH1* gene in normal and tumor tissues was assessed by *TaqMan Universal PCR Master Mix system*; the pattern of methylation was performed using MSP-PCR; DNA sequencing analysis of mutations and polymorphisms were performed from peripheral blood using the termination chain reaction technique with *BigDye Terminator v.3 Cycle Sequencing kit*. Immunohistochemical analyzes were performed to evaluate the expression of E-cadherin. **Results:** None of the 28 dogs studied had ocular or pulmonary metastasis with 3 or 6 months postoperatively. In 57,1% of cases a decreased relative expression of *CDH1* gene was identified. In 100% of cases there was methylated status for the *CDH1* gene, confirming the hypothesis that non-tumor cells can contribute to these results. In 46,5% of the cases reduced E-cadherin expression by immunohistochemistry was identified. Three tumor histotypes were identified: complex carcinoma, tubulopapillary, and carcinoma in mixed tumor. In 100% of cases of tubulopapillary carcinoma was identified a reduced gene expression of *CDH1* by both qPCR and by immunohistochemistry. The sequencing of the gene, 6 animals (21,4%) had silent mutations in *exons* 3, 7 and 13, and in the *exon* 13 can be observed the presence of two genetic variants, also silent. It was also identified a mutation in *intron* 7. **Conclusions:** This study shows the decrease in E-cadherin expression in breast tumors canines, especially in tubulopapillary carcinoma. This decreased expression is in some way, related to tumor progression, but is not associated to the occurrence of pulmonary and/or ocular metastases at the time of follow-up study. This change in the pattern of expression observed, probably is not related with mutations in *CDH1* gene translated region.

Key-Words: Bitches, breast carcinoma, ocular metastasis, mutation, methylation, E-cadherin, *CDH1*.

INTRODUÇÃO

A incidência de câncer em cães vem aumentando consideravelmente nos últimos anos e é mais alta do que em qualquer outra espécie. A alta ocorrência de neoplasias está intimamente relacionada à maior longevidade alcançada pelos animais de estimação atualmente (WITHROW e VAIL, 2007; FELICIANO et al, 2012).

A maioria das fêmeas com neoplasia mamária é clinicamente saudável no momento do diagnóstico e os tumores podem ser identificados pelo proprietário ou por um médico veterinário durante um exame físico de rotina (LANA et al, 2007).

O exame físico criterioso do animal é importante para avaliar a presença de possíveis metástases do tumor de mama, que ocorrem mais frequentemente para os linfonodos regionais e pulmões (CIRILLO, 2008).

Metástases oculares, especialmente na coróide, provenientes de neoplasias mamárias, são relativamente comuns, porém pouco diagnosticadas clinicamente e o carcinoma mamário é, entre os tumores epiteliais, o responsável pela maioria dos casos de metástases (LABELLE e LABELLE, 2013).

Antigamente, acreditava-se que as metástases oculares eram raras. No entanto, hoje sabe-se que, em humanos, estes tumores são mais prevalentes que os melanomas primários da coróide (FENTON et al, 2004).

Marcadores moleculares que indiquem o risco de desenvolvimento de metástases têm sido propostos como ferramenta auxiliar na determinação do prognóstico da doença (WEIGELT et al, 2005). A identificação de marcadores que possam prever o comportamento dos tumores é especialmente

importante em câncer de mama devido, sobretudo, à variabilidade de progressões clínicas apresentadas por essa doença. O conhecimento das vias moleculares caracteriza um significativo potencial de complementação e aperfeiçoamento da abordagem diagnóstica e terapêutica para esse tipo de neoplasia (KLOPFLEISCH et al, 2011).

No entanto, estudos enfocando a base molecular dos tumores mamários têm sido dificultados por um número limitado de ferramentas moleculares específicas para a espécie canina e a falta de informações moleculares sobre o câncer de mama em cadelas dificulta a identificação de marcadores tumorais clinicamente relevantes (KLOPFLEISCH et al, 2011, LABELLE e LABELLE, 2013).

REVISÃO DE LITERATURA

As neoplasias mamárias são os tumores mais comuns nas cadelas não-castradas (CASSALI et al, 2011; EŽERSKYTĖ et al, 2011), representando de 25 a 52% dos casos de câncer nessas fêmeas (QUEIROGA e LOPES, 2002). Nos cães machos, neoplasias mamárias são extremamente raras (SORENMO, 2003; EŽERSKYTĖ et al, 2011).

Segundo Lana et al (2007) a probabilidade de desenvolvimento de tumores mamários aumenta com a idade do animal e as neoplasias surgem, em média, entre os 10 e 11 anos. Não há predisposição racial confirmada (LANA et al, 2007; GOLDSCHIMDIT et al, 2011).

Nas cadelas há 5 pares de mamas e as abdominais e inguinais são afetadas com maior frequência do que as mamas torácicas (MISDORP et al, 1999; CIRILLO, 2008; CASSALI et al, 2011). Aproximadamente 60% dos tumores mamários ocorrem nas mamas inguinais (QUEIROGA e LOPES, 2002).

As neoplasias mamárias em cadelas geralmente apresentam-se como nódulos circunscritos, de tamanho e consistência variáveis e com mobilidade para a pele ou aderidos ao músculo. Pode haver ulceração da pele e reações inflamatórias locais. Múltiplos tumores são frequentemente observados em uma única mama ou várias mamas podem estar acometidas ao mesmo tempo (tumores multicêntricos), podendo ser de diferentes tipos histológicos (CASSALI et al, 2011).

A incidência de neoplasias mamárias malignas ultrapassa 50% dos casos de tumor de mama e o carcinoma é o tumor maligno de maior ocorrência (QUEIROGA e LOPES, 2002; KLOPFLEISCH et al, 2011).

Estudos indicam que a tumorigênese mamária pode ser um evento hormônio-dependente já que o estrógeno, a progesterona e o hormônio do crescimento podem causar mudanças estruturais e funcionais nas glândulas mamárias (EŽERSKYTĖ et al, 2011). Sugere-se que o risco de desenvolvimento de tumores mamários aumenta conforme o número de ciclos estrais (cios). Cadelas castradas antes do primeiro ciclo estral apresentam risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias de apenas 0,05% na idade adulta. A probabilidade aumenta para 8% nas fêmeas castradas após o primeiro ciclo estral e para 26% após o segundo ciclo estral. Uma alta incidência de tumores mamários também pode ocorrer em fêmeas que receberam injeções de progesterona para a prevenção do estro (MURPHY, 2008).

A biópsia excisional com exame histopatológico é a conduta recomendada para o diagnóstico definitivo das neoplasias de glândulas mamárias, porém o uso da citologia aspirativa como método de diagnóstico tem aumentado ao longo do tempo e altos níveis de concordância entre os resultados citológicos e histopatológicos vêm sendo descritas (DALECK et al, 1998; ZUCCARI et al, 2001).

A principal vantagem do exame citopatológico é a rapidez e a simplicidade com que se estabelece o diagnóstico, com injúria tecidual mínima, e sem a necessidade de anestesia (ZUCCARI et al, 2001).

No entanto, o mais confiável método de diagnóstico do câncer de mama em cadelas é mesmo o exame histopatológico de biópsias excisionais ou incisionais. Além de facilitar a classificação da lesão e contribuir para a excisão precisa, o exame histopatológico possibilita ao examinador avaliar a infiltração do tumor para os tecidos moles e vasos sanguíneos circundantes. Detalhes relativos a histomorfologia do tumor, como presença ou ausência de pleomorfismo, grau de diferenciação, índice mitótico e presença ou ausência de necroses também podem ser identificados no exame histopatológico e assim auxiliar na escolha do melhor método de tratamento (FERREIRA et al, 2009).

A inspeção dos linfonodos regionais deve ser incluída na avaliação clínica das fêmeas com neoplasias mamárias, uma vez que a presença de metástases linfáticas exerce grande impacto no estadiamento clínico do animal e, portanto, influencia na escolha do tratamento e no tempo de sobrevida. Animais com metástases para linfonodos regionais apresentam diminuição significativa no tempo de sobrevida quando comparados com indivíduos sem metástases linfáticas (CASSALI et al, 2011).

A citologia aspirativa é um método bastante seguro para avaliar os gânglios linfáticos, possui alta sensibilidade e especificidade para a identificação de metástases. Esse exame deve ser realizado em nódulos linfáticos com alterações de volume, forma ou consistência ao exame físico. Em caso de resultados positivos ou suspeitos para metástases, a excisão dos linfonodos afetados é recomendada (CASSALI et al, 2011).

O estadiamento clínico é um método de classificação que permite a descrição da extensão da doença no momento do diagnóstico e consequentemente influencia o prognóstico e o tratamento a serem

estabelecidos. É determinado pelo sistema TNM, estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para os tumores mamários caninos.

Para definição do estadiamento clínico de um paciente com neoplasia mamária são avaliados: tamanho do tumor primário (T), metástases para nódulos linfáticos regionais (N) e presença ou ausência de metástases distantes (M) (tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários caninos (OWEN, 1980).

Tamanho do Tumor Primário (T)	Metástases para Linfonodos Regionais (N)	Metástases Distantes (M)
T0 – sem evidência de tumor	N0 – sem evidência de metástase	M0 – ausência de metástases distantes
T1 – tumor < 3 cm a: não-aderido b: aderido à pele c: aderido ao músculo	N1 – Linfonodo unilateral acometido a: não-aderido b: aderido	M1 – presença de metástases distantes, incluindo linfonodos
T2 – tumor 3-5 cm a: não-aderido b: aderido à pele c: aderido ao músculo	N2 – Linfonodos bilaterais acometidos a: não-aderidos b: aderidos	
T3 – tumor > 5 cm a: não-aderido b: aderido à pele c: aderido ao músculo		
T4 – Outros tamanhos		

Tabela 2. Agrupamento por estádios dos tumores mamários caninos (OWEN, 1980).

	T	N	M
Estádio I	T1a, b ou c	N0, N1a ou N2a	M0
Estádio II	T0 T1a, b ou c T2a, b ou c	N1 N1 N0 ou N1a	M0
Estádio III	Qualquer T3 Qualquer T	Qualquer N Qualquer Nb	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

*T- Tamanho do tumor primário; N – Metástases para Linfonodos Regionais; M – Metástases distantes

Para determinar o estadiamento clínico do câncer de mama, o profissional deve realizar, além da inspeção e exame cito ou histopatológico dos tumores e de linfonodos suspeitos, radiografias torácicas em três posições (lateral direita, lateral esquerda e ventro-dorsal), procedimento padrão para o diagnóstico da doença metastática pulmonar. As lesões pulmonares com seis a oito milímetros de diâmetro podem ser detectadas através da radiografia convencional. Já lesões metastáticas menores do que seis milímetros podem ser identificadas precocemente por meio da tomografia computadorizada (SORENMO, 2003; CASSALI et al, 2011).

