

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DETECÇÃO DE VARIANTES GERMINATIVAS NO PLASMA
DE CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS POR
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

Jéssica Rodrigues de Oliveira
Médica Veterinária

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DETECÇÃO DE VARIANTES GERMINATIVAS NO PLASMA
DE CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS POR
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

Jéssica Rodrigues de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Coorientadores: Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos

Zuccari

Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutora em Medicina Veterinária, área de
Clínica Médica

2020

O48d

Oliveira, Jéssica Rodrigues de

Detecção de variantes germinativas no plasma de cadelas com neoplasias mamárias por sequenciamento de nova geração / Jéssica Rodrigues de Oliveira. -- Jaboticabal, 2021

86 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Aureo Evangelista Santana

Coorientador: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

1. Medicina veterinária. 2. Oncologia. 3. Mamas Câncer. 4. Cães. 5. Genética molecular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DETECÇÃO DE VARIANTES GERMINATIVAS NO PLASMA DE CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

AUTORA: JÉSSICA RODRIGUES DE OLIVEIRA

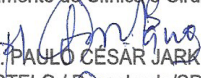
ORIENTADOR: AUREO EVANGELISTA SANTANA

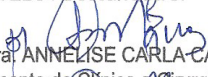
COORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

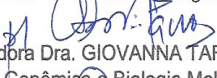
COORIENTADORA: DEBORA APARECIDA PIRES DE CAMPOS ZUCCARI

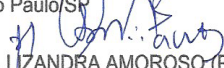
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. PAULO CÉSAR JARK (Participação Virtual)
UNICASTELO / Descalvado/SP


Profa. Dra. ANNELEISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisadora Dra. GIOVANNA TARDIN TORREZAN (Participação Virtual)
Grupo de Genômica e Biologia Molecular do Centro Internacional de Pesquisa - A. C. Camargo Cancer Center - CIPE / São Paulo/SP


Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de dezembro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Jéssica Rodrigues de Oliveira – nascida em 22 de dezembro de 1986, em Uberlândia-MG. Filha de Edson Eduardo Rodrigues de Oliveira e Giani Degane. Médica Veterinária formada pela Universidade Federal de Uberlândia, MG, em agosto de 2010. Concluiu o Programa de Residência Uniprofissional em Saúde na área de Clínica Médica de Pequenos Animais, junto ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, MG, em fevereiro de 2014, sob orientação do Prof. Dr. Fernando Antônio Ferreira. Em março de 2014, iniciou o curso de Mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV/UNESP (área de concentração em Clínica Médica Animal), sob orientação da Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, obtendo o título de mestre em julho de 2016. Atualmente, doutoranda do Curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Animal da mesma instituição, sob orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana.

“Não há progresso sem esforço, vitória sem luta, aperfeiçoamento sem sacrifício, assim como não existe tranquilidade sem paciência.”

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a Deus, por me proporcionar saúde, amparar e guiar meus passos para conseguir realizar mais esta etapa da minha vida. Aos meus pais, Edson e Giani, meu irmão Emerson e meu noivo Felipe, pela paciência, apoio e incentivo constante durante toda trajetória. A minha sobrinha Valentina Lino Oliveira pelos bons momentos de descontração. Aos meus bons, velhos e novos amigos, Fabiana Cirino, Larisse Tomaz, Amanda Bizare e Oscar Sierra. Ao meu psicólogo Rafael, por me proporcionar o autoconhecimento e o autocuidado. Aos meus cães e animais que me incentivam a estudar e buscar mais conhecimento para que possa cuidar e amenizar sofrimento deles e de seus tutores.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, pela oportunidade, pelo apoio e por acreditar em mim, possibilitando realizar mais esta etapa da minha vida acadêmica;

À minha coorientadora, Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, que foi fundamental para a realização deste estudo, minha eterna gratidão. Sempre atenciosa, otimista e disposta a ajudar.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi, pelo apoio e por autorizar a participar do atendimento no Setor de Oncologia veterinária da FCAV/UNESP e na inclusão de animais atendidos no projeto neoplasia mamária a este estudo.

Ao Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC) da Faculdade de Medicina de Rio Preto, onde foi realizada uma das etapas principais deste estudo. Em especial à Jucimara Colombo e à Francine, sem nosso trabalho em conjunto nada teria sido possível.

Ao Prof. Dr. Luiz Coutinho e à técnica Marcela do Departamento de Biotecnologia Animal da Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ-USP) pela parceria construída e por permitir acompanhar as etapas fundamentais do projeto.

Ao Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática (LMMB), em especial o Prof. Dr. Tiago Henrique, pela parceria construída.

À professora Annelise Carla Camplesi e Dra Livia Semolin pela composição da banca de qualificação e pelas excelentes contribuições.

Aos pós-graduandos Bruna Firmo, Lucas Amoroso, Nathan Cruz, Fabiana Cirino e Jardel pela importante colaboração no projeto e nas análises dos dados.

Aos técnicos, residentes, pós-graduandos do Laboratório de Patologia Clínica e do Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel. Em especial Frederico Ovinha, Ana Panosso, Patrícia Jábali, Letícia Orsini, Milena Magrin e Noelia pela colaboração, parceria e amizade.

Aos animais, veterinários, tutores e todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

A todos, meus agradecimentos pelo apoio, amizade e compreensão.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel pela oportunidade, acolhida e apoio na realização deste estudo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento desta pesquisa. Processo FAPESP 17/15006-5 (auxílio regular).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

SUMÁRIO

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Figuras.....	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Neoplasias mamárias em cadelas	3
2.2 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	6
2.3 Testes genéticos e o câncer de mama.....	8
2.4 Genes de alta penetrância (<i>BRCA1, BRCA2, TP53, CDH1, STK11</i>).....	11
2.5 Genes de moderada penetrância (<i>ATM, PALB2</i>)	16
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivos Gerais	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Comitê de Ética.....	19
4.2 Animais e caracterização das amostras.....	19
4.3 Obtenção do plasma sanguíneo	20
4.4 Coleta do fragmento tumoral.....	21
4.5 Extração do DNA livre circulante.....	21
4.6 Extração do DNA de fragmentos tumorais	23
4.7 Preparo da biblioteca para o sequenciamento de nova geração	25
4.7.1 Preparo do DNA	25
4.7.2 Hibridização das amostras de DNA	30
4.7.3 Captura do DNA das amostras ligadas as sondas.....	31
4.7.4 Amplificação da biblioteca capturada.....	32
4.8 Preparo do <i>pool</i> de amostras para o sequenciamento	33
4.9 Sequenciamento das amostras.....	33
4.10 Análises bioinformáticas	34
4.10.1 Controle de qualidade	34
4.10.2 Alinhamento e detecção de variantes	34
4.10.3 Predição de impacto das variantes.....	35
4.11 Análises Estatísticas.....	36
5 RESULTADOS	36
5.1 Perfil epidemiológico e clínico-patológico das cadelas	36
5.2 Identificação de variantes através do sequenciamento de nova geração	38
5.3 Classificação das variantes <i>moderate</i> de acordo com os algoritmos <i>in silico</i>	39
5.4 Variantes <i>moderate</i> identificadas nos genes de alta penetrância	42
5.5 Variantes <i>moderate</i> identificadas nos genes de moderada penetrância.....	45
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÕES.....	58
8 REFERÊNCIAS	59
Considerações Finais.....	71
Apêndices.....	73



Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
Autarquia Estadual – Lei nº 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal nº 74.179 de 14/06/74)



LICENÇA CEUA 04/2017

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO DE PROJETO APROVADO

(DE ACORDO COM ORIENTAÇÃO TÉCNICA CONCEA Nº 08 DE 18 DE MARÇO DE 2016)

Certificamos que a proposta intitulada “**Marcadores tumorais em biópsia líquida- Estudo dos mecanismos de resistência por bloqueio do reparo do DNA- Análise comparativa**”, protocolo FAMERP nº **001-003673/2017**, em 04 de Setembro de 2017, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, que envolve a produção/ manutenção/utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FAMERP (CEUA-FAMERP) em reunião de 27 de Setembro de 2017.

FINALIDADE	Pesquisa
VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO	10/10/2017 a 10/10/2019
ESPÉCIE	Canina
NÚMERO DE ANIMAIS	40
PESO/IDADE	Diversos
SEXO	Fêmeas
ORIGEM	Das coletas das amostras de sangue e biópsia tumoral

São José do Rio Preto, 04 de Outubro de 2017.

Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva
Presidente CEUA

Renato Ferreira da Silva
Prof. Livre Docente
CRM-SP 63.607

(Portaria FAMERP 109, de 28 de outubro de 2014 – DOESP de 05 de novembro de 2014, Poder Executivo – Seção I, 124(209) – 57)

DETECÇÃO DE VARIANTES GERMINATIVAS NO PLASMA DE CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

RESUMO - O câncer de mama é uma das neoplasias malignas mais incidentes em mulheres e cadelas. Em mulheres, sabe-se que mutações patogênicas herdadas nos genes de alta penetrância podem estar associadas ao risco elevado da doença, à resistência a terapias e ao prognóstico reservado ou ruim. Em cadelas, existem muitos dados divergentes sobre o envolvimento dos genes de alta penetrância (*BRCA1* e *BRCA2*) com a carcinogênese mamária e sobre a verdadeira patogenicidade das variantes detectadas. Dessa forma, o objetivo principal deste estudo foi detectar variantes germinativas nos genes de alta e moderada penetrância associados ao câncer de mama em mulheres no plasma de cadelas por meio do sequenciamento de nova geração (NGS). Para tanto, foram coletadas vinte amostras de sangue provenientes de dez cadelas recém diagnosticadas com neoplasias de glândula mamária (*RD*), cinco cadelas mastectomizadas (*MAST*) e cinco cadelas sem neoplasia (*CTR*). Posteriormente, foram realizadas as etapas de extração do DNA livre circulante (plasmático), construção da biblioteca utilizando um painel de genes específicos associados ao câncer de mama em mulheres, incluindo os genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *STK11*, *TP53*, *PALB2* e *ATM*, e, por fim, análise bioinformática para detecção de variantes: polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), deleções e inserções (*indels*). Foram detectadas 218 variantes no total, sendo 32,56% (n=71) em regiões codificantes e 13,76% (n=30) classificadas como de moderado impacto, a maioria do tipo *missense*. Dentre os genes de alta penetrância, o gene *BRCA2* foi o que mais apresentou variantes, sendo identificados onze SNPs e dois *indels*, dessas, destacaram-se p.Thr1425Pro e p.Leu2307del, que foram classificadas como possivelmente patogênicas pelos programas de predição *in silico*. Em relação aos genes de moderada penetrância, foi identificado um quantitativo menor de variantes, quando comparados aos genes de alta penetrância e, dentre os genes avaliados, o *PALB2* merece evidência, pois foram detectadas duas novas variantes possivelmente patogênicas: p.Ala949Val e p.Pro590_Val595delinsLeu. Assim, o sequenciamento de nova geração permitiu identificar grande quantidade de variantes, ainda de significado incerto, nos genes de predisposição ao câncer de mama, e essa condição parece ser semelhante em mulheres. São necessários estudos adicionais para validar as variantes identificadas em cadelas com câncer de mama para que, futuramente, seja possível proporcionar tratamento personalizado às pacientes.

Palavras-chaves: *BRCA1*, *BRCA2*, genes, polimorfismos de nucleotídeo único, *indels*, câncer de mama em cães

DETECTION OF GERMLINE VARIANTS IN THE PLASMA OF FEMALE DOGS WITH MAMMARY NEOPLASMS USING NEXT GENERATION SEQUENCING

ABSTRACT - Breast cancer is one of the most common malignant tumors in women and dogs. In women, pathogenic mutations inherited in high penetration genes are associated with increased risk of the disease, resistance to therapies and poorer prognosis. In dogs, there are many divergent data involving high penetration genes (*BRCA1* and *BRCA2*) role in breast carcinogenesis and on true pathogenicity of the detected variants. Therefore, the main objective of this study was to detect germline variants in the genes of high and moderate penetrance associated with breast cancer in women in female dogs plasma using next generation sequencing (NGS). Blood from 20 female dogs were sampled: 10 newly diagnosed with mammary gland neoplasms (ND), 5 mastectomized (MAST) and 5 without neoplasm (CTR). Subsequently, the steps for extracting free circulating (plasmatic) DNA were performed, building the library using a panel of specific genes associated with breast cancer in women, including the genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *STK11*, *TP53*, *PALB2* and *ATM*, and, at last, bioinformatics analysis for variant detection: single nucleotide polymorphisms (SNPs), and deletions and insertions (*indels*). 218 variants were detected, 32.56% (n=71) in coding regions, and 13.76% (n = 30) classified as moderate impact, mostly the missense type. Among the high penetration genes, the *BRCA2* gene was the one with the most variants – 11 SNPs and 2 *indels* being identified – and the variants p.Thr1425Pro and p. Leu2307del stand out, being classified as possibly pathogenic by *in silico* prediction programs. Regarding the genes of moderate penetrance, a smaller number of variants were identified when compared to the genes of high penetrance, and, among the evaluated genes, *PALB2* deserves attention, as 2 new possibly pathogenic variants were detected: p.Ala949Val and p.Pro590_Val595delinsLeu. Thus, new generation sequencing allowed the identification of a large number of variants, still of uncertain significance, in the breast cancer predisposition genes and this condition appears to be similar in women. Additional studies are needed to validate the identified variants in female dogs patients with breast cancer in order to provide them with personalized treatment in the future.

Keywords: *BRCA1*, *BRCA2*, genes, single nucleotide polymorphisms, *indels*, mammary gland neoplasms in dogs

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Classificação Histopatológica das Neoplasias mamárias caninas. Modificada de Misdorp et al. (1999), proposta por Cassali et al. (2014).	5
Tabela 2. Dados epidemiológicos e clínico-patológicos das cadelas atendidas em clínicas particulares da cidade de São José do Rio Preto e no Hospital veterinário FCAV/UNESP/Jaboticabal, no período de Julho a Outubro de 2018.	37
Tabela 3. Variantes <i>moderate</i> identificadas em genes de predisposição ao câncer de mama no plasma de cadelas (n=20) através do sequenciamento de nova geração.	41
Tabela 4. Ocorrência de variantes nos genes de alta penetrância detectadas no plasma dos diferentes grupos estudados (<i>RD, MAST, CTR</i>)	42
Tabela 5. Ocorrência de variantes nos genes de moderada penetrância detectadas no plasma dos diferentes grupos estudados (<i>RD, MAST, CTR</i>)	45
Tabela 6. Análise individual das cadelas portadoras de variantes conflituosas e possivelmente patogênicas classificadas de acordo com os algoritmos in silico.	47

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Sistema utilizado para extração de DNA livre circulante do plasma <i>QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System e Vacuum Pump</i> (Qiagen®).....	22
Figura 2. Visão geral da extração do DNA Livre circulante por meio do <i>kit QIAmp DSP Circulating Nucleic Acid</i> (Qiagen®). Adaptado do Manual Qiagen®	23
Figura 3. Visão geral da extração do DNA tumoral por meio do <i>kit AllPrep DNA/RNA/Protein Mini</i> (Qiagen®). Adaptado do Manual Qiagen®.....	24
Figura 4. Fluxograma do preparo da biblioteca para o sequenciamento de nova geração.	25
Figura 5. Ilustração da fragmentação do DNA genômico em equipamento Covaris® modelo E220	27
Figura 6. Etapa de purificação do DNA por meio das <i>beads AMPure XP</i> . Adaptado <i>Agencourt® AMPure® XP Protocol</i>	29
Figura 7. Representação Gráfica da ocorrência de variantes nos genes de alta e moderada penetrância conforme seu impacto. No eixo x, estão distribuídos os genes e no eixo y a quantidade total de variantes por gene.	38
Figura 8. Representação Gráfica da ocorrência de variantes <i>moderate</i> nos genes de alta e moderada penetrância. No eixo x, estão distribuídos os genes e no eixo y a quantidade total de variantes por gene.	39

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é uma doença de etiologia multifatorial, no qual vários fatores etiológicos (genéticos e ambientais) interagem de forma complexa e predisõem à malignidade. No entanto, 90% de todos os casos de CM em mulheres são devido a fatores ambientais que ocasionam mutações em células somáticas, enquanto somente 10% são decorrentes de fatores genéticos devido a mutações em células germinativas, embora menos frequente estão associadas a maior probabilidade de desenvolvimento da doença (De silva et al., 2019).

As neoplasias mamárias caninas compartilham várias semelhanças com o câncer de mama em mulheres, incluindo principalmente a idade do aparecimento e a dependência hormonal (Abdelmegeed e Mohammed, 2018). No entanto, os fatores genéticos associados aos tumores mamários caninos ainda estão sendo investigados e existe um número limitado de estudos que sugerem possível associação de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* com o desenvolvimento do câncer de mama em cadelas (Rivera et al., 2009; Goebel e Merner, 2017; Thumser-Henner et al., 2020).

Em contraste, na medicina humana, é bem estabelecido que mulheres portadoras de mutações germinativas nos genes de alta penetrância, *BRCA1* e 2, apresentam risco de 10 - 30 vezes maiores de desenvolverem CM em relação à população geral (Antoniou et al., 2003). Por este motivo, análises genéticas, como o sequenciamento de nova geração (NGS, *Next generation sequencing*), tem sido utilizado para identificar variantes patogênicas nos genes de predisposição em diferentes populações (Geredeli et al., 2019). Além disso, com o desenvolvimento dos painéis múltiplos de genes ampliou-se o conhecimento sobre a contribuição de mutações em outros genes (Maxwell et al., 2015). Dessa maneira, atualmente o *screening* do câncer de mama hereditário em mulheres é realizado nos genes supressores tumorais de alta (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *STK11* e *CDH1*) e moderada penetrância (*ATM*, *PALB2*) entre outros (Prapa et al., 2017).

Consequentemente, a tecnologia NGS tem sido incorporada à rotina clínica oncológica, para identificar mulheres com risco aumentado para o CM, permitindo aplicações de estratégias preventivas para diminuir o risco da doença. No entanto, os testes para detecção de variantes patogênicas vão além da identificação do risco e

terão papel fundamental no tratamento personalizado (Kurian et al., 2016; Housman et al., 2014; Yuan et al., 2017; Kamps et al., 2017).

Além das semelhanças clínicas, as neoplasias mamárias caninas compartilham características moleculares com o câncer de mama em mulheres (Pastor et al., 2020). Sabe-se que tanto nas cadelas como nas mulheres, tumores com fenótipos mais agressivos podem resultar na progressão tumoral e disseminação metastática, sendo a quimioterapia uma alternativa para essas pacientes (Cassali et al., 2014; Gray et al., 2020). Nesse contexto, na medicina humana, foi demonstrado que pacientes com CM portadoras de mutações nos genes *BRCA* e resistentes à quimioterapia podem utilizar os inibidores de poli-ADP-ribose (PARP), um grupo de agentes capazes de bloquear o reparo do DNA das células tumorais, tornando as sensíveis a quimioterapia mesmo após à resistência (Dziadkowiec et al., 2016). Assim, portadoras de mutações nos genes *BRCA* devem ser tratadas de forma diferente das sem mutações (Chen et al., 2018). Além disso, estudos têm sugerido que mulheres com mutações patogênicas nos genes *ATM* e *PALB2*, também podem se beneficiar dessa terapia (Evans e Longo, 2014; Choi et al., 2016).

Embora a tecnologia NGS seja frequentemente utilizada na medicina humana, existem poucos estudos utilizando essa técnica na medicina veterinária. Dessa forma, o objetivo principal foi utilizar o sequenciamento de nova geração para detectar no plasma a presença de variantes germinativas nos genes de alta e moderada penetrância associados ao câncer de mama em mulheres, em um grupo não selecionado de cadelas com e sem neoplasias mamárias, buscando associa-las ao câncer de mama e principalmente identificar pacientes portadoras de variantes patogênicas que poderiam se beneficiar com uma terapia personalizada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias mamárias em cadelas

Os tumores mamários caninos são um grupo heterogêneo de neoplasias de ocorrência espontânea que apresentam características epidemiológicas, moleculares, prognósticas e de resposta a terapias similares ao CM em mulheres (Gray et al., 2020; Osaki et al., 2016).

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum em cadelas (De Nardi et al., 2016; Sorenmo et al., 2020) e mulheres (INCA, 2020), mas sua ocorrência é três vezes maior que a de mulheres (Shafiee et al., 2013), estudos europeus estimam que a incidência anual seja de aproximadamente 200 - 250 casos / 100.000 cães (Vascellari et al., 2009; Vascellari et al., 2016). No entanto, nota-se que a verdadeira taxa de incidência depende da origem do estudo e das características populacionais (Sorenmo et al., 2013). No Brasil, as neoplasias mamárias são frequentemente diagnosticadas (Cassali et al., 2020), sendo que os tumores malignos compreendem 80 a 85% dos diagnósticos histopatológicos (Andrade et al., 2017; Pastor et al., 2018; Nunes et al., 2018).

Na sua etiologia, vários fatores podem coexistir e influenciar no aparecimento da doença como a idade, raça, status hormonal (Osaki et al., 2016; Vascellari et al., 2016) e obesidade (Lim et al., 2015). Assim como nas mulheres, a idade avançada é um fator de risco importante para o desenvolvimento dos tumores mamários (Sorenmo et al., 2011; Vascellari et al., 2016), com idade de aparecimento entre 8 e 12 anos (Pastor et al., 2020), sendo extremamente raro em animais com menos de 5 anos (Cassali et al., 2014; Sorenmo e al., 2020). É importante destacar que o estado nutricional também pode influenciar na idade de aparecimento da doença em cadelas. Segundo LIM et al. (2015) cadelas obesas ou com excesso de peso desenvolvem tumores mamários mais cedo quando comparadas as magras ou com peso corporal ideal.

Na medicina humana, o câncer de mama também pode acometer mulheres jovens (<40 anos) portadoras de mutações germinativas nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, tendo como característica história familiar da doença (Kudela et al., 2019;

Geredeli et al., 2019). Embora, somente 5 a 10% de todos os casos sejam herdados, estimativas sugerem que 55 – 65% das portadoras de mutações no gene *BRCA1* e aproximadamente 45% no gene *BRCA2* irão desenvolver o CM em idade avançada (>70 anos) (Godet e Gilkes, 2017).

Na medicina veterinária, delinear um perfil familiar em cães é extremamente difícil (Im et al., 2013), mas estudos têm sugerido que mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* podem estar envolvidos na carcinogênese mamária em animais de raça, sugerindo um componente hereditário (Rivera et al., 2009; Huskey et al., 2020). Além disso, pesquisas têm demonstrado que há uma maior ocorrência de tumores mamários em animais de raça pura quando comparado aos mestiços (Salas et al., 2016; Vascellari et al., 2016; Oliveira, 2016; Pastor et al., 2018; Nunes et al., 2018), sendo mais frequentes nas raças de pequeno porte como Poodles, Chihuahuas, York Shire Terrier, Maltes e Cocker Spaniels (Sorenmo et al., 2020). No estudo realizado por Im et al. (2013) também foi observado uma alta incidência de tumores mamários em animais da raça Shih Tzu que curiosamente foram diagnosticados com tumores mais agressivos em idade mais precoce.

Em relação à influência hormonal, a exposição prolongada ao estrógeno contribui para o desenvolvimento do câncer de mama em cadelas (castração tardia) (Schneider et al., 1969) e mulheres (menarca precoce e menopausa tardia) (Kamińska et al., 2015). No entanto, é importante destacar que o tecido mamário normal possui receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) como semelhante ao que ocorre nos tumores benignos e alguns malignos diferenciados. Assim, tanto em cadelas como nas mulheres, tumores que apresentam baixa expressão de RE e RP no tecido mamário neoplásico normalmente correlacionam-se a um pior prognóstico (Larsen et al., 2014; Varallo et al., 2019; Pastor et al., 2020).

Tradicionalmente, o diagnóstico é realizado por meio da biópsia excisional, permitindo a realização do exame histopatológico e classificação das neoplasias mamárias caninas. Atualmente, existem duas classificações histopatológicas uma sugerida por Cassali et al. (2020) e a outra por Goldsmith et al. (2011). No Brasil, a mais utilizada é a proposta no consenso mamário de cadelas (Cassali et al., 2020) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação Histopatológica das Neoplasias mamárias caninas. Modificada de Misdorp et al. (1999), proposta por Cassali et al. (2020).