Os pulmões são o principal sítio de metástases à distância em cadelas com neoplasias mamárias malignas, mas exames complementares, como ultrassonografia e radiografia abdominal são recomendados para a investigação de outros sítios de metástases, dependendo dos sinais clínicos apresentados pelo paciente. A observação de metástases distantes está associada a um prognóstico desfavorável (SORENMO, 2003; CASSALI et al, 2011).

A remoção cirúrgica completa das neoplasias, com amplas margens de segurança, quando não existem metástases, ainda é o procedimento terapêutico com maior probabilidade de cura, já que os protocolos de quimioterapia antineoplásica e radioterapia apresentam baixa atividade antitumoral nas neoplasias mamárias (LANA et al, 2007).

A escolha da técnica cirúrgica depende do tamanho, localização e consistência da massa tumoral. As técnicas vão desde a lumpectomia ou mamectomia parcial até a mastectomia radical, onde todas as mamas são excisadas (FELICIANO et al, 2012). No entanto, estudos baseados em taxas

de recorrência, ocorrência de metástases e sobrevida dos animais, demonstraram que a realização da cirurgia radical não apresenta vantagens em relação à excisão simples do tumor (CHANG et al, 2005).

Apesar da incidência de tumores mamários em cadelas ser, provavelmente, três vezes maior que nas mulheres (OWEN, 1979a), essa doença costuma apresentar características histológicas, comportamento biológico e curso clínico semelhantes ao carcinoma mamário em mulheres, provavelmente devido à alta similaridade entre o DNA humano e o canino (RIVERA e VON EULER, 2011). Sendo assim, as cadelas são frequentemente utilizadas como modelos comparativos para o estudo do câncer de mama e outras doenças na espécie humana (RESTUCCI et al, 2007). Estudos indicam que 60% das doenças no cão apresentam marcadores moleculares similares àqueles encontrados nas doenças humanas (KIRKNESS et al, 2003; SWITONSKI et al, 2004).

Em Medicina Veterinária, vem ocorrendo um esforço crescente na tentativa de acrescentar aos fatores prognósticos clássicos como tamanho do tumor, presença de ulceração cutânea e invasão ganglionar linfática, novos parâmetros de natureza molecular, que possam auxiliar na decisão clínica e sugerir sobre a evolução e sobrevida da doença, à semelhança do que ocorre na Medicina Humana (QUEIROGA e LOPES, 2002). Sendo assim, a avaliação de marcadores preditivos pode possibilitar a escolha de tratamentos específicos e individualizados para cada paciente (CAVALCANTI e CASSALI, 2006).

Estudos enfocando a base molecular dos tumores mamários caninos têm sido dificultados por um número limitado de ferramentas moleculares

específicas para a espécie canina e essa falta de informações moleculares sobre o câncer de mama em cadelas prejudica a identificação de marcadores tumorais clinicamente relevantes (KLOPFLEISCH et al, 2011).

As proteínas de superfície celular responsáveis pela junção entre as células ou CAMs (moléculas de adesão celular) são descritas como potenciais marcadores moleculares e, entre elas, as caderinas parecem ser as mais confiáveis indicadoras de prognóstico nas neoplasias mamárias (LOMBAERTS et al, 2006).

A E-caderina (caderina epitelial) é uma proteína membro da família das caderinas, codificada pelo gene *CDH1* e conhecida por desempenhar um importante papel na adesão intercelular em tecidos epiteliais (KLOPFLEISCH et al, 2011; ASIAP et al, 2014). Essa proteína é considerada o principal componente na aderência transmembranosa de células epiteliais de todos os órgãos, inclusive das células epiteliais luminais mamárias (TAKEICHI, 1991). Como a maioria dos tumores de mama, tanto na mulher como na cadela, são de origem epitelial, a E-caderina tem sido intensamente estudada em sua participação na gênese deste tumor e no desenvolvimento de metástases (MATOS et al, 2006), já que a perda da forte adesão que essa proteína promove, pode desencadear a disseminação das células tumorais (SINGAL e GINDER, 1999; KNUDSEN e WHEELLOCK, 2005).

Todas as células epiteliais normais expressam a E-caderina, que é responsável por manter a integridade tecidual e o epitélio polarizado através da interação com a beta-catenina, formando o complexo E-caderina/beta-catenina. A E-caderina humana tem papel supressor da invasão tumoral, contribuindo para a adesão entre as células, uma vez que, ligando-se à beta-catenina, forma

complexos proteicos que são a base molecular da ancoragem intercelular das células com citoesqueleto. Essa união ainda mantém a beta-catenina fora do núcleo celular, impedindo-a de exercer sua função pró-mitótica. A desregulação e redução da expressão da E-caderina correlacionam-se à capacidade metastática do tumor (BEAVON, 2000)

Cadelas com carcinoma mamário invasivo, pouco diferenciado e metastático demonstram uma perda de expressão da E-caderina em algumas subpopulações de células tumorais quando comparadas com cadelas portadoras de carcinomas bem diferenciados, sugerindo que a expressão alterada de E-caderina também pode ser um processo importante na transformação maligna do tumor. Esta hipótese é suportada pela observação de que a perda de expressão de E-caderina está correlacionada com uma menor sobrevida global e menos tempo livre da doença (GAMA et al, 2008; KLOPFLEISCH et al, 2011).

Vários mecanismos que associam alterações estruturais genéticas e baixa expressão ou inativação de E-caderina com o desenvolvimento e a progressão do tumor têm sido descritos. Em humanos, estes mecanismos podem incluir a mutações no gene *CDH1*, silenciamento epigenético do mesmo, silenciamento do processo de transcrição, atuação dos micro-RNAs e glicosilação pós-transcricional, mecanismo que regula a funcionalidade da E-caderina (KLOPFLEISCH, 2011).

Pharoah et al (2001), estudaram pacientes com câncer gástrico difuso hereditário (CGDH), neoplasia frequentemente associada a alterações no gene *CDH1* e concluíram que 40% das mulheres portadoras de mutação nesse gene têm grande probabilidade de desenvolver câncer de mama lobular e o risco

combinado de câncer de estômago e câncer de mama nessas mulheres com idade superior a 80 anos é de 90%.

A inativação do *CDH1* pode ser decorrente de mutação gênica, que leva à síntese de uma proteína com atividade total ou parcialmente comprometida, ou mais frequentemente, pode decorrer da hipermetilação do promotor, um mecanismo de silenciamento epigenético (CARNEIRO, et al, 2010).

Mecanismos epigenéticos são fenômenos que alteram a expressão de genes durante o desenvolvimento e proliferação celular, no entanto, sem provocar mudanças na sequência de nucleotídeos que compõem o gene. Ocorre uma modificação na conformação espacial do DNA, alterando assim o seu funcionamento (SINGAL e GINDER, 1999). Esses mecanismos podem estar envolvidos no silenciamento do gene *CDH1* e consequentemente no impedimento da transcrição, podendo resultar na redução da expressão da E-caderina (COWIN et al, 2005).

A metilação do DNA é um dos eventos epigenéticos mais comumente encontrados no genoma dos mamíferos (SINGAL e GINDER, 1999) e ocorre pela adição de um grupo metil ao carbono 5' da citosina, formando a quinta base do DNA humano, a 5-metilcitosina, reação catalisada pela enzima DNA metil-transferase (DNMT) (SINGAL e GINDER, 1999). Nos mamíferos, o principal alvo da metilação é a citosina próxima à guanina (5'-CpG-3'). As sequências-alvo da metilação não são distribuídas de maneira uniforme no genoma, mas encontradas ao longo de regiões ricas em dinucleotídeos C e G, como as ilhas CpG e outras regiões repetitivas no genoma. As ilhas CpG são sequências de aproximadamente 200 pares de bases (pb), localizadas principalmente nas regiões promotoras dos genes *housekeeping* e também em

alguns outros genes que se expressam em tecidos específicos (ATTWOOD et al, 2002).

Silenciar um gene intacto por meio da metilação das sequências controladoras adjacentes é um evento normal do desenvolvimento, da diferenciação e da desativação do cromossomo X, mas ocasionalmente, a metilação aberrante das ilhas CpG nos promotores poderá causar uma perda patogênica da função de um gene (ATTWOOD et al, 2002).

Em um estudo com 27 linhagens de células tumorais mamárias humanas com diferentes mecanismos de inativação da E-caderina, a metilação do *CDH1* foi observada em 84% dos casos de carcinoma mamário (LOMBAERTS et al, 2006).

No entanto, os mecanismos moleculares que justifiquem a subexpressão da E-caderina ainda não foram completamente elucidados no carcinoma mamário em cães (KLOPFLEISCH et al, 2011).

Em geral, os tumores epiteliais provocam metástases pela circulação linfática primariamente para linfonodos regionais e pulmões. Com menor frequência podem ser acometidos rins, fígado, baço, coração, pele, adrenais, encéfalo, esqueleto e olhos (CASTELLANO et al, 2006; CAVALCANTI e CASSALI, 2006).

Metástases oculares provenientes de tumor de mama são bastante comuns em mulheres, porém pouco diagnosticadas clinicamente (FENTON et al, 2004). A incidência real do problema não é reconhecida, talvez por causa da maior frequência e consequências muito mais desastrosas do envolvimento metastático de órgãos vitais, como pulmão, fígado e ossos, ou pelo fato das lesões metastáticas oculares serem geralmente pequenas e assintomáticas

(FENTON et al, 2004; WICKREMASINGHE et al, 2007). No entanto, isto não minimiza a importância da investigação, pois estas lesões podem constituir marcadores de prognóstico e predizer o aparecimento de metástases associadas para o sistema nervoso central.

Em humanos, o câncer de mama é o tumor primário que mais causa metástase para as estruturas oculares (FENTON et al, 2004; KREUSEL et al, 2007). Há relatos de que, nesta espécie, mais de 75% dos casos de metástases oculares possuem também metástases no sistema nervoso central associadas (CASTELLANO et al, 2006) já que a prevalência de metástases no sistema nervoso central aumenta de 3 a 6% para 28 a 46%, após o desenvolvimento de metástases oculares (SIRIMAHARAJ et al, 2006).

É documentado que cerca de 8 a 10% dos pacientes humanos com câncer de mama irão desenvolver metástases oculares, que normalmente ocorrem após 2 a 5 anos do diagnóstico do tumor primário (BISWAS et al, 2007; SKALICKY et al, 2007). Em cães, este dado ainda é desconhecido.