<u>Lesões epiteliais não neoplásicas</u>	<u>Carcinomas de tipo especial</u>
Hiperplasia ductal	Carcinoma micropapilar
Hiperplasia lobular	Carcinoma Lobular Pleomórfico
Adenose	Carcinoma secretório
Ectasia Ductal	Carcinoma mucinoso
<u>Lesões de células colunares</u>	Carcinoma rico em lipídeo
Alteração celular colunar	Carcinoma rico em glicogênio
Hiperplasia celular colunar	Carcinoma de célula escamosa
Lesão celular colunar atípica	Carcinoma de célula fusiforme
<u>Tumores Benignos</u>	Neoplasia mamária com diferenciação sebácea
Adenoma	<u>Neoplasias mioepiteliais</u>
Adenomioepitelioma	Adenomioepitelioma maligno
Mioepitelioma	Mioepitelioma malignos
Adenoma Basalóide	<u>Sarcomas</u>
Fibroadenoma	Fibrossarcoma
Tumor misto benigno	Osteossarcoma
Papiloma ductal	Carcinosarcoma
Tumor Filoide	Sarcoma em tumor misto
<u>Tumores Malignos</u>	<u>Outros Sarcomas</u>
Carcinomas <i>in situ</i>	Condrossarcoma
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	Lipossarcoma
Carcinoma lobular <i>in situ</i>	Hemangiossarcoma
Carcinoma em tumor misto	Sarcoma Filoide
Carcinoma papilar (invasivo e não invasivo)	
Carcinoma tubular	
Carcinoma Sólido	
Carcinoma Basalóide	
Carcinoma Cribriforme	

Os tumores epiteliais são o tipo histológico mais frequente em cadelas (Salas et al., 2015) e mulheres (INCA, 2020). Dessa forma, o carcinoma mamário canino parece ser um modelo válido para o estudo do câncer de mama em humanos. No entanto, dentre os tumores epiteliais diagnosticados em cadelas o mais frequente e de melhor prognóstico é o carcinoma em tumor misto compreendendo cerca de 44% dos casos. Já os carcinomas sólidos, micropapilar e carcinosarcoma são considerados de comportamento biológico mais agressivo, sendo associados a pior prognóstico (Nunes et al., 2018).

Atualmente existe uma tentativa de classificar as neoplasias mamárias caninas utilizando-se dos mesmos critérios moleculares estabelecidos na medicina humana como a expressão dos marcadores RE, RP, fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (Pastor et al., 2020) e marcador de proliferação celular (Ki-67) (Kadthur et al., 2011), com intuito de prever melhor o prognóstico e nortear diretrizes terapêuticas (Pastor et al., 2020).

Em mulheres, sabe-se que as características moleculares podem auxiliar na identificação de possíveis portadoras de mutações germinativas no gene *BRCA1*, pois tumores mamários que não expressam receptores hormonais (RE e RP negativos) e HER2 (negativo) são mais frequentes em pacientes portadoras da mutação (Gabriel e Domchek, 2010). Além disso, dentre as mulheres triplo-negativas (TN) 8 – 30% têm a variante patogênica no gene *BRCA1* independentemente da idade ou da história familiar (Gonzalez-Angulo et al., 2011; Mavaddat et al., 2012; Rummel et al. 2013; Couch et al. 2014). No entanto, em cadelas os marcadores tumorais propostos recentemente para serem utilizados são RE/RP, Ki-67 e cicloxigenase 2 (COX-2) (Cassali et al., 2020), pois o HER2 parece não ser um marcador confiável, devido a sua baixa especificidade (Burrai et al., 2015).

É importante ressaltar que atualmente a avaliação prognóstica dos tumores mamários em cadelas é realizado somente por meio do estadiamento clínico da doença de acordo com a classificação TNM (Tumor/Linfonodo/Metástase) estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (Owen, 1980), no tipo e grau histopatológico do tumor (Elston e Ellis, 1991; Goldsmith, 2011; Cassali et al., 2014). Apesar dessas classificações permitirem categorizar os tumores mamários para decisões terapêuticas, o tratamento cirúrgico de remoção das glândulas afetadas e dos linfonodos regionais ainda é o método mais eficaz. Entretanto, terapias adjuvantes como a quimioterapia com Doxorrubicina e/ou Carboplatina são frequentemente utilizados para tumores com características mais agressivas, mas ainda há poucas informações sobre sua verdadeira eficácia (Cassali et al., 2014; Pastor et al., 2020).

Dessa forma, o tratamento do câncer de mama ainda é um desafio tanto para medicina veterinária, quanto para medicina humana, pois esses tumores são altamente heterogêneos e por esse motivo nem todas as pacientes respondem igualmente aos fármacos utilizados no seu tratamento (Januškevičienė e Petrikaitė, 2019; Mealey et al., 2019).

2.2 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Na medicina humana, avanços recentes na tecnologia genômica possibilitaram análise rápida e econômica de vários genes, permitindo o sequenciamento simultâneo

de milhões de fragmentos de DNA (Kurian et al., 2016; Kamps et al., 2017). Neste contexto, uma das técnicas de especial interesse é o NGS que está sendo incorporado na prática clínica para identificar mutações em pacientes com câncer, direcionando o tratamento com fármacos específicos (Housman et al., 2014; Yuan et al., 2017) e possibilitando a detecção de mutações germinativas patogênicas em genes de predisposição ao CM (Kurian et al., 2016; Kamps et al., 2017).

O NGS pode ser aplicado em diferentes níveis de abrangência desde à avaliação completa do genoma (WGS, *Whole Genome Sequencing*), exoma (WES, *Whole Exome Sequencing*) e dos painéis de múltiplos genes. Dessa forma, uma das principais utilidades do NGS é identificar e caracterizar variantes genéticas em um grande número de genes em um único teste (Shabani Azim et al., 2018). Para isso, os dados gerados são analisados pela bioinformática para detectar as diferentes classes de alterações genômicas, que se dividem em duas: (1) alterações na sequência de DNA, como os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *single nucleotide polymorphism*) e inserções / deleções curtas (*indels*), e (2) grandes deleções / duplicações (*del / dups*), também conhecidas como variações no número de cópias (CNV, *copy number variation*), por fim, as leituras de cada amostra são mapeadas contra sequência de referência, identificando as diferenças entre o genoma do paciente e o genoma de referência (Palmirotta et al., 2018; Elazezy e Joosse, 2018; Shabani azim et al., 2018).

Atualmente, apesar do NGS ser importante técnica utilizada na prática oncológica, permanecem algumas dúvidas sobre a validade e a utilidade clínica dos seus resultados (Kurian et al., 2016). Neste contexto, o *American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*, desenvolveram *guidelines* para interpretação de variantes de sequência. Este relatório recomenda uma terminologia padrão específica de acordo com significância clínica das variantes, sendo denominadas da seguinte maneira: variantes patogênicas (VP): de acordo com os banco de dados e artigos na literatura; variantes provavelmente patogênicas (VPP): variantes não reportadas nos bancos de dados, mas que pelo seu tipo podem ser patogênicas (*nonsense e frameshift*); significado incerto (VUS, *variant of uncertain significance*): variantes que possuem informações conflituosas em mais de um banco de dados; provavelmente benigno (VPB): variantes que não se espera nenhuma

patogenicidade (silenciosas e intrônicas) e, por fim, variantes benignas (VB): reportadas pelos banco de dados como benignas (Richards et al., 2015).

Assim, como consequência, o uso das tecnologias de nova geração determinaram aumento significativo na detecção de variantes em mulheres com câncer de mama, mas muitas dessas variantes não fornecem evidências de um efeito patogênico (em particular as variantes *missense* ou aquelas envolvidas no processo de *splicing*) e são classificadas como VUS. Desse modo, a interpretação errônea dessas variantes podem ocasionar condutas inadequadas, assim esforços devem ser feitos para classificar corretamente as variantes como deletérias ao invés de interpretar o polimorfismo como benigno. Nesse sentido, existem modelos computacionais *in silico*, utilizados para calcular a probabilidade de uma variante causar a doença, prevendo o impacto do aminoácido alterado na proteína, e os modelos funcionais como os estudos de expressão gênica (Concolino et al., 2019).

2.3 Testes genéticos e o câncer de mama

Os tumores hereditários são ocasionados por mutações germinativas nas células progenitoras, portanto, são herdadas pela prole (Stratton et al., 2010). Dessa forma, o câncer de mama originado de células germinativas pode aparecer quando os genes *BRCA 1* e *2* perdem a suas funções nos dois alelos, ou seja, esses tumores são decorrentes de mutações nas linhagens germinativas (herdadas) associadas a uma segunda mutação na linhagem somática que silencie o gene (Foulkes, 2008; Coelho et al., 2018).

Nos últimos 20 anos, os testes genéticos clínicos em humanos concentraram-se principalmente na detecção de variantes patogênicas nos genes de alta penetrância (*BRCA1* e *BRCA2*) responsáveis pelo câncer de mama hereditário (Rosenthal et al., 2016). A penetrância de um gene é determinada pelo risco relativo de uma mutação neste gene causar um tipo particular de câncer. Assim, genes de alta penetrância estão associados ao risco relativo de câncer superior a cinco vezes (Apostolou e Fostira, 2013). Por isso, mulheres portadoras de mutações patogênicas herdadas nos genes *BRCA* têm maiores chances (45% - 65%) de desenvolverem o

câncer de mama em idade avançada (Godet e Gilkes, 2017), mas também existe o risco aumentado para outros tipos de câncer (Merish et al., 2015).

Estima-se que as variantes patogênicas estão presentes em 0,2% a 0,3% da população geral e em 5 a 10% das pacientes com câncer de mama (Rosenthal et al., 2016), mas a prevalência varia consideravelmente entre os diferentes grupos étnicos e áreas geográficas (Stoppa-Lyonnet, 2016; Alemar et al., 2017). No Brasil, a prevalência de variantes patogênicas nos genes *BRCA* em mulheres com câncer de mama é de aproximadamente 20%, apesar de ainda não existir evidências de uma mutação fundadora brasileira, possivelmente devido à complexa mistura étnica da população (Alemar et al., 2017).

Embora as pesquisas concentrem em detectar variantes patogênicas em genes de alta penetrância, com o desenvolvimento dos painéis de múltiplos genes para o NGS é possível analisar o perfil mutacional de vários genes envolvidos na predisposição ao câncer hereditário (Prapa et al., 2017). Dessa maneira, expandiu-se o conhecimento sobre a contribuição de mutações em outros genes, especialmente nos genes de moderada penetrância (*PALB2*, *ATM* e *CHECK2*) (Maxwell et al., 2015). Assim, foi descoberto que mulheres portadoras de variantes patogênicas nesses genes têm um risco maior de desenvolver o CM ao longo da vida, estimado em 20% (Rosenthal et al., 2016). Neste contexto, pacientes negativas para os genes *BRCA*, a prevalência de mutações em outros genes varia de 4 - 16% (Kurian et al., 2016). Portanto, atualmente, o *screening* do câncer de mama hereditário é realizado principalmente nos genes de alta (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*) e moderada penetrância (*ATM*, *CHEK2*, *PALB2*), entre outros (Prapa et al., 2017).

Os testes genéticos que procuram variantes patogênicas em genes de predisposição ao câncer de mama estão sendo utilizados para estimar o risco, pois a história familiar isolada falha na identificação de mulheres saudáveis que seriam apontadas como de risco para um rastreamento mais agressivo. Além disso, nas mulheres diagnosticadas com câncer de mama e com mutações em genes de relevância, 80% não teriam sido consideradas de risco elevado com o uso de somente um modelo de estimativa baseado na história familiar (Rosenthal et al., 2016). Assim, o objetivo principal dos testes genéticos é identificar, de forma precoce, variantes

patogênicas nos genes de predisposição ao CM para permitir a implementação de estratégias preventivas adequadas (Stoppa-Lyonnet, 2016).

Na medicina veterinária, na prática clínica a ovariectomia precoce já é realizada como método de prevenção do câncer de mama em cadelas (Goebel e Merner, 2017), mas diversos estudos têm questionado essa conduta, demonstrando os efeitos nocivos da castração precoce, principalmente em animais de raça, incluindo a maior incidência para outros tipos de tumores (Cooley et al 2002; Torres de La Riva et al., 2013; Zink et al., 2014; Hart et al., 2014). Em contraste, um estudo recente, realizado com 35 raças diferentes de cães, foi demonstrado que a idade da castração aumenta o risco para determinadas doenças em casos específicos. Dessa forma, os fatores individuais, como a raça, precisam ser considerados antes de escolher a idade da castração (Hart et al., 2020). Assim, são necessários mais estudos para identificar os fatores genéticos individuais que podem estar presentes em cadelas com tumores mamários, a fim de atingir os objetivos da medicina de precisão e permitir mudança da abordagem tradicional de que uma conduta única serve para todas (Shabani Azim et al., 2018; Gray et al., 2020).

É importante destacar que os testes para detectar variantes genéticas patogênicas vão além de identificar indivíduos com risco aumentado e provavelmente terão papel fundamental no atendimento personalizado, pois tanto pacientes humanos como os caninos podem se beneficiar de terapias direcionadas a mecanismos de reparo do DNA (Stoppa-Lyonnet, 2016; Thumser-Henner et al., 2020). Na atualidade, sabe-se que mulheres e cadelas portadoras de neoplasias mamárias que não expressam receptores hormonais (RE, RP negativos), apresentam pior prognóstico (Im et al., 2013; Chen et al., 2018; Pastor et al., 2020) e um dos motivos é que não há tratamento eficaz para esses tumores, o que tem gerado esforços para o desenvolvimento de tratamentos específicos (Timoteo, 2016).

Nesse contexto, tanto em cadela como em mulheres, os sais de platina, tem sido utilizados como agente único ou em combinação com outras drogas quimioterápicas para o tratamento do câncer de mama, pois essas drogas geram dano ao DNA devido à formação de *crosslinks* (ligações cruzadas) (Lavalle et al., 2012; Bowden, 2014; Mylavarapu et al., 2018). Em mulheres com câncer de mama, é bem estabelecido que a sensibilidade aos agentes de platina está associada a presença

de mutações nos genes *BRCA*, pois essas mutações tornam as células deficientes no mecanismo de recombinação homóloga (RH), não sendo possível reparar as ligações cruzadas formadas na molécula de DNA, mas o uso terapêutico é limitado ao tratamento de primeira linha devido ao desenvolvimento de resistência a partir da ativação das vias de reparo do DNA (Spencer et al., 2008; Mylavarapu et al., 2018).

A poli-ADP-ribose (PARP) é uma enzima nuclear que se liga ao DNA e ativa a via de reparo por excisão de base (BER, *Base Excision Repair*) decorrente de alterações por quebra de fita simples do DNA (SSB, *Single-Strand Break*). Neste contexto, foi demonstrado que os inibidores de PARP são capazes de sensibilizar as células cancerígenas resistentes, esse fato pode ser explicado, pois a persistência de quebras SSB durante a replicação pode levar a quebra de cadeia dupla do DNA (DSB, *Double-Strand Breaks*), que é uma lesão reparada pelos genes *BRCA* (Farmer et al., 2005; Dziadkowiec et al., 2016). Dessa forma, a inibição de uma via adicional de reparo do DNA é sinteticamente letal em células sem recombinação homóloga (Mylavarapu et al., 2018).

Na medicina humana, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso do inibidor de PARP, Olaparibe (Lymparza-Astra Zeneca) para o tratamento de câncer metastático e HER2 (-), após observar que o tratamento aumentou o tempo livre de doença nessas pacientes (Robson et al., 2017). Dessa forma, os testes para mutações em genes de predisposição ao câncer de mama, tem grande utilidade clínica, uma vez que são importantes para elaboração tomada de decisões sobre prevenção e elaboração de abordagens terapêuticas (Robson, et al., 2010).

2.4 Genes de alta penetrância

- ***BRCA1* e *BRCA2***

Os genes *Breast Cancer 1, 2* são os principais supressores tumorais associados ao câncer de mama em mulheres (Roy et al., 2012). O gene *BRCA1* canino está localizado no cromossomo 9, contém 23 éxons e codifica uma proteína com 1878 aminoácidos. Em humanos, localiza-se no braço longo do cromossomo 17, contém 24 éxons e codifica uma proteína com 1884 aminoácidos (ENSEMBL, 2020),

que por meio dos seus domínios, *Really Interesting New Gene (RING)*, *BRCA C Terminus (BRCTs)*, localizados nas regiões amino-terminal e carboxi-terminal, respectivamente, e o domínio de localização nuclear (*NSL*) no éxon 11, interagem de forma complexa com inúmeras proteínas, contribuindo para o controle do ciclo celular e manutenção da integridade genômica das células por meio do reparo do DNA mediado pelo mecanismo de recombinação homóloga (Venkitaraman, 2014). A proteína BRCA1 é considerada pleiotrópica, atuando tanto na ativação de *checkpoints* quanto no reparo do DNA (Roy et al., 2012).

O gene *BRCA2* canino, está localizado no cromossomo 25, contém 27 éxons e codifica uma proteína com 3446 aminoácidos. Em humanos, localiza-se no cromossomo 13, contém 27 éxons e codifica uma proteína com 3418 aminoácidos (ENSEMBL, 2020), que tem papel fundamental no mecanismo de recombinação homóloga (Roy et al., 2012). O éxon 11 é o maior do *BRCA2* canino e humano, está localizado na parte central do gene e contém oito repetições de BRC fortemente conservadas que tem como função mediar a interação da proteína BRCA2 com a enzima RAD51, visando o reparo do DNA e a manutenção da integridade genômica das células (Yoshikawa et al., 2012; Maués et al., 2018). Entretanto, variantes específicas identificadas no gene *BRCA2* de cadelas e mulheres podem afetar a interação BRCA2 - RAD51 enfraquecendo essa ligação e provocando um reparo defeituoso (Thumser-Henner et al., 2020). Além disso, na região terminal há uma sequência de aminoácidos que se associam a proteína DSS1 e na localização C-terminal há presença de domínios importantes, designados como *helical domain*, *oligosaccharide-binding* e *NSL* (Roy et al., 2012).

É importante destacar que apesar de algumas diferenças estruturais como localização e quantidade de aminoácidos entre o gene canino e humano, análises têm demonstrado que a sequência dos aminoácidos são altamente homólogos e compartilham os mesmos domínios funcionais, sugerindo que os genes *BRCA1* e 2 desempenham as mesmas funções nos cães (Qiu et al., 2015; Maués et al., 2018). Dessa forma, esforços têm sido feitos para provar a associação desses genes com o CM em cadelas (Niето et al., 2003; Yoshikawa et al., 2005, 2008; Rivera et al., 2009; Borge et al., 2011; Yoshikawa et al., 2012; Im et al., 2013; Enginler et al., 2014; Ochiai et al., 2015; Maués et al., 2018; Huskey et al., 2020).

Assim, dada a importância das funções dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, torna-se compreensível que variantes patogênicas podem ocasionar alterações em domínios importantes do gene, gerando uma proteína estruturalmente defeituosa que não irá reparar o DNA danificado, induzindo o acúmulo de mutações e instabilidade genômica, favorecendo o aparecimento do CM (Felicio, 2015).

- **TP53**

O gene supressor tumoral *TP53* canino está localizado no cromossomo 5, contém 11 éxons e codifica uma proteína com 445 aminoácidos (ENSEMBL, 2020), denominada proteína tumoral p53 (TP53), que atua em *checkpoints* após o dano do DNA, sendo o gene conhecido como o “guardião do genoma”. Em mulheres, apesar de mutações germinativas em *TP53* causarem um risco maior de câncer de mama, essas são mais raras do que as mutações em *BRCA1* e *BRCA2*. Nesse contexto, mutações germinativas no gene *TP53* causam predisposição ao câncer familiar, sendo que os portadores da mutação têm um risco aumentado de malignidade ao longo da vida e os tumores malignos mais comuns são os sarcomas de tecido mole e o câncer de mama em mulheres (Schon e Tischkowitz, 2018).

A síndrome de predisposição ao câncer familiar, conhecida como a síndrome de Li-Fraumeni é um distúrbio autossômico dominante herdado que geralmente está associado a anormalidades no gene *TP53*, localizado no cromossomo 17 em humanos. Dessa forma, um alelo mutante geralmente é herdado por indivíduos com síndrome de Li-Fraumeni, enquanto o outro alelo é deletado ou mutado somaticamente, levando à perda da proteína funcional (Schon e Tischkowitz, 2018; Huszno e Grzybowska, 2018).

Contrariamente, as mutações somáticas em *TP53* ocorrem em aproximadamente 40% dos casos de câncer de mama, sendo um fator prognóstico negativo, pois tendem a apresentar fenótipo mais agressivo e associados à quimioresistência (Huszno e Grzybowska, 2018). Na medicina veterinária, alguns estudos têm relatado a presença de mutações germinativas e somáticas em cadelas com tumores mamários (Veldhoen et al., 1999; Wakui et al, 2001; Lee e Kweon, 2002; Souza et al., 2012).

- ***STK11***

O gene da serina-treonina quinase (*STK11*) é um supressor tumoral que nos cães está localizado no cromossomo 20, contém 10 éxons e codifica uma proteína com 439 aminoácidos. Em humanos, localiza-se no cromossomo 19, contém 10 éxons e codifica uma proteína com 433 aminoácidos (ENSEMBL, 2020), que ativa 14 diferentes membros da família quinase, especialmente a proteína quinase ativada (AMP), regulando diversos processos celulares como parada do ciclo celular, apoptose e metabolismo celular (Alkaf et al., 2017).

Em 1998, o gene *STK11* mutante foi descoberto sendo o responsável pela síndrome Peutz-Jeghers (SPJ) em humanos (Jenne et al., 1998), que foi relatada pela primeira vez por Peutz (1921), observando a relação entre pólipos nasofaríngeos e gastrintestinais com pigmentação mucocutânea em três gerações de uma mesma família. Posteriormente, foi descoberto que mulheres portadoras dessa síndrome têm de 8 a 31% de probabilidade de desenvolverem CM aos 40 e 60 anos, respectivamente (Hearle et al., 2006).

Além disso, foi demonstrado por Fenton et al. (2006) a perda da expressão da proteína em um subconjunto de carcinomas mamários esporádicos invasivos de alto grau e, recentemente, foi observado alteração na expressão gênica do *STK11* em linhagem de células mamárias cancerígenas, demonstrando que esse gene deva ser explorado em estudos de câncer de mama em mulheres (Alkaf et al., 2017). Nesse ano, Parachoniak e colaboradores relataram uma resposta à rapamicina em uma paciente com câncer de mama metastático cujo perfil genômico identificou uma mutação pontual no gene *STK11* (F354L) associada à perda de heterozigosidade e sem nenhuma alteração na via PI3K/mTOR detectada.

Em cães, estudos sugerem que mutações pontuais identificadas no gene *STK11* podem estar associadas aos tumores mamários caninos (Canadas et al., 2018; Huskey et al., 2020).

- **CDH1**

Em cães, o gene *E-caderina 1 (CDH1)* localiza-se no cromossomo 5 e codifica uma proteína com 885 aminoácidos. Em humanos, está localizado no cromossomo 16 e codifica uma proteína com 882 aminoácidos (ENSEMBL, 2020), denominada E-caderina que normalmente está expressa no tecido epitelial mamário e tem papel fundamental na adesão das células epiteliais e na transição epitélio-mesenquimal (EMT), assim a perda ou inativação dessa proteína está associada com a carcinogênese mamária e a invasão, sendo considerada uma proteína supressora tumoral (Horne et al., 2018).

Em humanos, mutações germinativas no gene *CDH1* são responsáveis pelo desenvolvimento do câncer gástrico difuso hereditário (CGDH). Além disso, há uma associação bem estabelecida entre o carcinoma de mama lobular com a síndrome CGDH. No entanto, recentemente tem sido relatadas mutações na linhagem germinativa do gene *CDH1* em casos de câncer de mama lobular não associados com a síndrome câncer gástrico difuso clássica (Corso et al., 2014; Corso et al., 2018). Em mulheres, dentre os carcinomas invasivos, o lobular é o segundo subtipo histológico mais diagnosticado, constituindo aproximadamente 10 - 15% de todos os casos, sendo que 90% estão associados a perda de expressão da E-caderina, considerada a marca registrada do câncer de mama lobular e utilizada para diferenciar lesões ductais de lobulares (Ciriello et al., 2015).

Em cadelas o carcinoma lobular invasivo não é comum, mas o subtipo lobular pleomórfico tem sido relatado, correspondendo menos de 1% dos diagnósticos histopatológicos (Nunes et al., 2018). No entanto, alguns autores têm observado a baixa expressão de E-caderina em outros subtipos histológicos, sendo que os carcinomas do tipo sólido demonstraram perda frequente de expressão de E-caderina quando comparado com o carcinoma tubulopapilífero (Matos et al., 2006; Gama et al., 2008). Além disso, ausência ou baixa expressão de E-caderina foi encontrada associada a fenótipos mais agressivos e metastáticos (triplo-negativo e HER-2 positivo) (Varallo et al., 2019).