Os tecidos da úvea (íris, corpo ciliar e coróide) são os mais acometidos e possuem o maior índice de eficiência metastática (percentual de comprometimento metastático em relação ao fluxo sanguíneo) de todos os tecidos do corpo (WEISS, 1992). Esta capacidade elevada da úvea, em especial da coróide, de facilitar a metástase pode estar relacionada à arquitetura das paredes dos vasos ou a outros fatores, como a competência das moléculas de adesão das células cancerosas no tumor primário, como por exemplo, a E-caderina (WICKREMASINGHE et al, 2007).

Nervo óptico, retina e vítreo, músculos extraoculares, órbita, conjuntiva, esclera e pálpebras são estruturas mais raramente acometidas (BISWAS et al,

2007; WICKREMASINGHE et al, 2007). As lesões metastáticas oculares podem ser completamente assintomáticas, a não ser que haja um comprometimento significativo da visão (FENTON et al, 2004).

Bloch e Gartner (1971) também observaram metástases oculares em 37% de 52 pacientes que morreram de câncer de mama e Font e Ferry (1976) encontraram incidência semelhante: 29% das 28 pacientes portadoras de câncer de mama desenvolveram metástases oculares.

Durante seis meses, Fenton et al (2004) avaliaram 68 mulheres com carcinoma de mama localmente avançado ou metastático buscando envolvimento ocular e concluíram que quatro pacientes (5,8%) apresentaram manifestações oftalmológicas de carcinoma de mama metastático.

Em cães, o linfoma, hemangiossarcoma, tumor venéreo transmissível, carcinomas e sarcomas são, nesta ordem, os tipos tumorais mais frequentemente relatados como causadores de metástases intraoculares (CASTELLANO et al, 2006).

A existência de um nódulo ocular unilateral é mais sugestiva de neoplasia primária, enquanto o comprometimento bilateral dos olhos geralmente ocorre na doença metastática. O exame ultrassonográfico oftalmológico é extremamente útil no diagnóstico das neoplasias oculares, sejam elas primárias ou metastáticas, especialmente quando alterações na câmara anterior impedem a visualização do segmento posterior do olho. A natureza não invasiva do exame (não há emissão de radiação nem necessidade de anestesia geral) e o baixo custo oferecem a essa técnica grande vantagem sobre as outras modalidades de diagnóstico por imagem (BAPTISTA et al, 2008).

À medida que o tempo de sobrevida do animal com câncer de mama aumenta, uma maior incidência de manifestações pulmonares ou oculares da doença metastática é esperada e o reconhecimento precoce pode ter valor diagnóstico e prognóstico e ainda ser utilizado para a tomada de decisão terapêutica, abordagem cirúrgica ou indicação de eutanásia. A avaliação de mutações estruturais e/ou alterações no padrão de expressão do gene *CDH1* podem auxiliar no entendimento das bases moleculares da carcinogênese mamária e na progressão da doença em cães, que ainda estão longe de serem elucidadas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo desse estudo foi analisar a ocorrência de metástase intraocular e pulmonar em cadelas portadoras de carcinoma mamário e correlacionar esses achados com mutação e expressão do gene de E-caderina (*CDH1*).

Objetivos específicos:

- Avaliar a existência de metástase intraocular por ultrassonografia e pulmonar por radiografia torácica em cadelas com diagnóstico de carcinoma mamário submetidas à mastectomia e ovariosalpingohisterectomia (OSH).
- Realizar o estadiamento clínico das fêmeas selecionadas.
- Determinar a sequência de nucleotídeos da região correspondente aos 16 exons do gene *CDH1* em cães.
- Avaliar o padrão de expressão relativa do gene *CDH1* por PCR em tempo real (qPCR), nos tecidos tumorais e não-tumorais.
- Avaliar o padrão de metilação do gene *CDH1*, utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase metilação-específica (MSP-PCR), nos tecidos tumorais.
- Avaliar a expressão de E-caderina por imunohistoquímica, no tecido neoplásico.
- Inferir sobre os possíveis mecanismos de alterações estruturais e de expressão do gene *CDH1* e correlacionar com dados clínicos, histopatológicos e ocorrência de metástases em busca de informações de valor diagnóstico e prognóstico.

MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO

Artigo a ser traduzido para o inglês e enviado para a revista PlosOne (já adaptado às normas de submissão do periódico).

Title:

EXPRESSION AND MUTATION OF E-CADHERIN IN FEMALE DOGS WITH MAMMARY CARCINOMA

Authors:

Luciana Moura Campos Pardini¹, José Joaquim Tilton Ranzani¹, Adriana Camargo Ferrasi², Aline Faria Galvani², Tatiany Luiza Silveira³, Maria Inês de Moura Campos Pardini².

Institution:

¹Department of Veterinary Surgery and Anesthesiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP - São Paulo State University, Botucatu - SP, Brazil.

²Blood Transfusion Center of Botucatu - Molecular Biology Laboratory, Medical School, UNESP São Paulo State University, Botucatu - SP, Brazil.

³Department of Veterinary Clinic, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP - São Paulo State University Botucatu - SP, Brazil.

Corresponding author

Maria Inês de Moura Campos Pardini. Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Distrito de Rubião Junior, s/n.

CEP: 18618-000. Botucatu, SP, Brazil.

E-mail: inespardini@gmail.com

Phone: +55 (14) 3811-6041

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

Copyright

The corresponding author has the right to grant on behalf of all authors, an exclusive license to permit this article (if accepted) to be published.

Ethical approval

This study was approved by Committee of Ethics in Research of the institutions where the samples were obtained and the project was performed. Each subject signed an informed consent.

RESUMO

A E-caderina é uma proteína transmembranosa, codificada pelo gene CDH1, que desempenha um papel importante na adesão intercelular de tecidos epiteliais. A perda da função ou expressão diminuída de E-caderina pode implicar em metástases e progressão do câncer. O presente estudo teve por objetivos inferir sobre possíveis alterações estruturais e de expressão do gene CDH1 em cadelas portadoras de carcinoma mamário e correlacionar os achados com dados clínicos, histopatológicos e ocorrência de metástases, em busca de informações de valor diagnóstico e prognóstico. Vinte e oito cadelas de diferentes raças, não-castradas, com idade superior a 5 anos, com diagnóstico de carcinoma mamário ao exame citopatológico, sem metástases pulmonares e/ou oculares, foram submetidas à mastectomia radical e ovarioparingohisterectomia (OSH), sendo reavaliadas após três e seis meses de pós-operatório. O padrão de expressão relativa do gene CDH1 em tecidos tumorais e normais, foi avaliado pelo sistema TaqMan Universal PCR Master Mix; o sequenciamento do DNA, análise das mutações e polimorfismos foram realizados a partir do sangue periférico, utilizando-se a técnica de reação de terminação em cadeia pelo kit BigDye Terminator v.3 Cycle Sequencing. Análises imunohistoquímicas foram realizadas para avaliar a expressão da E-caderina. Em 57,1% dos casos identificou-se uma menor expressão relativa do gene CDH1 através da técnica de qPCR. Em 46,5% dos casos verificou-se expressão reduzida de E-caderina pela técnica de imunohistoquímica. Foram identificados 3 histotipos tumorais: carcinoma complexo, tubulopapilífero e carcinoma em tumor misto. Em 100% dos casos de carcinoma tubulopapilífero identificou-se expressão reduzida do gene CDH1 tanto pela qPCR quanto pela imunohistoquímica. No sequenciamento do gene, 6 animais (21,4%) apresentaram mutações silenciosas nos exons 3, 7 e 13, sendo que no exon 13 pode ser observada a presença de duas variações genéticas, também silenciosas. Foi identificada também uma mutação no intron 7. Estudos desta natureza, visando análises de expressão gênica e de mutações no DNA, são relativamente raros em medicina veterinária. No entanto, as tomadas de decisões clínicas ou cirúrgicas, cada vez mais devem estar apoiadas no conhecimento das bases moleculares das doenças.

Palavras-chave: Cadelas, Carcinoma mamário, E-caderina, *CDH1*.

INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são os tumores mais comuns das cadelas não-castradas (1,2) e o carcinoma mamário é o tumor maligno de maior ocorrência (3,4).

As metástases do tumor de mama ocorrem mais frequentemente para os linfonodos regionais e pulmões (5,6). No entanto, metástases oculares, especialmente na coróide, são relativamente comuns, mas pouco diagnosticadas clinicamente. Em humanos, o câncer de mama é o tumor primário que mais causa metástase para as estruturas oculares (7,8).

A E-caderina é uma proteína transmembranosa, codificada pelo gene *CDH1*, que desempenha um papel importante na adesão intercelular de tecidos epiteliais (4,9). A perda da função ou expressão diminuída de E-caderina pode implicar em metástases e progressão do câncer (10,11).

Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivos inferir sobre possíveis alterações estruturais e de expressão do gene *CDH1* em cadelas portadoras de carcinoma mamário e correlacionar os achados com dados clínicos, histopatológicos e ocorrência de metástases, em busca de informações de valor diagnóstico e prognóstico.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Seleção das amostras

Para o estudo foram selecionadas 28 cadelas, de diferentes raças, não-castradas, com idade superior a 5 anos, com diagnóstico de carcinoma mamário ao exame citopatológico, atendidas na rotina do serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, *campus* de Botucatu. As fêmeas realizaram radiografia torácica e ultrassonografia ocular para a confirmação da inexistência de metástase para essas estruturas antes do tratamento cirúrgico e então, foram submetidas à mastectomia radical e ovariosalpingohisterectomia (OSH).

Após três e seis meses do procedimento cirúrgico, as cadelas passaram novamente por radiografia torácica e o ultrassom ocular para a pesquisa de metástases.

Fragmentos de tecido tumoral e de tecido mamário não-tumoral adjacente foram acondicionados em solução preservadora de RNA (*RNAlater solution - Life Technologies*) e

mantidos em freezer -80° até o momento da extração de DNA e RNA. Amostras de sangue periférico foram coletadas para a realização do sequenciamento do gene *CDH1*.

Análises histopatológicas e Classificação TNM

As análises histopatológicas e o estadiamento clínico foram baseados nas classificações da Organização Mundial da Saúde, citada por Misdorp et al (1999) (12) e Owen (1980) (13), respectivamente.

Análise do padrão de expressão relativa do gene *CDH1*

O RNA total foi isolado das amostras tumorais e tecido normal adjacente utilizando o *kit SV Total RNA Isolation System (Promega)* e a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se a enzima *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*, obedecendo as especificações do fabricante. Cada amostra foi submetida à PCR quantitativa com detecção em tempo real (qPCR), em termociclador automático (*ABI PRISM 7500 – Applied Biosystems*). Os valores de cada amostra foram normalizados pela razão entre os valores obtidos para o gene de interesse (*CDH1*) e para o gene de referência *ACTB* (β -actina).