2.5 Genes de moderada penetrância

- **ATM**

O gene *Ataxia Telangiectasia Mutado (ATM)* humano está localizado no cromossomo 11, contém 66 éxons e codifica uma proteína com 3056 aminoácidos, uma quinase da família fosfoinositídeo 3-quinase (PIK3) que apresenta várias funções complexas, incluindo um papel mediador no reparo de quebras de fita dupla do DNA (Clouaire et al., 2017). Além disso, o gene faz parte de muitas outras redes de sinalização, incluindo metabolismo e crescimento celular, estresse oxidativo, remodelação da cromatina (Cremona e Behrens, 2013). Devido essas funções, o gene *ATM* tem sido associado ao câncer desde sua descoberta, pois os pacientes com ataxia-telangiectasia (AT) são propensos a desenvolverem doenças malignas linfóides na infância (Taylor et al., 1996; Reiman et al., 2011).

A AT é uma doença neurodegenerativa rara que resulta em ataxia cerebelar, anormalidades oculomotoras, telangiectasias, deficiência imunológica, infecções pulmonares e um risco elevado de câncer, essa condição está associada a um padrão autossômico recessivo de herança, ou seja, apenas indivíduos com 2 alelos defeituosos são afetados pela doença neurodegenerativa (Jerzak et al., 2018). No entanto, a heterozigosidade na linha germinativa do gene *ATM* também pode aumentar a suscetibilidade a outros tipos de neoplasia, especialmente o câncer de mama (Morell et al., 1990; Thompson et al., 2005).

Neste contexto, estudos têm estimado riscos diferentes para mulheres com câncer de mama heterozigotas para uma variante patogênica no gene *ATM* (Jerzak et al., 2018). Segundo Marabelli et al. (2016) o risco cumulativo de CM entre portadoras de variantes patogênicas é de 32,83% aos 80 anos de idade. Além disso, mutações em *ATM* podem resultar em resistência à quimioterapia e prognóstico adverso, as quais podem ser exploradas para terapias direcionadas existentes ou emergentes que produzam letalidade sintética (Choi et al., 2016).

Em cães o gene *ATM*, localiza-se no cromossomo 5, contém 64 éxons e codifica uma proteína com 3056 aminoácidos (ENSEMBL, 2020) que pode estar envolvida na carcinogênese mamária. Neste contexto, um estudo observou baixa

expressão da proteína ATM em tumores benignos e carcinomas mamários quando comparado as glândulas normais, esses resultados foram semelhantes ao observado no câncer de mama em mulheres (Raposo-Ferreira et al., 2016).

- ***PALB2***

Em humanos, o gene *partner and localizer of BRCA2 (PALB2)*, localiza-se no cromossomo 16 e codifica uma proteína com 1186 aminoácidos (ENSEMBL, 2020), que também desempenha papel importante no mecanismo de recombinação homóloga em resposta a quebras de fita dupla do DNA, funcionando como um gene supressor tumoral e participando da integridade do genoma (Wu et al., 2020).

No entanto, mutações bialélicas na linhagem germinativa do gene *PALB2* causam anemia de Fanconi, enquanto mutações monoalélicas foram associadas a um risco aumentado de câncer de mama (Evans e Longo, 2014). Neste contexto, no estudo realizado por Antoniou et al. (2014) foi observado que mulheres portadoras de mutações patogênicas no gene *PALB2* têm aproximadamente 35% de chance de desenvolverem câncer de mama aos 70 anos de idade, sugerindo que o risco para portadoras de mutação no *PALB2* seja tão alto quanto para as portadoras de mutação no *BRCA2*. Além disso, do mesmo modo que os demais genes associados ao mecanismo de reparo do DNA por recombinação homóloga (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*), torna-se provável que a perda de heterozigosidade no *locus PALB2* em mulheres com CM resulte em aumento da sensibilidade à morte celular com a inibição de PARP (Evans e Longo, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O objetivo principal deste estudo foi utilizar o sequenciamento de nova geração para detectar no plasma a presença de variantes germinativas nos genes de alta e moderada penetrância associados ao câncer de mama em mulheres em um grupo não selecionado de cadelas com e sem neoplasias mamárias.

3.2 Objetivos Específicos

- Classificar as variantes identificadas por meio dos modelos computacionais *in silico*.
- Verificar a ocorrência das variantes no plasma dos diferentes grupos estudados.
- Detectar cadelas portadoras de variantes germinativas possivelmente patogênicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

O presente estudo não ocasionou nenhum risco desnecessário à saúde das cadelas, uma vez que foram utilizados fragmentos tumorais excedentes do exame de histopatológico e não houve alteração de conduta para as participantes do estudo. Além disso, os tutores foram informados quanto à necessidade de coleta de sangue, dos objetivos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido TCLE (Apêndice A). Os dados clínicos das pacientes foram armazenados em ficha clínica (Apêndice B), sendo de responsabilidade do pós-graduando e do médico veterinário responsável pelo atendimento. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo nº 001-003244/2013) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

4.2 Animais e caracterização das amostras

Foram coletadas 44 amostras no total, provenientes do plasma (n=29) e fragmento tumoral (n=15) de cadelas atendidas em Clínicas Veterinárias parceiras de São José do Rio Preto (SP) e no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, no período de julho a outubro de 2018. No entanto, foram excluídas 14 amostras que não atenderam os critérios estabelecidos (Apêndice C). Dessa forma, para este estudo foram selecionadas 20 cadelas (n=30 amostras), distribuídas em três grupos experimentais:

Grupo (RD): dez cadelas recém diagnosticadas com tumores mamários, cujos critérios de inclusão estabelecidos foram: ausência de comorbidades e diagnóstico definitivo de neoplasia mamária com ou sem metástase.

Grupo (MAST): cinco cadelas com histórico de neoplasia mamária submetidas à mastectomia que não receberam tratamento adjuvante. (Critérios de inclusão foram os mesmos estabelecidos para o grupo RD)

Grupo (CTR): cinco cadelas consideradas clinicamente normais, que foram até a clínica para vacinação, sendo o critério de inclusão: ausência de neoplasia visível.

Inicialmente, todos animais foram submetidos ao exame clínico e as informações sobre o histórico clínico (idade e raça) e reprodutivo (status hormonal) armazenados em ficha clínica. As cadelas com neoplasias mamárias foram avaliadas com relação às características tumorais (número de nódulos, acometimento uni ou bilateral, tamanho tumoral) (Apêndice D), além disso, as cadelas com histórico de neoplasia mamária (*RD* e *CTR*) foram submetidas à radiografia torácica com três projeções e/ou ultrassonografia abdominal para pesquisa de metástases.

4.3 Obtenção do plasma sanguíneo

As coletas de sangue para o grupo recém diagnosticado (*RD*), foram realizadas no dia da mastectomia e dos grupos *MAST* e *CTR* nos retornos ao médico veterinário para acompanhamento e vacinação, respectivamente. Dessa forma, foram coletados de 3 a 5 mililitros (mL) de sangue em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), dependendo do tamanho do animal. Após a coleta, o sangue foi imediatamente refrigerado e transportado para o Laboratório de Investigação Molecular do Câncer da Faculdade de Medicina de Rio Preto (LIMC/FAMERP) ou para o laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário (LPCV) “Governador Laudo Natel” (FCAV/UNESP), em seguida, o plasma foi separado por duas centrifugações, sendo a primeira realizada a 4°C em 3.000 rotação por minuto (rpm) por 10 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo para a realização da segunda centrifugação a 4°C em 12.200 rpm por 10 minutos. Por fim, o sobrenadante foi transferido para microtubos *RNase/DNase free* devidamente identificados e armazenados em temperatura de -80°C, para posterior extração do DNA livre circulante (cfDNA).

4.4 Coleta do fragmento tumoral

As amostras tumorais do grupo *RD* foram obtidas após o procedimento de mastectomia. Dessa forma, foram coletados dois fragmentos (+- 0,5, 1cm) do maior tumor que foram acondicionados em microtubos, refrigerados e transportados até o laboratório (LIMC/FAMERP ou LPCV/Jaboticabal). Em seguida, os fragmentos tumorais foram transferidos para criotubos *RNase/DNase free* e armazenados em nitrogênio líquido até o momento das análises. Além disso, a cadeia mamária foi encaminhada pelo médico veterinário para um laboratório de patologia animal. Posteriormente, as clínicas parceiras e o laboratório de patologia animal (FCAV/UNESP), cederam gentilmente o diagnóstico e os blocos de parafina que foram direcionados para um segundo laboratório (Pat Animal, São José do Rio Preto - SP). A classificação histopatológica das neoplasias mamárias foi realizada de acordo com o proposto por Cassali et al. (2014).

Os tumores epiteliais também foram classificados com critérios histopatológicos específicos, que incorporam informações sobre: (1) formação de túbulos, (2) pleomorfismo nuclear e (3) número de mitoses por campo. Com base na pontuação total obtida, o grau do tumor foi determinado: Grau I (Baixo Grau) tumor bem diferenciado, Grau II (Intermediário) moderadamente diferenciado e Grau III (Alto Grau) pouco diferenciado (Elston e Ellis, 1998)

4.5 Extração do DNA livre circulante

A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Investigação Molecular do Câncer da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (LIMC/FAMERP). O procedimento foi realizado utilizando *kit* específico, *QIAmp Circulating Nucleic Acid* (Qiagen®), segundo instruções do fabricante.

Em um tubo falcon de 50 mL adicionou-se 100 microlitros (μ L) de Proteinase K, 1 mL de plasma e 0,8 mL de tampão de lise ACL (contendo 1 micrograma de RNA carregador). A solução passou pelo vórtex por 30 segundos e foi incubada a 60°C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1,8 mL do tampão de ligação ACB que foi novamente homogeneizado por 30 segundos no vórtex, seguido de incubação no

gelo. Após cinco minutos a mistura foi cuidadosamente aplicada no tubo extensor da coluna do *QIAmp Mini* conectada a um sistema a vácuo (Figura 1, 2). Quando todos os lisados passaram completamente pela coluna a bomba foi desligada e o tubo extensor removido e descartado. Aplicou-se 750 μ L de etanol e os tampões de lavagem, ACW1 (600 μ L) e ACW2 (750 μ L), diretamente na coluna *QIAmp mini*, após cada tampão, a bomba foi ligada e ao término da passagem de cada tampão a bomba foi desligada. Posteriormente, a coluna *QIAmp mini* foi colocada em um tubo de 2 mL e o material foi centrifugado a 14.000 rpm. A coluna *QIAmp mini* foi transferida para um novo *ependorf* e com a tampa aberta foi incubada a 56°C por 10 minutos para que a membrana secasse por completo. Ao final, a coluna foi colocada em um tubo de eluição de 1,5 mL previamente identificado, seguido da aplicação de 20 μ L de tampão de eluição AVE no centro da coluna *QIAmp mini*. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por um minuto e posteriormente armazenado em freezer -20°C para posterior construção da biblioteca para o sequenciamento de nova geração. A figura 2, ilustra as etapas de extração do DNA livre circulante citadas acima.

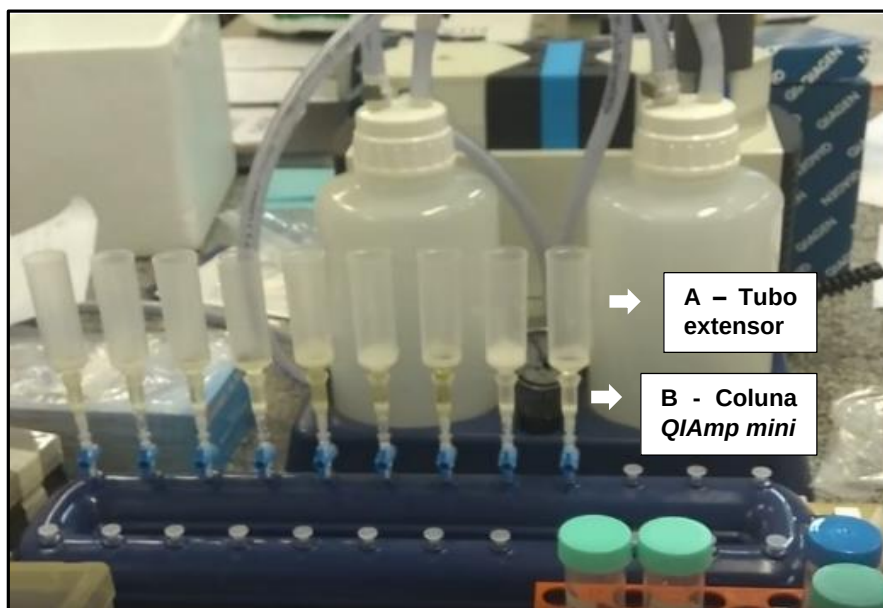


Figura 1. Sistema utilizado para extração de DNA livre circulante do plasma *QIAvac 24 Plus*, *QIAvac Connecting System* e *Vacuum Pump* (Qiagen®)