Os *primers* e a sonda usados na qPCR para os genes *CDH1* e *ACTB* foram delineados pela *Applied Biosystems*. Para a amplificação foi utilizado o sistema *TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies)*, segundo as especificações do fabricante.

Para quantificação do RNA obteve-se, para cada paciente, a razão T/N, comparando a expressão gênica da amostra de tecido tumoral (T) em relação à expressão do tecido não-tumoral adjacente ao tumor (N) (14). Para valores da razão T/N maiores que 1, foi considerado um aumento da expressão de *CDH1* no tumor quando comparado ao tecido não-tumoral; os valores menores que 1 indicam redução da expressão de *CDH1* no tumor quando comparado ao tecido não-tumoral.

Sequenciamento do DNA - análise das mutações e polimorfismos

A análise da ocorrência de mutações e polimorfismos germinativos nos 16 *exons* e dois *introns* do gene *CDH1* foi determinada pelo sequenciamento do DNA extraído a partir de

amostras de sangue periférico das fêmeas, utilizando a técnica de reação de terminação em cadeia pelo kit *BigDye Terminator v.3 Cycle Sequencing – Applied Biosystems*, seguida por eletroforese capilar em plataforma *ABI 3500*, de acordo com as recomendações do fabricante.

Todos os *primers* utilizados foram desenhados *de novo*, a partir da sequência (NC_006587) depositada no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (*GenBank/NCBI*), utilizando o programa *PickPrimer Tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primerinfo.html>).

Os *primers* que flanqueiam os 16 *exons* e dois *introns* estão descritos na tabela 1:

Tabela 1. Sequência de *primers foward* e *reverse* para os 16 *exons* e dois *introns* do gene *CDH1*.

EXON	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
1	GAGAGAGAGAGGGAAGGGG	CCGCAGCCAATCAGCGG
2	AAAGGGGCTTTCTCAGGGGT	GTTTCATGCCTCCTGCCCTC
3	AGGTGCCAAGGGTAGAGAAC	GCTCTTGCTTTAATCTGCCCC
4-5	ACAACCCGATTATTAGCAGGC	CTGGCTAGGTAGGTGGGACTA
6	CTGATGCCAAACACAAGCCC	GGGGCCCAAGTAACTCTCG
7-8	TGCCCATGAGCAGCCATAAA	CTGAGCAGTGCTGACTGGAA
9	GAAGACACCAGGGGACAAGG	GCCCTCTTGATATGGCTCC
10	ACTCCCCAGTTCCTGCTAGT	ACTGGATTAGGGTGCAAGCC
11	CAGGAGAGTGAGGCAGCAAA	GCCAGAGCTTGTGCCTTTTC
12	TGTTGGAAGCAGGGAAAGCA	TGGTCTGAGGGAGGCAGTAA
13	TGCAACACTTGCCAAGCATAC	GCAGCCCAAACAGTTCCTTT
14	GCGCCGAACAGAACATGCTA	ATGGCCTTCTTGACCTGTGG
15	ATAGCATTACAGGGATCAGGCA	GGTTGAAAGCTCTCATTTCCG
16	GCTGAAAACAGTCACCTCCG	CTTATTGGTGCGGATTGCTCC

A qualidade das sequências obtidas foi analisada com o programa *Phred* (15,16), adotando-se o score 20 para a validação do sequenciamento. Para montagem das sequências consenso foi utilizado o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (17).

O mesmo programa foi utilizado para comparar as sequências consenso com a sequência referência NC_006587 obtida no *GenBank*, buscando possíveis variações genéticas.

Imunohistoquímica

As lâminas foram processadas para a imunomarcação, de acordo com a metodologia ABC (estreptoavidina-biotina-peroxidase) e submetidas às reações de recuperação antigênica, seguidas pelo bloqueio da peroxidase e da proteína endógena. Utilizou-se então o anticorpo

monoclonal primário de E-caderina (*Clone 31G7, Invitrogen*) e o anticorpo secundário (*polímero Novolink – Novocastra*), de acordo com as instruções do fabricante.

A revelação colorimétrica foi realizada com diaminobenzidina (DAB) diluído em substrato (*Dako-USA*), de acordo com as especificações do fabricante e a contra coloração feita com Hematoxilina de Mayer (*Merck*) em todas as imunomarcações.

A expressão de E-caderina foi classificada em 5 grupos, de acordo com a intensidade verificada em cada lâmina: expressão negativa (-); expressão muito baixa (1+): coloração 0-25% da lâmina em marrom/castanho, em contraposição ao azul/violeta da contracoloração (hematoxilina); baixa expressão (2+): quando 26-50% de coloração amarronzada; expressão média (3+): quando 51-75% e expressão normal (4+): quando 76-100% (18).

RESULTADOS

As características como idade, raça, estadiamento clínico, classificação histopatológica e existência de metástase, podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2. Dados clínicos, anatomopatológicos, histológicos e epidemiológicos da casuística analisada (n=28).

Idade	
Média	9,3 anos
Mediana	9 (5 a 14 anos)
Raça	
Poodle	7 (25%)
Teckel	7 (25%)
Cocker Spaniel	2 (7%)
SRD	7 (25%)
Outros ¹	5 (18%)
Cadeia mamária acometida	
Unilateral	10 (35,7%)
Bilateral	18 (64,3%)
Classificação histopatológica	
Carcinoma Complexo	9 (32%)
Carcinoma em Tumor Misto	12 (43%)
Carcinoma Tubulopapilífero	7 (25%)
Classificação TNM²	
T1N0M0	14 (50%)
T1N1M0	1 (3,6%)
T2N0M0	7 (25%)
T3N0M0	6 (21,4%)
Metástase T0³	
Linfonodal	1 (3,6%)
Ocular	0 (0%)
Pulmonar	0 (0%)
Metastase T3 eT6⁴	
Linfonodal	0 (0%)
Ocular	0 (0%)
Pulmonar	0 (0%)

¹Red Hiller, Pinscher, Chow-Chow, Pitt Bull, Yorkshire; ²Owen, 1980;

³T0: antes do procedimento cirúrgico; ⁴T3: 3 meses após a cirurgia; T6: 6 meses após a cirurgia.

Dentre as correlações significativas encontradas no presente estudo, a correlação entre expressão relativa do gene *CDH1* e a classificação TNM das 28 fêmeas estudadas, pode ser visualizada na tabela 3.

Tabela 3. Expressão relativa (qPCR) do gene *CDH1* em tumores de mama caninos distribuídos pela classificação TNM.

TNM**	EXPRESSÃO (RQ = T/N)*		
	Menos Expresso	Igual	Mais Expresso
1 e 2	5 (35,7%)	5 (35,7%)	4 (28,6%)
3 e 4	10 (77%)	0 (0%)	3 (23%)

*Razão (tumor/normal); **1: T1N0M0, 2: T1N1M0; 3: T2N0M0; 4: T3N0M0;
P = 0.0337 (associação estatisticamente significativa; Teste Exato de Fisher's).

Os resultados que se referem à expressão do gene *CDH1* tanto pela técnica de qPCR quanto pela técnica de imunohistoquímica, distribuídos pela classificação histopatológica, podem ser verificados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Expressão relativa (qPCR) do gene *CDH1* em tumores de mama caninos distribuídos pela classificação histopatológica.

Histotipo	EXPRESSÃO (RQ = T/N)*		
	Menos Expresso	Igual	Mais Expresso
Carcinoma Complexo	4 (50%)	0 (0%)	4 (50%)
Carcinoma em Tumor Misto	4 (33,3%)	5 (41,7%)	3 (25%)
Carcinoma Tubulopapilífero	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

*Razão (tumor/normal); P = 0.0092 (associação estatisticamente significativa; Teste Exato de Fisher's).

Tabela 5. Expressão da proteína *CDH1* por imunohistoquímica em tumores de mama caninos distribuídos pela classificação histopatológica.

Histotipo	IMUNOHISTOQUÍMICA*			
	1+	2+	3+	4+
Carcinoma Complexo	0 (0%)	2 (22,2%)	4(44,5%)	3 (33,3%)
Carcinoma em Tumor Misto	0 (0%)	4 (33,3%)	7(58,4%)	1 (8,3%)
Carcinoma Tubulopapilífero	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0(0%)	0 (0%)

*Intensidade de expressão: 1+ = 0-25%; 2+ = 26-50%; 3+ = 51-75% e 4+ = 76-100%;
P = 0.0009 (associação estatisticamente significativa; Teste Exato de Fisher's).

Nota-se que 100% dos casos de carcinoma tubulopapilífero apresentaram expressão reduzida do gene *CDH1* quando se utilizou a técnica de qPCR ou a técnica de imunohistoquímica.

A tabela 6 refere-se aos resultados de sequenciamento dos 16 *exons* e dois *introns* do gene *CDH1*.

Tabela 6. Sequenciamento de 13 dos 16 *exons* e um *intron* do gene *CDH1* de toda casuística analisada.

AMOSTRA	E3	E4	E5	E6	E7	I7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E16
1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	X	w	w	w
3	w	w	w	w	C>T (Y)	C>G (S)	w	w	w	w	w	w	w	w
4	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
7	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
8	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
10	w	w	w	w	C>T (Y)	C>G (S)	w	w	w	w	w	w	w	w
11	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	C>T (Y)/C>T (Y)	w	w
12	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
13	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
15	w	w	w	w	C>T (Y)	C>G (S)	w	w	w	w	w	w	w	w
16	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
17	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
18	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
19	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
20	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
21	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
23	A>G (R)	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
24	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
25	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
26	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
27	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
28	w	w	w	w	C>T (T)	C>G (G)	w	w	w	w	w	w	w	w
29	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
30	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
31	w	w	w	w	C>T (Y)	C>G (S)	w	w	w	w	w	w	w	w
32	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
33	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
34	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w

LEGENDA:

w= sem variação genética
A>G (R) Heterozigoto (R=A/G)
C>T (Y) Heterozigoto (Y=C/T)
C>T (T) Homozigoto (TT)
C>G (S) Heterozigoto (S=C/G)
C>G (G) Homozigoto (GG)

Observa-se que 6 animais (21,4%) apresentaram mutações silenciosas nos *exons* 3, 7 e 13, sendo que no *exon* 13 pode ser observada a presença de duas variações genéticas, também silenciosas. Foi identificada também uma mutação no *intron* 7 (figuras 3 a 6).

Os *exons* 1, 2 e 15 não produziram sequências de boa qualidade (serão repetidos).

DISCUSSÃO

O estudo avaliou alterações estruturais e de expressão do gene *CDH1* em cadelas portadoras de carcinoma mamário, em busca de correlações clínicas, histopatológicas e ocorrência de metástases.

A identificação de diferentes tipos tumorais na casuística estudada (tumores complexos, mistos e tubulopapilíferos) era esperado, tendo em vista que os critérios de inclusão não se restringiram a um único histotipo. A quase totalidade dos trabalhos dessa natureza, adotam esses mesmos critérios.

A condição dos linfonodos ao exame clínico-patológico foi utilizada para estabelecer o estadiamento clínico dos animais, método de grande importância como fator prognóstico, já que o tempo de sobrevivência é inferior a dois anos para 85,7% dos cães com metástases para linfonodos (19).

Nenhuma das 28 cadelas estudadas, apresentou metástase ocular visível à ultrassonografia ou metástase pulmonar visível à radiografia torácica, com 3 ou 6 meses de seguimento pós-operatório. Apenas uma cadela apresentou metástases localizadas em linfonodo axilar no momento do diagnóstico (figuras 1 e 2), sem mudanças desse parâmetro após 3 e 6 meses de acompanhamento.

A apresentação muitas vezes assintomática das metástases uveais e a falta de exames oculares de rotina para todas as pacientes com câncer de mama, torna difícil estimar a verdadeira incidência de metástases oculares tanto nas mulheres, quanto nas cadelas. Bloch e Gartner (1971) (20), em um estudo *post-mortem* com mulheres portadoras de câncer de mama relataram metástases não-diagnosticadas na coróide de 19 das 52 pacientes avaliadas (37%), demonstrando que essa afecção é frequentemente subdiagnosticada. Vale salientar também que a frequência de metástases à distância em animais é mais baixa que em humanos, possivelmente devido à frequente interrupção da evolução da doença pela eutanásia dos animais afetados por neoplasias malignas (3).

Trabalhos que avaliam o padrão de expressão gênica, de maneira geral, são mais raros na medicina veterinária, do que na medicina humana. Na literatura veterinária ainda não há relatos de estudos da expressão do gene *CDH1* no carcinoma mamário aplicando-se a

técnica de qPCR, sendo a imunohistoquímica a técnica mais utilizada até hoje para análise da expressão gênica.

O presente estudo utilizou ambas as técnicas para analisar a expressão do gene *CDH1* nos tecidos tumorais e respectivos tecidos normais adjacentes. Uma variação entre as técnicas foi encontrada, sendo que a qPCR mostrou mais sensibilidade. Esta variação poderia ser atribuída a uma real diferença de sensibilidade entre as técnicas, à subjetividade de interpretação dos padrões colorimétricos da imunohistoquímica ou ainda à possibilidade de não tradução em proteína da totalidade dos mRNAs expressos nos tecidos.

No que se refere à correlação entre expressão relativa do gene *CDH1* e a classificação TNM das 28 fêmeas estudadas, ficou evidente a diminuição da expressão da E-caderina à medida que o tumor progride.

Todas as células epiteliais normais expressam E-caderina, responsável por manter a integridade tecidual e o epitélio polarizado, formando complexos de adesão intracelular com a beta-catenina, (complexo E-caderina/beta-catenina). A E-caderina humana tem papel na adesão celular e também atua como supressora da proliferação tumoral, uma vez que, ligando-se à beta-catenina, a mantém fora do núcleo celular, impedindo-a que exerça sua função pró-mitótica. A desregulação e redução da expressão da E-caderina correlacionam-se à progressão do tumor e à capacidade metastática do mesmo (21,22).

Em um estudo com mulheres portadoras de carcinoma ductal invasivo, Makdissi et al (2009) (23), realizaram qPCR de 22 amostras pareadas (tecido neoplásico e peritumoral normal) buscando inferir sobre a expressão do gene *CDH1*. No entanto, nenhuma expressão diferencial entre o tumor primário e o tecido peritumoral correspondente foi observada. Já em um estudo de 2014 utilizando culturas celulares de neoplasias mamárias com agressivo potencial metastático *in vitro* e *in vivo*, Ziegler et al (24), identificaram expressão de *CDH1* claramente reduzida.

Matos et al (2006) (25), realizaram um estudo com 77 cadelas portadoras de tumores mamários malignos e 48% dos casos demonstraram redução da expressão de E-caderina utilizando-se a técnica de imunohistoquímica.

Em um estudo composto por mulheres portadoras de carcinoma mamário, Oka et al, (1993) (26) identificaram por meio da técnica de imunohistoquímica, uma significativa redução

da expressão de E-caderina em 53% dos 120 casos estudados, sendo que 71% dos casos de baixa expressão ocorreram em tumores de maior tamanho (T3 e T4). Nesse mesmo trabalho, tumores associados à metástase linfática ocorreram em 74% dos casos com expressão reduzida e tumores associados à metástase à distância perfizeram 86%.

Quando se correlaciona a expressão do gene *CDH1*, com a classificação histopatológica dos tumores, chama a atenção a redução de expressão encontrada na totalidade dos carcinomas tubopapilíferos, confirmados pelas técnicas de qPCR e pela imunohistoquímica.

É sabido que a diminuição temporária ou localizada da atividade da E-caderina pode ser necessária para permitir a separação de células da neoplasia primária, carreamento pelos vasos sanguíneos ou sistema linfático e invasão para locais distantes. A re-expressão de E-caderina pelas células tumorais metastáticas é necessária no novo sítio de proliferação (11). Por outro lado, no estudo realizado por Matos et al (2006) (25) com 77 cadelas, os casos de carcinoma tubulopapilífero apresentaram elevada expressão de E-caderina, quando comparados aos casos de tumores sólidos, que por sua vez, demonstraram significativa redução da expressão dessa proteína. Estes resultados sugerem que a formação de estruturas tubulares e papilares, embora neoplásica, requer um certo grau de organização morfológica, que depende em grande parte de moléculas de adesão (caderinas e cateninas), enquanto que a proliferação tumoral, na ausência de E-caderina, leva à formação não-organizada do tecido (tumores sólidos) (27).

Dados controversos apontam para a necessidade de outros estudos dessa natureza, para que se possa esclarecer o verdadeiro papel da E-caderina na definição das vias tumorigênicas envolvidas nos diferentes histotipos.

Na tentativa de determinar o mecanismo de diminuição da expressão do gene *CDH1* nos tecidos tumorais, foi investigado o processo de metilação da região promotora desse gene e a existência de mutações somáticas no DNA.

Utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase metilação-específica (MSP-PCR), o presente trabalho buscou definir o padrão de metilação da região promotora do gene *CDH1*. Após a análise, todas as amostras tumorais apresentaram um padrão de hipermetilação. A infiltração de leucócitos que fisiologicamente apresentam o gene *CDH1*

metilado nos tumores (28) pode explicar esse resultado. Portanto, não foi possível assegurar que esse padrão de metilação encontrado se referia exclusivamente às células neoplásicas (dados não mostrados).

A técnica de sequenciamento do DNA permite identificar quaisquer mutações no DNA, já descritas ou não, que podem ser silenciosas ou estarem associadas à alterações na proteína.

A mutação C>T encontrada no *exon 7*, foi a mais prevalente. Um animal apresentou-a em homozigose. Trata-se de uma mutação silenciosa, ou seja, a troca dos nucleotídeos não promove alteração do aminoácido correspondente na proteína. Chama atenção o fato de que essa mutação está sempre associada à outra, no *intron 7*. Mutações em *introns* podem desarranjar os sinais de *splicing* do transcrito primário ou de elementos reguladores, ou ainda podem ser inteiramente silenciosas. Um animal apresentou duas mutações distintas, no mesmo *exon 13*, mas ambas silenciosas. Não se pode afirmar que mutações silenciosas não tenham nenhum efeito fenotípico, visto os intrincados desdobramentos do DNA na cromatina. No entanto, não foram identificadas correlações destas mutações com nenhum dos parâmetros epidemiológicos, clínicos e histológicos analisados.

Em um estudo com 100 mulheres portadoras de carcinoma mamário lobular invasivo, Valente et al (2014) (29) realizaram o sequenciamento dos 16 *exons* do gene *CDH1* a partir de amostras de sangue periférico das pacientes e concluíram que a frequência de mutações no gene *CDH1* é relativamente baixa. Foram identificadas quatro mutações silenciosas. Uma das pacientes tinha a avó portadora de câncer gástrico. Já em um estudo semelhante, Petridis et al (2014) (30) analisaram 50 mulheres portadoras de carcinoma mamário e encontraram quatro mutações patogênicas, incluindo um *splicing* alternativo, não descrito anteriormente.

Em conclusão, o presente trabalho evidencia a diminuição da expressão de E-caderina em tumores de mama caninos, principalmente nos tumores tubulopapilíferos. Essa diminuição da expressão está, de alguma forma, relacionada à progressão do tumor, mas não se associa à ocorrência de metástases pulmonares e/ou oculares no tempo de seguimento deste estudo. Pouco provavelmente, essa alteração no padrão da expressão observado, é decorrente de mutações de ponto da região traduzida do gene *CDH1*.

Estudos desta natureza, visando análises de expressão gênica e de mutações no DNA, são relativamente raros em medicina veterinária. No entanto, as tomadas de decisões clínicas ou cirúrgicas, cada vez mais devem estar apoiadas no conhecimento das bases moleculares das doenças. Por essa razão, as sequências encontradas no presente trabalho, por seu caráter inédito, serão submetidas ao GenBank para contribuir com o conhecimento de genética da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cassali GD, Lavallo GE, De Nardi AB, Ferreira E, Bertagnolli AC, Estrela-Lima A, Alessi AC, Daleck CR, Salgado BS, Fernandes CG, Sobral RA, Amorim RL, Gamba CO, Damasceno KA (et al). Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz J Vet Pathol.* 2011; 4(2):153-180.
2. Ežerskytė A, Gintaras Z, Aidas G, Nomeda J. The retrospective analysis of mammary tumors in dogs. *Vet Med Zoot.* 2011; 53(75):3-8.
3. Queiroga F, Lopes C. Tumores mamários caninos: pesquisa de novos factores de prognóstico. *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 2002; 97(543):119-127.
4. Klopffleisch R, Von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gartner F, Gruber AD. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Vet Pathol.* 2011; 48(1):98-116.
5. Murphy S. Mammary tumours in dogs and cats. In *Practice.* 2008; 30:334-339.
6. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011; 48(1):117-1131.
7. Fenton S, Kemp EG, Harnett AN. Screening for ophthalmic involvement in asymptomatic patients with metastatic breast carcinoma. *Eye.* 2004; 18(1):38-40.
8. Kreusel KM, Bechrakis NE, Krause L, Wiegel T, Foerster MH. Incidence and clinical characteristics of symptomatic choroidal metastasis from breast cancer. *Acta Ophthalmol Scand.* 2007; 85(3):298–302.