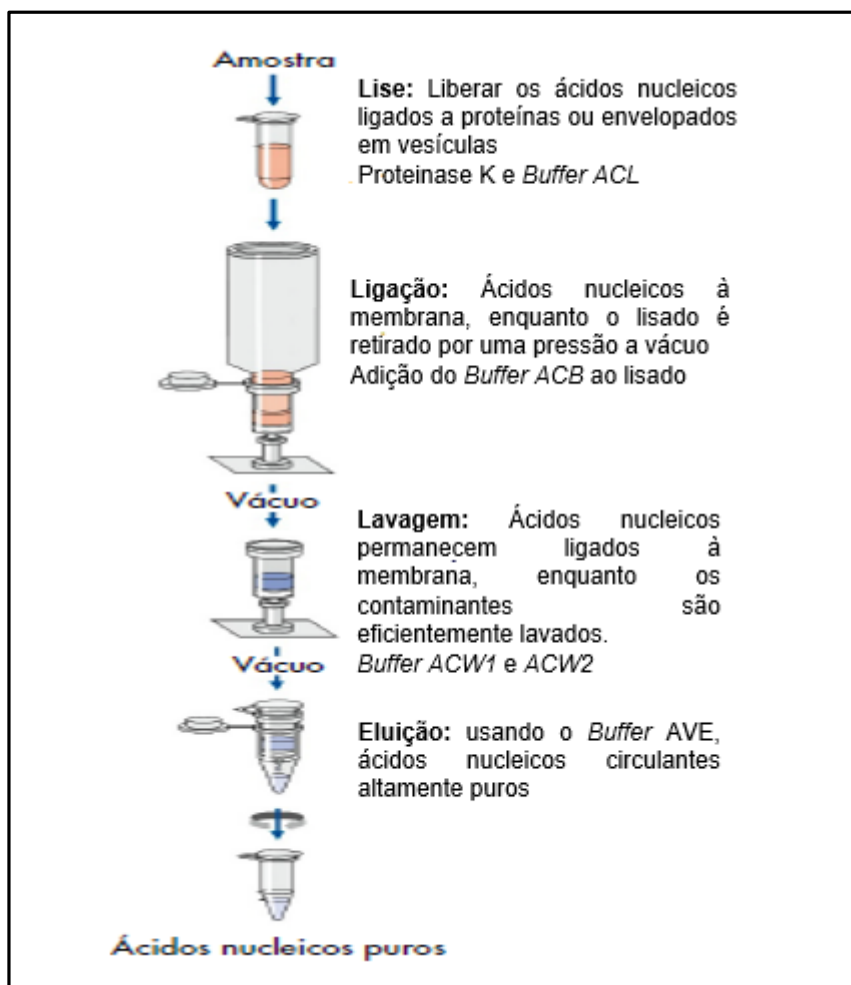


Figura 2. Visão geral da extração do DNA Livre circulante por meio do kit QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid (Qiagen®). Adaptado do Manual Qiagen®

4.6 Extração do DNA de fragmentos tumorais

O procedimento foi realizado utilizando o *kit AllPrep DNA/RNA/Protein Mini* (Qiagen®), segundo instruções do fabricante.

Os tecidos foram desagregados por maceração em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo. O macerado foi homogeneizado em tampão de lise RLT e transferido para um *eppendorf*, seguido de centrifugação por três minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para a coluna *AllPrep DNA spin* e o material foi centrifugado por 30 segundos a 10.000 rpm. Posteriormente, foi adicionado 500 µL de tampão de lavagem AW1 na coluna *AllPrep DNA spin* e o material foi novamente centrifugado por 15 segundos a 10.000 rpm. Em seguida, foi adicionado 500 µL de

tampão AW2 na coluna *Allprep DNA spin* e o material centrifugado por dois minutos a 14.000 rpm. A coluna *AllPrep DNA spin* foi colocada em um novo *ependorf* e adicionou-se 100 μ L de tampão de eluição EB (pré-aquecido a 70 °C) diretamente no centro da membrana da coluna. O material foi incubado à temperatura ambiente por dois minutos e posteriormente centrifugado por um minuto a 10.000 rpm para eluição do DNA. Ao final, o material foi armazenado em freezer -20°C para posterior montagem da biblioteca e sequenciamento de nova geração. A figura 3, ilustra as etapas de extração do DNA tumoral.

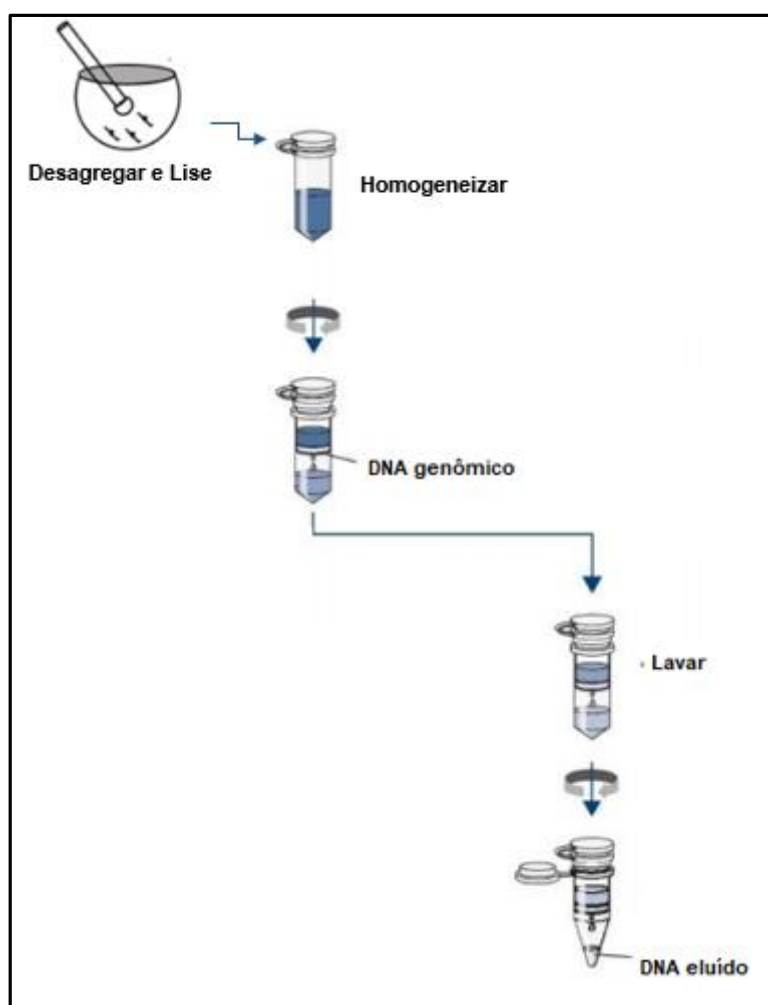


Figura 3. Visão geral da extração do DNA tumoral por meio do *kit AllPrep DNA/RNA/Protein Mini* (Qiagen®). Adaptado do Manual Qiagen®

4.7 Preparo da biblioteca para o sequenciamento de nova geração

Primeiramente, foi necessário preparar o DNA extraído para o sequenciamento. A figura 4 ilustra as etapas necessárias para o preparo da biblioteca. De um modo geral, a construção da biblioteca foi realizada com o *Kit SureSelectXT Low Input Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Library* e a técnica foi executada utilizando um painel de genes específicos e associados ao câncer de mama incluindo os genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CDH1*, *STK11*, *PALB2* e *ATM* (Apêndice E).

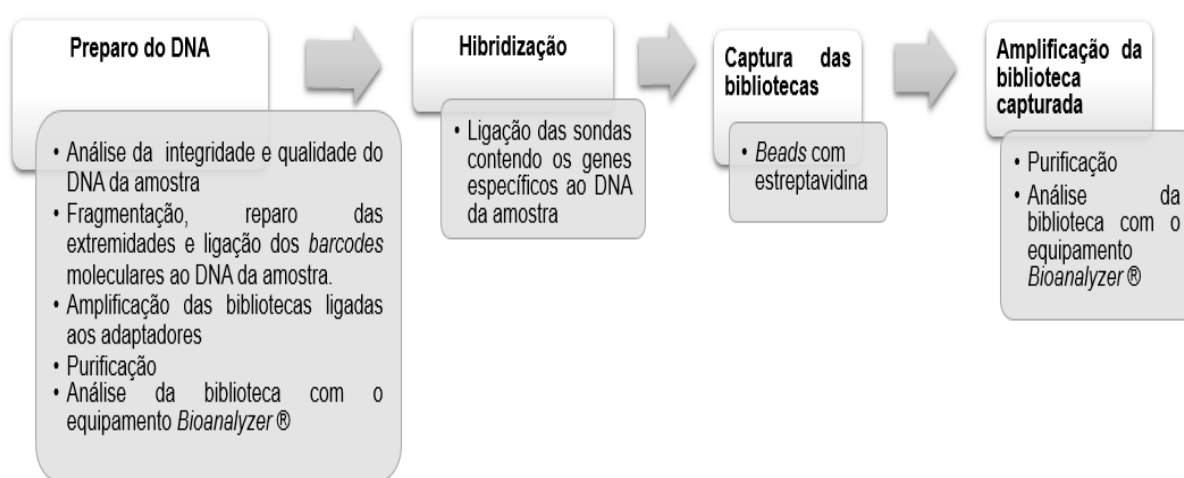


Figura 4. Fluxograma do preparo da biblioteca para o sequenciamento de nova geração.

4.7.1 Preparo do DNA

4.7.1.1 Análise da integridade e qualidade do DNA

A integridade do DNA extraído (plasma e fragmento tumoral) foi analisado por meio de gel de eletroforese 1% (Figura 5), utilizando uma alíquota de 2 μ L de cada amostra e 4 μ L de intercalante (*Safe Dye*®) corrido por 30 minutos a 90 volts. A concentração das amostras foi quantificada pelo *Nanodrop 2000C* (*Thermo Scientific*®) a 260 - 280 nm. Após a extração e verificação da quantidade e integridade do DNA, as amostras foram enviadas em gelo seco para o Centro de Genômica

Funcional na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP-Piracicaba) para a construção da biblioteca genômica e sequenciamento.

4.7.1.2 Quantificação fluorométrica das amostras pelo equipamento Qubit®

Para a construção da biblioteca, o protocolo requer um *input* de DNA de 10 – 200 nanogramas (ng) por amostra. Dessa forma, a quantidade de DNA em ng foi calculada a partir da concentração obtida pelo equipamento Qubit®. Para a dosagem das amostras, primeiramente preparou-se a solução de trabalho Qubit, diluindo 1 µL do reagente em 199 µL de *buffer*. Em seguida, foi pipetado em microtubos de 2 ml, 10 µL de cada padrão de forma cuidadosa e foi adicionado 190 µL da solução de trabalho Qubit. Posteriormente, foi pipetado em microtubos 199 µL da solução de trabalho e 1 µL da amostra. Dessa maneira, o volume final dos microtubos (padrão e amostra) foi de 200 µL. Após a diluição, os tubos foram homogeneizados no vórtex por dois a três segundos e incubados em temperatura ambiente por dois minutos.

Primeiramente, foram realizadas as leituras dos padrões (n°1 e n°2) seguido do microtubo com a amostra, esse procedimento foi realizado para cada amostra. Para dar sequência ao experimento foram utilizadas as quantidades máximas de DNA disponíveis (Apêndice F). No entanto, as amostras com concentrações muito baixas (*too low*) foram excluídas do estudo (Apêndice C).

4.7.1.3 Fragmentação do DNA genômico

Após estabelecida a concentração de DNA por amostra, foi realizada a fragmentação mecânica do DNA genômico em 300 pares de base (pb) no equipamento Covaris® modelo E220 em microtubos Covaris® de 130 µL (Figura 6). Primeiramente, um microtubo contendo somente água foi colocada no equipamento, posteriormente as amostras foram fragmentadas uma de cada vez a 5°C. Para tanto, 50 µL (45 µL de TE + 5 µL) de amostra em microtubo foi colocado no equipamento. Ao final, as amostras fragmentadas foram colocadas em placa de 96 poços para posterior realização das demais etapas.