9. Asiaf A, Ahmad ST, Aziz SA, Malik AA, Rasool Z, Masood A, Zargar MA. Loss of Expression and Aberrant Methylation of the *CDH1* (E-cadherin) Gene in Breast Cancer Patients from Kashmir. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(15):6397-6403.
10. Beavon IRG. The E-cadherin-catenin complex in tumor metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer*. 2000; 36(13):1607-1620.
11. Knudsen KA, Wheelock MJ. Cadherins and the mammary gland. *J Cell Biochem*. 2005; 95:488-496.
12. Misdorp W, Else RW, Hellmén E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *Armed Forces Institute of Pathology*. 1999; 7(1):1-59.
13. Owen LN, ed. *TNM Classification of Tumours in Domestic Animals*. 1st ed. Geneva: World Health Organization, 1980:46–47.
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-408.
15. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Res*. 1998; 8(3):175-185.
16. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 1998; 8(3):186-194.
17. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999; 41:95-98.
18. Piekarz CH, Biondo AW, Amorim RL, Rodaski S, Barros Filho IR, De Nardi AB. Expressão das caderinas nos tumores mamários. *Archives of Veterinary Science*. 2008; 13(1):13-21.
19. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol*. 2005; 133(4):246-252.
20. Bloch RS, Gartner S. The incidence of ocular metastatic carcinoma. *Arch Ophthalmol*. 1971; 85(6):673-675.
21. Beavon IR. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer*. 2000; 36(13):1607-1620.

22. Graziano F, Humar B, Guilford P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. *Ann Oncol.* 2003; 14(12):1705-1713.
23. Makdissi FB, Machado LV, Oliveira AG, Benvenuti TT, Katayama ML, Brentani MM, Osório CA, Mourão Netto M, Lyra EC, Carvalho F, Góes JC, Folgueira MA. Expression of E-cadherin, Snail and Hakai in epithelial cells isolated from the primary tumor and from peritumoral tissue of invasive ductal breast carcinomas. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42(12):1128-1137.
24. Ziegler E, Hansen MT, Haase M, Emons G, Gründker C. Generation of MCF-7 cells with aggressive metastatic potential in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat.* 2014; 148(2):269-277.
25. Matos AJ, Lopes C, Carvalheira J, Santos M, Rutteman GR, Gärtner F. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. *J Comp Pathol.* 2006; 134(2-3):182-189.
26. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M, et al. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res.* 1993; 53(7):1696-1701.
27. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 1991; 251(5000):1451-1455.
28. Lombaerts M, van Wezel T, Philippon K, Dierssen JW, Zimmerman RM, Oosting J, van Eijk R, Eilers PH, van de Water B, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br J Cancer.* 2006; 94(5):661-671.
29. Valente AL, Rummel S, Shriver CD, Ellsworth RE. Sequence-based detection of mutations in cadherin 1 to determine the prevalence of germline mutations in patients with invasive lobular carcinoma of the breast. *Hered Cancer Clin Pract.* 2014; 12(1):17.
30. Petridis C, Shinomiya I, Kohut K, Gorman P, Caneppele M, Shah V, Troy M, Pinder SE, Hanby A, Tomlinson I, Trembath RC, Roylance R, Simpson MA, Sawyer EJ. Germline CDH1 mutations in bilateral lobular carcinoma in situ. *Br J Cancer.* 2014; 110(4):1053-7.

FIGURAS

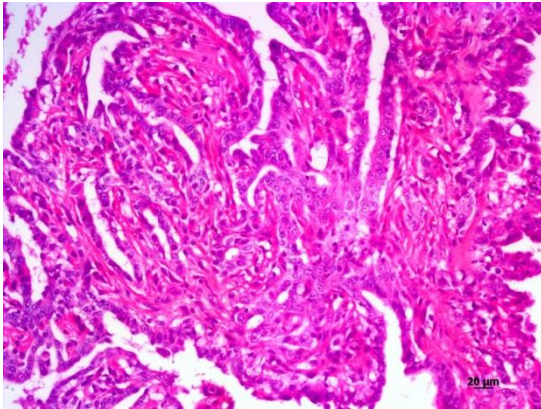


Figura 1. Fotomicrografia do paciente 10. Diagnóstico histopatológico de carcinoma em tumor misto. HE, obj 20x.

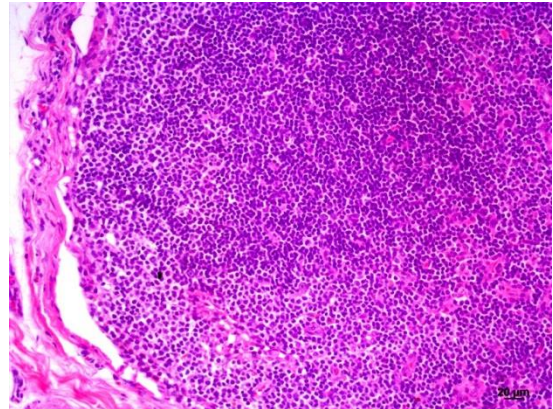


Figura 2. Fotomicrografia de linfonodo axilar direito (paciente 10), evidenciando a presença de metástase. HE, obj 20x.

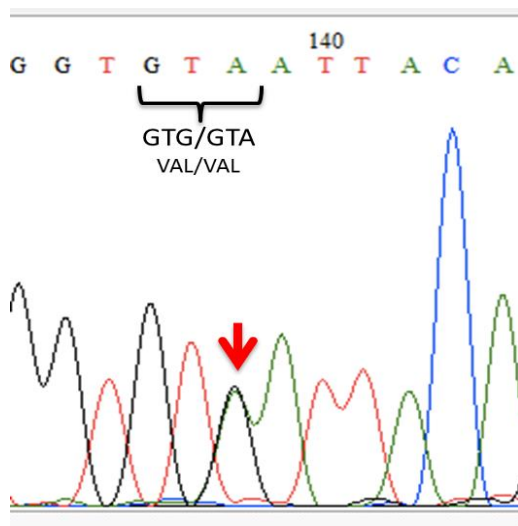


Figura 3. Cromatograma ilustrativo da sequência de nucleotídeos na região genômica equivalente ao exon 3 do gene *CDH1* canino. A sequência exibe variação genética em heterozigose (G/A), evidenciada pela sobreposição dos picos na mesma posição nucleotídica (indicada pela seta). Trata-se de uma mutação silenciosa (VAL/VAL).

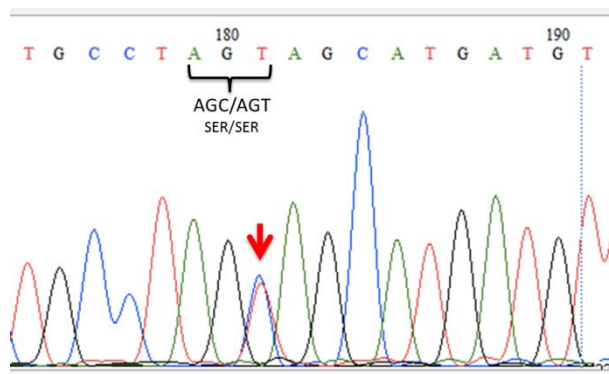


Figura 4. Cromatograma ilustrativo da sequência de nucleotídeos na região genômica equivalente ao exon 7 do gene *CDH1* canino. A sequência exibe variação genética em heterozigose (C/T), evidenciada pela sobreposição dos picos na mesma posição nucleotídica (indicada pela seta). Trata-se de uma mutação silenciosa (SER/SER).

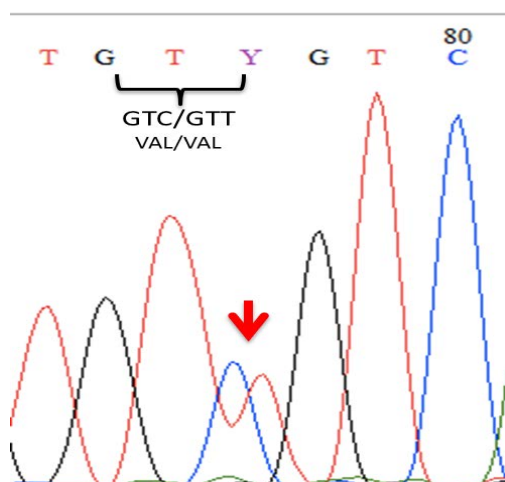


Figura 5. Cromatograma ilustrativo da sequência de nucleotídeos na região genômica equivalente ao exon 13 do gene *CDH1* canino. A sequência exibe variação genética em heterozigose (C/T), evidenciada pela sobreposição dos picos na mesma posição nucleotídica (indicada pela seta). Trata-se de uma mutação silenciosa (VAL/VAL).

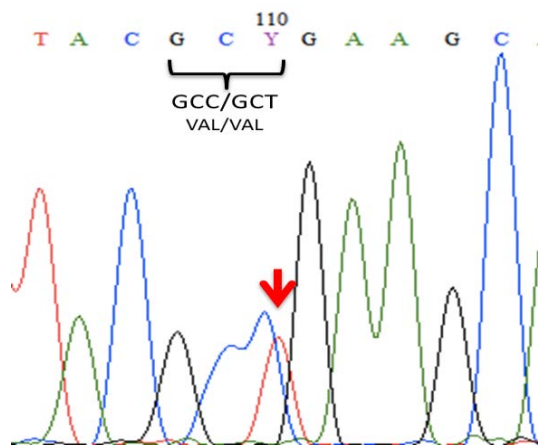


Figura 6. Cromatograma ilustrativo da sequência de nucleotídeos na região genômica equivalente ao exon 13 do gene *CDH1* canino. A sequência exibe variação genética em heterozigose (C/T), evidenciada pela sobreposição dos picos na mesma posição nucleotídica (indicada pela seta). Trata-se de uma mutação silenciosa (ALA/ALA).

CONCLUSÕES FINAIS

- Nenhuma das 28 cadelas estudadas apresentou metástase ocular visível à ultrassonografia e nem metástase pulmonar visível à radiografia torácica, com 3 ou 6 meses de pós-operatório.
- Entre as 28 fêmeas estudadas, mais da metade (57,1%) apresentou uma menor expressão relativa do gene *CDH1*.
- O padrão de hipermetilação encontrado pode ser explicado pela infiltração nos tumores por leucócitos que fisiologicamente apresentam o gene *CDH1* metilado. Portanto, não foi possível assegurar que esse padrão de metilação encontrado se referia exclusivamente às células neoplásicas.
- A correlação entre expressão relativa do gene *CDH1* e a classificação TNM das 28 fêmeas estudadas, evidenciou a diminuição da expressão da E-caderina à medida que o tumor progride.
- Quando se correlacionada a expressão do gene *CDH1*, com a classificação histopatológica dos tumores, foi encontrada uma redução de expressão na totalidade dos carcinomas tubulopapilíferos, confirmados pelas técnicas de qPCR e pela imunohistoquímica.
- Pouco provavelmente, a alteração no padrão de expressão observado, é decorrente de mutações de ponto da região traduzida do gene *CDH1*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASIAF, A.; AHMAD, S.T.; AZIZ, S.A.; MALIK, A.A.; RASOOL, Z.; MASOOD, A.; ZARGAR, M.A. Loss of Expression and Aberrant Methylation of the *CDH1* (E-cadherin) Gene in Breast Cancer Patients from Kashmir. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.15, n.15, p.6397-403, 2014.

ATTWOOD, J.T.; YUNG, R.L.; RICHARDSON, B.C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.59, n.2, p.241-257, 2002.

BAPTISTA, C.S.; FONTES-SOUSA, A.P.; FERREIRA, D.A.; HIJAR, M.V. Canine and feline intraocular neoplasms: clinic and ultrasonographic diagnosis. In: BOSPENE, E.B. Eye Cancer Research Progress. Nova Science Publishers, p. 49-99, 2008.

BEAVON, I.R.G. The E-cadherin-catenin complex in tumor metastasis: structure, function and regulation. **European Journal of Cancer**, v.36, n.13, p.1607-1620, 2000.

BISWAS, J.; HO, T.C.; BHAVSAR, K. Bilateral metastasis to the retina, choroids and optic nerve from breast cancer: a clinicopathological case. **Indian Journal of Ophthalmology**, v.55, p.71-72, 2007.

BLOCH, R.S.; GARTNER, S. The incidence of ocular metastatic carcinoma. **Archives of Ophthalmology**, v.85, n.6, p.673-675, 1971.

CARNEIRO, F.; OLIVEIRA, C.; SERUCA, R. Pathology and genetics of familial gastric cancer. **International Journal of Surgical Pathology**, v.18, n.3, p.33-36, 2010.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M. (et al). Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CASTELLANO, M.C.; MASSONE, A.R.; IDIART, J.R. Primary pulmonary adenocarcinoma metastatic to the uvea, brain and adrenal gland in a dog. **Journal of Veterinary Medicine**, v.53, n.4, p.194-197, 2006.

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão. **Clínica Veterinária**, v.11, n.61, p.56-64, 2006.

CHANG, S.; CHANG, C.; CHANG, T.; WONG, M. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.227, n.10, p.1625-1629, 2005.

CIRILLO, J. V. Tratamento quimioterápico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.26, n.3, p.325-327, 2008.

COWIN, P.; ROWLANDS, T.M.; HATSELL, S.J. Cadherins and catenins in breast cancer. **Current Opinion in Cell Biology**, v.17, p.499-508, 2005.

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

EŽERSKYTĖ, A.; GINTARAS, Z.; AIDAS, G.; NOMEDA, J. The retrospective analysis of mammary tumors in dogs. **Veterinarija ir Zootechnika (Vet Med Zoot)**, v.53, n.75, p.3-8, 2011.

FELICIANO, M.A.R.; JOÃO, C.F.; CARDILLI, D.J.; CRIVELARO, R.M.; VICENTE, W.R.R. Neoplasia mamária em cadelas – Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária: Ano IX**, n.18, 2012.

FENTON, S.; KEMP, E.G.; HARNETT, A.N. Screening for ophthalmic involvement in asymptomatic patients with metastatic breast carcinoma. **Eye**, v.18, n.1, p.38-40, 2004.

FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; CAVALCANTI, M.F.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. The relationship between tumour size and expresion of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.193, p.1-6, 2009.

FONT, R.L.; FERRY, A.P. Carcinoma metastatic to the eye and orbit III. A clinicopathological study of 28 cases metastatic to the orbit. **Cancer**, v.38, n.3, p.1326–1335, 1976.

GAMA, A.; PAREDES, J.; GARTNER, F.; ALVES, A.; SCHMITT, F. : Expression of E-cadherin, P-cadherin and beta-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. **Veterinary Journal**, n.177, p. 45-53, 2008.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p. 117-131, 2011.

KIRKNESS, E.F.; BAFNA, V.; HALPERN, A.L.; LEVY, S.; REMINGTON, K.; RUSCH, D.B.; DELCHER, A.L.; POP, M.; WANG, W.; FRASER, C.M.; VENTER, J.C. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. **Science**, v.301, n.5641, p.1898-1903, 2003.

KLOPFLEISCH, R.; VON EULER, H.; SARLI, G.; PINHO, S.S.; GÄRTNER, F.; GRUBER, A.D. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p.98-116, 2011.

KNUDSEN, K.A.; WHEELLOCK, M.J. Cadherins and the mammary gland. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.95, p.488-496, 2005.

KREUSEL, K.M.; BECHRAKIS, N.E.; KRAUSE, L.; WIEGEL, T.; FOERSTER, M.H. Incidence and clinical characteristics of symptomatic choroidal metastasis from breast cancer. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v.85, p.298-302, 2007.

LABELLE, A.; LABELLE, P. Canine ocular neoplasia: a review. **Veterinary Ophthalmology**, v.16, supp.1, p.3-14, 2013.

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.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p.619-636.

LOMBAERTS, M.; MIDDELDORP, J.W.; VAN DER WEIDE, E.; PHILIPPO, K.; VAN WEZEL, T.; SMIT, V.T.H.B.M., CORNELISSE, C.J.; CLETON-JANSEN, A.M. Infiltrating leukocytes confound the detection of E-cadherin promoter methylation in

tumors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.319, p.697-704, 2004.

LOMBAERTS, M.; VAN WEZEL, T.; PHILIPPO, K.; DIERSSSEN, J.W.F.; ZIMMERMAN, R.M.E.; OOSTING, J.; VAN EIJK, R.; EILERS, P.H.; VAN DE WATER, B.; CORNELISSE, C.J.; CLETON-JANSEN, A.M. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. **British Journal of Cancer**, v.94, p.661-671, 2006.

MATOS, A.J.F.; LOPES, C.; CARVALHEIRA, J.; SANTOS, M.; RUTTEMAN, G.R.; GÄRTNER, F. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. **Journal of Comparative Pathology**, v.134, p.182-189, 2006.

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

MURPHY, S. Mammary tumours in dogs and cats. **In practice**, v.30, n.6, p.334–339, 2008.

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

OWEN, L. N. A comparative study of canine and human breast cancer. **Investigative and Cell Pathology**, v.2, n.4, p.257-275, 1979a.

PHAROAH, P.D.; GUILFORD, P.; CALDAS, C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in *CDH1* (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. **Gastroenterology**, v.121, n.6, p.1348-1353, 2001.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos: pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.97, n.543, p.119-127, 2002.

RESTUCCI, B.; MAIOLINO, P.; MARTANO, M.; ESPOSITO, G.; DE FILIPPIS, D.; BORZACCHIELLO, G.; LO MUZIO, L. Expression of beta-catenin, E-cadherin and APC in canine mammary tumors. **Anticancer Research**, v.27, n.5A, p.3083-3089, 2007.

RIVERA, P.; VON EULER, H. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p. 132-146, 2011.

SINGAL, R.; GINDER, G.D. DNA methylation. **Blood**, v.93, n.12, p.4059-4070, 1999.

SIRIMAHARAJ, M.; HUNYOR, A.P.; CHAN, W.C.; ARNOLD, J. Unusual ocular metastasis from breast cancer. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v.34, n.1, p.74-76, 2006.

SKALICKY, S.E.; HIRST, L.W.; CONWAY, R.M. Metastatic breast carcinoma presenting as a conjunctival lesion. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v.35, n.8, p.767-769, 2007.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, n.3, p.573–596, 2003.

SWITONSKI, I.; SZCZERBAL, J.; NOWACKA, M. The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics. **Journal of Applied Genetics**, v.45, n.2, p.195-214, 2004.

TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science**, v.251, p.1451-1455, 1991.

WEIGELT, B.; PETERSE, J.L.; VAN 'T VEER, L.J. Breast Cancer Metastasis: Markers and Models. **Nature Reviews Cancer**, v.5, n.8, p.591-602, 2005.

WEISS, L. Comments on haematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. **Clinical and Experimental Metastasis**, v.10, p.191–199, 1992.

WICKREMASINGHE, S.; DANSINGANI, K.K.; TRANOS, P.; LIYANAGE, S.; JONES, A.; DAVEY, C. Ocular presentations of breast cancer. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v.85, p.133-142, 2007.

WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 4.ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, p.512-534, 2007.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.1, 2001.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha de Anamnese



FICHA DE ANAMNESE - NEOPLASIA MAMÁRIA

IDENTIFICAÇÃO

DATA: _____
NOME DO ANIMAL _____ RG: _____ SEXO: _____ IDADE: _____
RAÇA: _____ PELAGEM: _____ PESO: _____

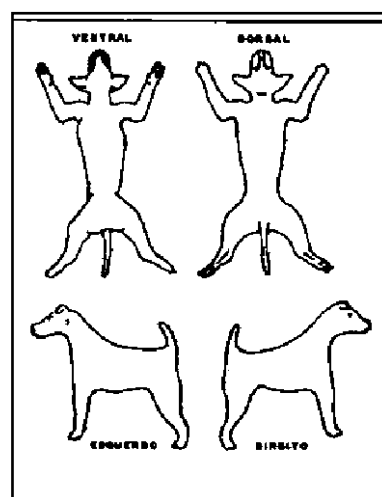
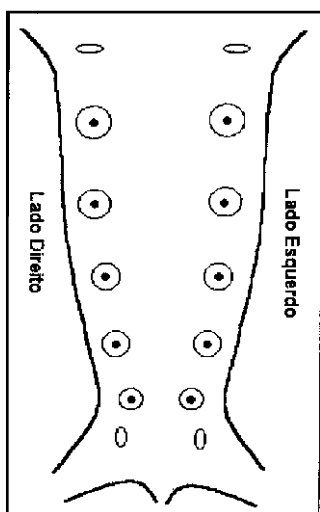
NOME DO PROPRIETÁRIO: _____
ENDEREÇO: _____
BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CPF: _____
TELEFONES: _____

HISTÓRICO

- O animal já apresentou alguma outra neoplasia? _____
Se sim, qual? _____
- Há quanto tempo notou o nódulo mamário? _____
- O animal temaios regulares? _____
- Quando foi o último cio? _____
- Já apresentou pseudogestação? _____
- Foi feito uso de anticoncepcional? _____
Se sim, qual? Quantas veze _____
- Apresenta corrimento vaginal ? _____
- Já apresentou piometra? _____
- O animal já teve cria? _____
Se sim, quantas? Quando foi a última? _____
- O animal teve algum aborto? _____
Se sim, há quanto tempo? _____
- Qual a dieta que o animal vem recebendo? _____

EXAME FÍSICO

- | | | | |
|----------------------------|-------------------------|-------|-------|
| ➤ CONDIÇÃO CORPORAL | Magro | Ideal | Obeso |
| ➤ MAMAS SUPRANUMERÁRIAS | Não | | Sim |
| ➤ EDEMA DE MEMBROS | Não | | Sim |
| ➤ LINFONODOS ACOMETIDOS | _____ | | |
| ➤ CARACTERÍSTICAS DO TUMOR | _____ | | |
| | Tamanho _____ | | |
| | Consistência _____ | | |
| | Coloração _____ | | |
| | Presença de cisto _____ | | |
| ➤ MAMAS ACOMETIDAS | _____ | | |



- DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO: _____
- OBSERVAÇÕES: _____
- _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização dos procedimentos de OSH e mastectomia unilateral, referentes ao Projeto de Pesquisa intitulado “Análise da ocorrência de metástase intraocular em cadelas portadoras de carcinoma mamário e correlação com mutação e expressão de E-caderina”, de responsabilidade de Luciana Moura Campos Pardini, sob orientação do Prof. Dr. José Joaquim Tilton Ranzani.