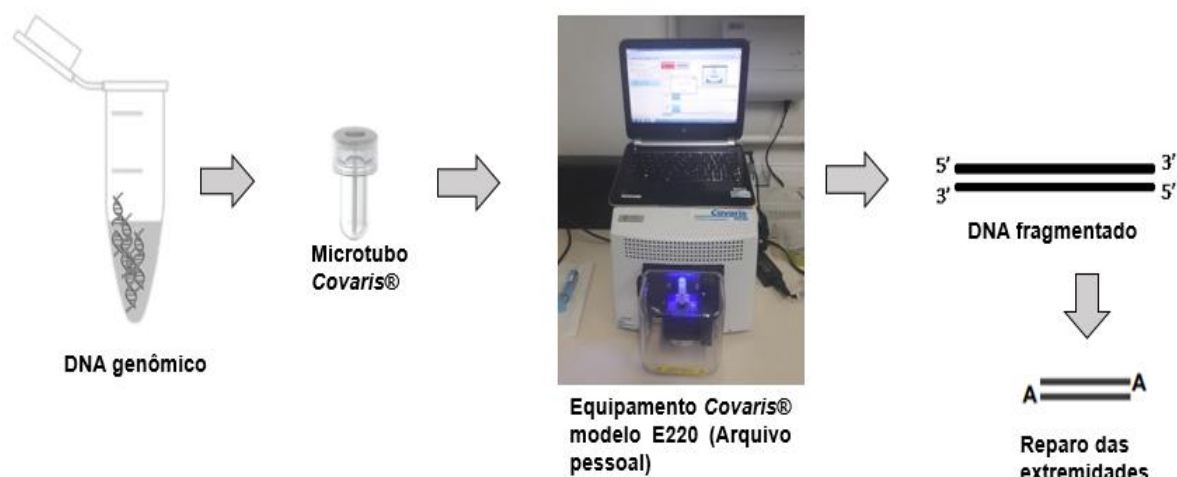


Figura 5. Ilustração da fragmentação do DNA genômico em equipamento Covaris® modelo E220

4.7.1.4 Reparo das extremidades do DNA fragmentado

Para a construção da biblioteca (sequências de DNA fragmentados) a extremidade do DNA precisa ser reparada (Figura 6), pois a fragmentação quebra o DNA de forma aleatória.

Antes de realizar a reparação do DNA, preparou-se o *master mix* de ligação, utilizado na etapa posterior, pipetando 23 μL de *Ligation Buffer* e 2 μL de *T4 DNA ligase*, totalizando 25 μL . A solução foi cuidadosamente pipetada, *up and down*, por 20 vezes e mantida à temperatura ambiente durante 30 - 45 minutos.

Posteriormente, foi preparado o *master mix End Repair/dA-Tailing* para a etapa de reparação. O *master mix* foi constituído por 16 μL *End Repair-A Tailing buffer* e 4 μL *End Repair-A Tailing Enzyme Mix*, totalizando 20 μL . Foram adicionados 20 μL do *End Repair/dA-Tailing master mix* em cada poço de amostra contendo aproximadamente 50 μL de DNA fragmentado. As amostras foram pipetadas, *up and down*, por 20 vezes, brevemente centrifugadas e a placa foi colocada no termociclador. A ciclagem constituiu de um ciclo a 20°C por 15 minutos, um ciclo a 72°C por 15 minutos e 4°C por tempo indeterminado.

4.7.1.5 Ligação dos *barcodes* moleculares

Para cada amostra de DNA reparada (aproximadamente 70 μ L), adicionou-se 25 μ L do *master mix* de ligação preparado na etapa anterior e mantido à temperatura ambiente. As amostras foram pipetadas, *up and down*, por pelo menos 10 vezes e centrifugadas rapidamente. Posteriormente, adicionou-se 5 μ L de adaptador *Oligo Mix* (*barcodes*) a cada amostra, as quais foram homogeneizadas, *up and down*, por 20 vezes. A placa foi colocada no termociclador com ciclos de 20°C por 30 minutos e 4°C por tempo indeterminado.

4.7.1.6 Purificação das amostras

A purificação foi realizada por meio das *beads AMPure XP*. Primeiramente, as *beads* permaneceram à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, enquanto era preparado 400 μ L de etanol 70% por amostra. Ao término do tempo, a suspensão *AMPure XP* foi homogeneizada para que o reagente ficasse homogêneo e de cor consistente. Foram adicionados 80 μ L de *beads AMPure XP* em cada amostra de DNA (aproximadamente 100 μ L) na placa de reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). As amostras foram pipetadas, *up and down*, por 20 vezes e incubadas à temperatura ambiente por cinco minutos. A placa foi colocada em um dispositivo de separação magnética por cerca de 5 a 10 minutos até que solução ficasse transparente, com a placa ainda no dispositivo, a solução transparente foi removida cuidadosamente e adicionou-se 200 μ L de etanol 70%, após um minuto o etanol foi removido, permanecendo no fundo dos poços da placa as *beads* ligadas ao DNA da amostra, desprezando-se os contaminantes. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Em seguida, o suporte magnético foi retirado e a placa selada para centrifugação rápida e coleta do etanol residual, para isso a placa foi colocada novamente no suporte magnético durante 30 segundos. Após a pipetagem cuidadosa do etanol residual, a placa não selada foi colocada no termociclador à temperatura de 37°C por 1 a 2 minutos para secar (evaporar o etanol residual) o *pellet* de esfera formada em cada poço.

Posteriormente, foram adicionados 35 μ L de água livre de nuclease em cada poço de amostra. A placa foi selada, homogeneizada brevemente no vórtex e na

centrífuga e incubada por dois minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi colocada novamente no suporte magnético por dois minutos, até que a solução ficasse transparente. O sobrenadante limpo (aproximadamente 34,5 μ L) foi removido para uma nova placa de PCR e as *beads* foram descartadas. A figura 7 ilustra de forma resumida a etapa de purificação do DNA.

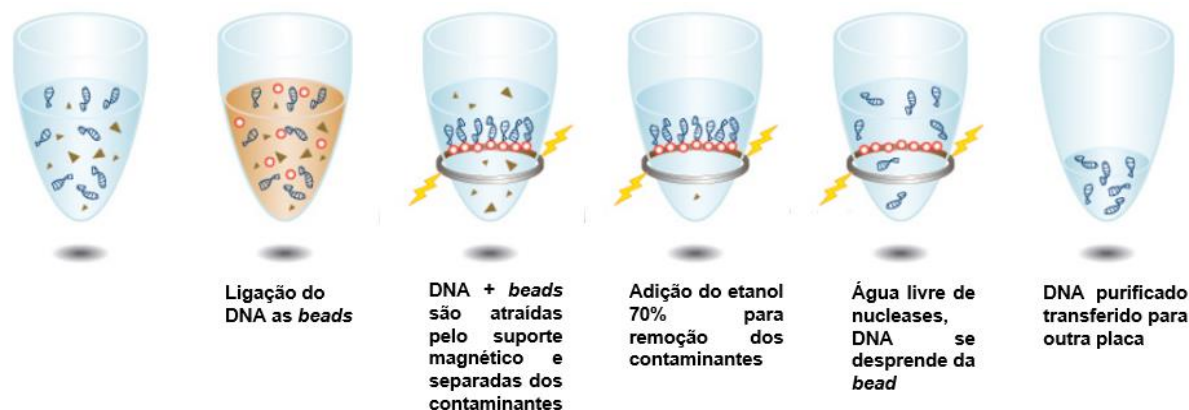


Figura 6. Etapa de purificação do DNA por meio das *beads* AMPure XP. Adaptado Agencourt® AMPure® XP Protocol

4.7.1.7 Amplificação da biblioteca ligada ao adaptador

Foram adicionados 13,5 μ L do *mix* de reação de PCR (*Herculase II Reaction Buffer*, 100nM dNTP mix, *Forward primer*, *Herculase II Fusion DNA Polymerase*) e 2 μ L do *Sure Select XT Low Input Index Primer* em cada poço contendo a amostra com a biblioteca de DNA purificada (aproximadamente 34,5 μ L). Em seguida, os poços foram homogeneizados durante cinco segundos no vórtex.

A amplificação foi realizada em termociclador com ciclos de: a) um ciclo a 98°C por dois minutos; b) 8 - 15 ciclos de 98°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por um minuto; c) um ciclo de 72°C por cinco minutos e d) 4°C por tempo indeterminado. A quantidade de ciclos em (b) foi diferente, pois foi realizada conforme o *input* de DNA, para a placa com amostras de 200 ng foram realizados oito ciclos, já para a placa com amostras de 1 a 3 ng foram realizados 15 ciclos. Posteriormente, o produto da amplificação foi purificado com as *beads* AMPure XP como já descrito anteriormente.

4.7.1.8 Avaliação da qualidade e quantidade da biblioteca de DNA

O *Bioanalyzer High Sensitivity DNA Assay*® foi utilizado para analisar o DNA indexado e amplificado, conforme *Agilent DNA 1000 Kit Guide*. Dessa maneira, o *chip*, as amostras e a *ladder* foram preparados conforme as instruções do *kit* de reagentes. Para as análises foram utilizados 1 µL de cada amostra e a corrida foi iniciada cinco minutos após a preparação dos reagentes. Os resultados do *Bioanalyzer*® foram gerados na forma de gráficos, eletroferograma, dessa forma foi observado que picos posicionados entre 300 a 400 pb significavam DNA de alta qualidade (fragmentos tumorais), mas para as amostras de DNA plasmático o pico foi de aproximadamente 200 a 400 pb.

4.7.2 Hibridização das amostras de DNA

Nesta etapa, as bibliotecas preparadas foram hibridizadas para posterior captura. Nesse momento, foram utilizadas as sondas gênicas específicas para cães. Dessa maneira, cerca de 500 ng de cada amostra de biblioteca preparada na placa de hibridização foi levada a um volume final de 12 µl, utilizando água livre de nuclease. Logo após, foram adicionados 5 µl de *SureSelect XT HS* e *XT Low Input Blocker mix* em cada poço e a placa foi brevemente centrifugada por cinco segundos e transferida para o termociclador. A ciclagem foi de um ciclo a 95°C por cinco minutos, um ciclo a 65°C por 10 minutos e um ciclo a 65°C por um minuto. Nesse instante, o termociclador foi pausado para permitir que outros reagentes fossem adicionados aos poços de hibridização.

Foram transferidos 13 µL do *mix* de hibridização de captura da biblioteca (25% *RNase Block Solution*, *Capture Library* < 3 Mb, *SureSelect Fast Hybridization Buffer* e nucleasse-free water), previamente preparado, em cada poço da amostra. O *mix* foi pipetado, *up and down*, por 10 vezes e a placa foi vedada para homogeneização no vórtex e brevemente na centrífuga para remover quaisquer bolhas do fundo dos poços. Por fim, a placa retornou ao termociclador, sendo realizado os seguintes ciclos: 60 ciclos de 65°C por um minuto e de 37°C por três segundos. A placa foi mantida no

termociclador a 65 °C até a próxima etapa. Nesse momento, o volume final dos poços de reação de hibridização era de aproximadamente 30 µL.

4.7.3 Captura do DNA das amostras ligadas as sondas

Primeiramente foi realizado a preparação das *beads* magnéticas. Para isso, *Dynabeads MyOne Streptavidin T1 magnetic beads* foram ressuspensas vigorosamente em um vórtex.

Para cada amostra de hibridização, foi adicionado 50 µl de *beads* ressuspensas em cada poço de uma nova placa de PCR. Posteriormente, as *beads* foram lavadas adicionando-se 200 µL *SureSelect Binding Buffer*. A placa foi colocada em um dispositivo de separação magnética até a solução ficar transparente (cerca de cinco minutos), em seguida o sobrenadante foi removido e descartado. O procedimento de lavagem foi repetido duas vezes, totalizando três lavagens. Por fim, as *beads* foram novamente ressuspensas em 200 µL de *SureSelect Binding Buffer*.

Logo após o preparo das *beads*, o volume de cada *mix* de hibridização (aproximadamente 30 µL), foi transferido para a placa de PCR contendo em cada poço 200 µL de *beads* de estreptavidina ressuspensas. A solução foi homogeneizada por pipetagem, *up and down*, por oito vezes e centrifugada a 1.800 G durante 30 minutos à temperatura ambiente. Durante esse tempo, o *SureSelect Wash Buffer 2* foi pré-aquecido a 70°C como descrito: foram aliquoteados 200 µL de *SureSelect Wash Buffer 2* em cada poço de uma nova placa seguida de incubação no termociclador a 70°C, após a incubação a placa foi selada e centrifugada brevemente.

Ao término da centrifugação (30 minutos), a placa foi colocada em um separador magnético até a solução ficar transparente, o sobrenadante foi descartado e as *beads* permaneceram no fundo do poço. Em seguida, as *beads* foram ressuspensas em 200 µL de *SureSelect Wash Buffer 1*, homogeneizando, *up and down*, por 20 vezes. A placa foi colocada novamente no separador magnético e após a solução ficar transparente (cerca de um minuto), o sobrenadante foi removido e descartado.