Declaro estar também ciente de que, no caso de não comparecimento aos retornos estipulados pelo responsável, será cobrada a **totalidade** dos procedimentos anestésicos e cirúrgicos realizados no animal.

Nome do animal: _____

Nome do Responsável: _____

CPF: _____ Data: ____ / ____ / ____

Assinatura: _____

Anexo 3. Extração de RNA

SV TOTAL RNA ISOLATION SYSTEM – WIZARD – PROMEGA

OBS: ANTES DE INICIAR O PREPARO DAS AMOSTRAS:

- Aquecer o termobloco à 70°C;
- Observar se há solução de DNase I previamente diluída;

1. Macerar um fragmento de tecido descongelado com nitrogênio líquido;
2. Adicionar 175µl de RNA Lysis Buffer ao tecido lisado;
3. Adicionar 350µl de RNA Dilution Buffer (AZUL) ao tecido lisado;
4. Homogeneizar por inversão de 3 à 4 vezes;
5. Aquecer em termobloco à 70°C por 3 minutos;

OBS: NÃO ultrapassar os 3 minutos de incubação.

6. Centrifugar por 10 minutos à 14.000g;
7. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5mL;

OBS: CUIDADO para não pipetar os restos celulares do fundo do tubo.

8. Adicionar 200µl de Etanol 95% ao sobrenadante e misturar por pipetagem;
9. Transferir a mistura para a mini-coluna;
10. Centrifugar por 1 minuto à 14.000g;
11. Descartar o líquido do tubo coletor;
12. Adicionar 600µl de RNA Wash Solution no centro da mini-coluna;
13. Centrifugar por 1 minuto à 14.000g e descartar o líquido do tubo coletor

OBS: Preparar a solução abaixo somente no momento de seu uso.

14. Preparo da solução de DNase I, suficiente para 1 amostra: 40µl de Yellow Core Buffer; 5µl de MnCl₂ ; 5µl da Enzima DNase I. Misturar esta solução por pipetagem.

OBS: O volume de solução a ser preparada, deve ser suficiente para as amostras, EVITAR desperdícios.

15. Adicionar 50µl da solução de DNase I no centro da mini-coluna;
16. Incubar por 15 minutos à temperatura ambiente;
17. Adicionar 200µl de DNase Stop Solution e centrifugar por 1 minuto à 14.000g;
18. Adicionar 600µl de RNA Wash Solution e centrifugar por 1 minuto à 14.000g;
19. Desprezar o líquido do tubo coletor;
20. Adicionar 250µl de RNA Wash Solution e centrifugar por 2 minutos;
21. Transferir a mini-coluna para um tubo de 1,5mL e eluir o RNA em 100µl de Água Nuclease – free;
22. Centrifugar por 1 minuto à 14.000g;
23. Armazenar o RNA extraído no freezer -80°C.

Anexo 4. Síntese de cDNA*HIGH CAPACITY cDNA REVERSE TRANSCRIPTION KIT – APPLIED BIOSYSTEMS**Data:* _____*Responsável:* _____

Reagentes	Mix para 1 amostra	Mix para N amostras
Água RNase free	4,2µL	
RT Buffer 10x	2,0µL	
DNTP 25x	0,8µL	
Random Primer	2,0µL	
Enzima Multiscribe	1,0µL	
Total	10,0µL	

Preparar o MIX no fluxo laminar. Aliquotar 10µL em tubos eppendorf (0,2 ml) numerados corretamente.

As amostras devem ser adicionadas FORA do fluxo (sala pré). Serão adicionados 10µL de amostra ao MIX. Homogeneizar bem com a ponteira.

CICLAGEM:

Step 1 (n=1)	Step 2 (n=1)	Step 3 (n=1)	Step 4 (n=1)
25°C – 10 minutos	37°C - 2 horas	85°C – 5minutos	4°C - infinito

Anexo 5. PCR com detecção em Tempo Real (qPCR)

TAQMAN UNIVERSAL PCR MASTER MIX - LIFE TECHNOLOGIES

REAÇÃO DE qPCR

REAGENTES	VOLUME	MIX PARA Cdh1 Cão (N° DE AMOSTRAS)
MASTER MIX 5X	10,0	
ASSAY	1,0	
c-DNA	2,0	
H2O	7,0	
VOLUME TOTAL	20µL	

Pipetar 18µL do MIX em cada poço da placa e 2,0µL de c-DNA= 20µL de reação total.

Anexo 6. Extração de DNA

DNEASY BLOOD AND TISSUE KIT - QIAGEN

OBS: ANTES DE INICIAR O PREPARO DAS AMOSTRAS:

- Aquecer o termobloco à 56°C;
- Verificar se o etanol foi adicionado nos tampões AW1 e AW2.

1. Retirar as amostras do freezer -80°C apenas no dia da extração. Aguardar as amostras de tecidos descongelarem e colocá-las num microtubo de 1,5ml ou de 2,0ml;
2. Macerar um fragmento de tecido descongelado com nitrogênio líquido;
3. Adicionar 180µL de buffer ALT às amostras e macerar;
4. Adicionar 20 µL de proteinase K;
5. Vortexar dando pulsos e incubar a 56°C no termobloco por no mínimo 3 horas;
6. Vortexar por 15 segundos;
7. Adicionar 200 µL de buffer AL e vortexar;
8. Adicionar 200 µL de etanol absoluto e vortexar novamente;
9. Transferir o conteúdo para a coluna e centrifugar a 8000 rpm por 1 min;
10. Descartar o líquido do tubo coletor;
11. Adicionar 500 µL de buffer AW1 e centrifugar a 8000 rpm por 1 min;
12. Adicionar 500 µL de buffer AW2 e centrifugar a 14.000 rpm por 3 min;
13. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um tubo de 1,5 mL;
14. Adicionar 100 µL de buffer AE e incubar por 1 min a temperatura ambiente e centrifugar a 8000 rpm por 1 min (1ª passagem);
15. Transferir a coluna para um outro tubo de 1,5 ml e adicionar novamente 100µL de buffer AE e incubar por 1 min a temperatura ambiente e centrifugar a 8000rpm por 1 min (2ª passagem).

Anexo 7. Sequenciamento*KIT BIGDYE TERMINATOR V.3 CYCLE SEQUENCING – APPLIED BIOSYSTEMS***REAÇÃO DE MARCAÇÃO FLUORESCENTE****Responsável:****Data:****Amostras:**

Mix (µL)	1	0
H2O	4	0
Buffer	1,5	0
Big Dye Terminator V3.1	0,5	0
Primer F; Primer R	1	0
Volume total	7	0

ALIQUOTAR MIX: 7,0µL**ALIQUOTAR DNA: 3µL**

CICLAGEM		
STEP 1 (n=1)	STEP 2 (n=40)	STEP 3 (n=1)
95°C 5 min.	95°C 10seg 1°/S até 50°C (-45) 50°C 10seg. 60°C 4min.	4°C infinito

Termociclador: MJ**Programa: NS5BSEQ**

Anexo 8. Protocolo de Purificação das sequencias obtidas
INVISORB FRAGMENT CLEAN UP - STRATEC

1. Ligação dos fragmentos de PCR

A. Para “mix” de PCR até 50 µL:

Adicionar 250µL de *Binding Buffer* à amostra de PCR e homogeneizar com a ponteira ou vortexando.

Transferir completamente a amostra ao *Spin Filter* e centrifugar por 3 minutos a 12.000 rpm.

B. Para “mix” de PCR > 50 µL até 100 µL:

Adicionar 500 µL de *Binding Buffer* à amostra de PCR e homogeneizar com a ponteira ou “vortexando”.

Transferir completamente a amostra ao *Spin Filter* e centrifugar por 1 minuto a 12.000 rpm.

Remover o filtrado e centrifugar novamente por 2 minutos.

2. Eluição dos fragmentos de PCR

Posicione o *Spin Filter* a um novo tubo coletor de 1.5 ml.

Adicionar no mínimo 10 µL de *Elution Buffer* (ou ddH₂O) diretamente no centro do *Spin Filter*.

Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar por 1 minuto a 10.000 rpm.

Anexo 9. Protocolo de Imunoistoquímica – Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada (LPIC) – FMVZ – UNESP – Botucatu

1. Desparafinização:

30min xilol I; 15 min no xilol II e III; 3 min álcool absoluto I, II, III, 95, 70.

Lavar em H₂O deionizada 10x.

2. Recuperação antigênica:

500ml água deionizada na Pascal, Citrato na cuba com as lâminas.

Deixar esfriar por 20 minutos a temperatura ambiente.

Lavar 10x em H₂O deionizada.

3. Bloqueio da peroxidase:

30min (184ml metanol + 16 ml de H₂O₂).

Lavar com Tris Tampão duas vezes por 5 min.

4. Bloqueio de proteína:

200ml H₂O deionizada + 16g de molico (8%).

Lavar com Tris Tampão duas vezes por 5 min.

Secar lâminas com papel filtro e circular o material com caneta para imunoistoquímica.

5. Incubação (over night):

100ul AC primário em cada lâmina geladeira.

Lavar laminas três vezes com Tris Tampão e secar.

100ul AC secundário (Kit Novo Link).

Preparar DAB 15min antes (01 ml substrato para 1 gota DAB) por 5 minutos, lavar com Tris.

Hematoxilina Harris por 01 minuto e lavar em água corrente por 05 minutos

Bateria de montagem: 3minutos em cada (álcool 70, 95, absoluto I e II, Xilol I, II e III)

Montar com entellan.