A placa foi retirada do separador magnético e transferida para um suporte à temperatura ambiente. As *beads* foram lavadas com *SureSelect Wash Buffer 2*, pré-

aquecido como descrito anteriormente, pipetando, *up and down*, por 20 vezes, até ficarem totalmente ressuspensas, em seguida, a placa foi selada e homogeneizada no vórtex a alta velocidade por oito segundos e centrifugada brevemente sem sedimentar as *beads*. As amostras foram incubadas por cinco minutos a 70°C no termociclador, com a tampa aquecida. Posteriormente, a placa foi novamente colocada no separador magnético à temperatura ambiente até a solução clarear para remover e descartar o sobrenadante. Esse processo foi realizado mais cinco vezes, totalizando seis lavagens. Por fim, foi adicionado 25 µL de água livre de nucleases. As *beads* foram ressuspensas e as amostras foram mantidas no gelo até serem utilizadas. O DNA capturado é retido nas esferas de estreptavidina durante a etapa de amplificação pós-captura.

4.7.4 Amplificação da biblioteca capturada

Nesta etapa, as bibliotecas de DNA foram amplificadas por PCR, para isso foi utilizado o *mix* de reação, constituído de: *Herculase II Fusion DNA Polymerase*, *5X Herculase II reaction Buffer*, *100nM dNTP mix*, *Sure Select Post-Capture Primer Mix* e *nuclease-free water*.

Foram adicionados 25 µL do *mix* de reação em cada poço da placa contendo 25 µL de DNA enriquecido com o alvo ligado (DNA amostra + sonda gênica + *beads*). Em seguida, a solução foi homogeneizada, *up and down*, até a suspensão de *beads* ficarem homogêneas. Posteriormente, a placa foi colocada no termociclador para a amplificação, sendo a ciclagem de: um ciclo a 98°C por dois minutos, 14 ciclos de 98°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por um minuto; um ciclo de 72°C por 10 minutos e 4°C por tempo indeterminado. Após o término da amplificação, as *beads* revestidas com estreptavidina foram removidas, colocando a placa no suporte magnético à temperatura ambiente (cerca de dois minutos) até a solução ficar transparente, em seguida, o sobrenadante (aproximadamente 50 µL) foi transferido para outra placa e as *beads* descartadas. Posteriormente, o produto da amplificação foi purificado utilizando *AMPure XP beads* e analisado por meio do *Bioanalyzer*, essas etapas foram realizadas conforme descrito anteriormente.

4.8 Preparo do *pool* de amostras para o sequenciamento

Para realizar o sequenciamento é necessário um *pool* equimolar das bibliotecas capturadas. Dessa maneira, foi realizado a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), para quantificar o produto final gerado pela biblioteca genômica, utilizando a diluição de 10.000x. Os resultados de Ct (*Cycle Threshold*) foram computados em planilha para calcular a concentração da biblioteca em nanomolar (nM), a partir dessa concentração, foram feitas outras diluições a fim de deixar as bibliotecas “normalizadas” a 2 nM. Em seguida, o *pool* de bibliotecas a 2nM foi desnaturado com 0,1N de NaOH e neutralizado com o tampão HT1, assim sendo a concentração final do *pool* foi de aproximadamente 20 picomolar (pM).

4.9 Sequenciamento das amostras

O *pool* de 20 pM das amostras foram carregadas para o sequenciamento no MiSeq® com o kit de reagentes MiSeq v2 (300 ciclos) da Illumina®. Para o sequenciamento, as amostras foram distribuídas em cartuchos. No cartucho, foram adicionados os *primers* de interesse (*Foward*, *IndexSequence* e *Reverse*, *customizados pela Agilent Technologies®*) e a biblioteca de DNA capturada em compartimentos diferentes.

Antes de iniciar o sequenciamento no equipamento *MiSeq Personal Sequencer da Illumina®*, foi anexada uma planilha (*SampleSheet*) com a identificação do lote do cartucho, das amostras e os *primers* utilizados. Dessa forma, o programa *Illumina Experiment Manager* associa cada *read* identificada com sua amostra correspondente.

Por fim, a cobertura de sequenciamento vertical e horizontal foi de 200 vezes para amostras de DNA extraído de fragmentos tumorais e de 2000 vezes para as amostras extraídas de DNA livre circulante. Esse critério foi determinado, pois amostras de tumor apresentam maior quantidade e qualidade de DNA do que amostras de DNA livre circulante, permitindo que o número de leituras de bases seja menor.

4.10 Análises bioinformáticas

4.10.1 Controle de qualidade

A partir do sequenciamento foram obtidas as leituras brutas (*reads*) no formato 'FASTQ', as quais foram verificadas utilizando o programa *FastQC* (Andrews, 2010) para obtenção de informações como número total de *reads*, porcentagem de conteúdo GC, porcentagem de duplicação de *reads*, bem como as médias de qualidade PHRED por posição. Com base nessas informações, utilizou-se o programa *Prinseq* (Schmieder e Edwards, 2011) para realizar a remoção de sequências de baixas qualidades e *reads* que possuísem tamanho abaixo ou acima do esperado, obtendo-se, assim, um conjunto de *reads* de alta qualidade para cada amostra.

4.10.2 Alinhamento e detecção de variantes

Após o processo de controle de qualidade das *reads*, as sequências de cada amostra foram alinhadas contra o genoma canino de referência mais recente da época de realização do trabalho, CanFam3.1 (Acesso no RefSeq: [GCF_000002285.3](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/assembly/GCF_000002285.3)), utilizando o *BWA* (*Burrows-Wheeler Aligner*) (Li e Durbin, 2009). Dessa forma foram obtidos os arquivos de alinhamento no formato 'BAM', os quais passaram pelo processo de marcação e remoção de duplicatas de PCR, com a ferramenta *MarkDuplicates* do pacote *Picard* (Wysoker et al., 2013) e, posteriormente, foram ordenados e indexados com, respectivamente, os parâmetros *-sort* e *-index* do programa *SAMtools* (Li et al., 2009).

Em seguida, os alinhamentos resultantes foram submetidos ao processo de predição de variantes (*Variant Calling*) para a detecção de bases que diferissem do genoma de referência considerando informações de cobertura e qualidades mínimas para inferência. Tal procedimento foi implementado através do programa GATK (Alkan et al., 2012), utilizando os parâmetros recomendados pelos autores do programa (*default*), dessa forma, obtendo-se os arquivos de variantes no formato 'VCF' para cada amostra. Neste processo foram detectadas mutações putativas, tais como polimorfismos de nucleotídeo único e *indels*.

4.10.3 Predição de impacto das variantes

As variantes contidas nos arquivos 'VCF' tiveram suas implicações preditas pelo programa *SnpEff* (Cingolani et al., 2012), utilizando os parâmetros *default*. Com isso, foram anexadas informações de possíveis efeitos dos sítios polimórficos identificados, bem como do impacto dessas alterações, além de caracterizá-las de acordo com a região genômica em que se inserem, sendo que: variantes localizadas em regiões não-codificantes receberam predição de impacto “modificador” (MODIFIER), enquanto aquelas localizadas em regiões codificantes variavam entre impacto “baixo” (LOW), “moderado” (MODERATE) ou “alto” (HIGH), de acordo com o efeito predito.

A partir dos arquivos 'VCF' contendo os impactos, por meio de *scripts* feitos em linguagem de programação R, filtrou-se as variantes com cobertura de 20 x. Para obter informações adicionais sobre os efeitos das variantes *moderate* com maior potencial de serem utilizadas como marcadores associados ao câncer de mama, essas foram submetidas ao programa VEP (*Variant Effect Predictor*) (McLaren et al., 2016) e aos algoritmos *in silico* PredictSNP (*Consensus Classifiers for Prediction of the Effect of Amino Acid Substitutions*) (Bendl et al., 2014) e PROVEAN (*Protein Variation Effect Analyzer*) (Choi et al., 2012), os quais foram utilizados para prever o efeito da substituição do aminoácido na proteína, fornecendo maiores detalhes em relação a patogenicidade e permitindo a classificação das variantes em: VPB (variante possivelmente benigna), VPP (variante possivelmente patogênica) e VCP (variante com conflito de patogenicidade). Por fim, para todas as análises em amostras de DNA de plasma e fragmento tumoral foi realizada a inspeção visual do alinhamento e determinação da frequência da variante com o software *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (Robinson et al., 2011), para verificação do alinhamento e das frequências alélicas. Assim, variantes plasmáticas com frequências superiores a 0,5% foram classificadas como germinativas.

4.11 Análises Estatísticas

Para determinar se a ocorrência de uma variante influencia na condição dos grupos (*RD*, *MAST*, *CTR*). Os dados foram submetidos ao teste exato de Fisher a 5% de probabilidade, realizado no software RStudio®, versão 3.6.2.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil epidemiológico e clínico-patológico das cadelas

Os dados epidemiológicos das 20 pacientes incluídas no estudo estão sumarizados na Tabela 2. Observou-se que a média de idade da população estudada foi de 10 anos, sendo 60% (12/20) dos animais castrados e de raça definida.

Para avaliação clínico-patológica, as cadelas com histórico de neoplasia mamária foram agrupadas (n=15). Desse modo, verificou-se que os tumores epiteliais foram os mais frequentes correspondendo a 73,33% (11/15) dos diagnósticos histopatológicos, sendo 40% (6/15) carcinoma em tumor misto, 13,33% (2/15) carcinoma tubular, 6,66% (1/15) carcinoma papilar, 6,66% (1/15) carcinoma indiferenciado (autólise) e 6,66% (1/15) tumor misto benigno. Os demais foram classificados como osteossarcomas (13,33%, 2/15), condrossarcoma (6,6%, 1/15) e carcinosarcoma (6,6%, 1/15). Além disso, cadelas com diagnóstico histopatológico de sarcomas e carcinosarcoma eram de raça definida. De modo geral, cadelas de raça definida apresentaram tumores com características mais agressivas, mesmo no grupo recém-diagnosticado com neoplasia mamária (Tabela 2).

Em relação as características tumorais, como tamanho do tumor, grau histopatológico, observou-se que 20% (3/15) foram classificados como T1, 53,33% (8/15) como T2 e 26,66% (4/15) como T3. Em relação ao grau, dos 10 tumores epiteliais malignos, quatro foram classificados como grau I, três como grau II, dois como grau 3.

Tabela 2. Dados epidemiológicos e clínico-patológicos das cadelas atendidas em clínicas particulares da cidade de São José do Rio Preto e no Hospital veterinário FCAV/UNESP/Jaboticabal, no período de julho a outubro de 2018.

Nome	Grupo	Origem (Cidade)	Idade (anos)	Raça	Castração	Estágio	Diagnóstico
Cadela 1	RD	São José do Rio Preto	10	SRD	Sim	T2N0M0	M2 e M4: Parênquima livre de malignidade M3 e M5: Carcinoma em tumor misto, grau II
Cadela 2	RD	São José do Rio Preto	15	Pequinês	Sim	T2N0M1	Osteossarcoma mamário
Cadela 3	RD	São José do Rio Preto	7	SRD	Não	T2N0M0	M3: Carcinoma tubular**; M5: Carcinoma em tumor misto, grau II
Cadela 4	RD	São José do Rio Preto	10	SRD	Não	T1N0M0	Tumor misto benigno
Cadela 5	RD	São José do Rio Preto	10	Poodle	Não	T1N0M0	Carcinoma em tumor misto, grau I
Cadela 6	RD	Jaboticabal	10	Basset	Não	T3N1M0	M4: Condrossarcoma mamário** M3:Carcinoma tubular grau II§
Cadela 7	RD	Jaboticabal	16	SRD	Sim	T2N0M0	M5: Carcinoma em tumor misto, grau I
Cadela 8	RD	Jaboticabal	13	Yorkshire	Sim	T1N0M0	Carcinoma tubular, grau I
Cadela 9	RD	São José do Rio Preto	13	Pastor Belga Branco	Sim	T2N0M0	Carcinoma em tumor misto, grau I
Cadela 10	MAST	São José do Rio Preto	10	SRD	Não	T2N1M1	Carcinoma Indiferenciado (Autólise),
Cadela 11	MAST	Jaboticabal	10	Labrador	Sim	T3N0M0	Carcinoma Papilar Grau II
Cadela 12	MAST	São José do Rio Preto	10	SRD	Sim	T2N1M1	Carcinoma Tubular, grau III com embolização linfática. Metástase carcinoma, padrão tubular.
Cadela 13	MAST	São José do Rio Preto	8	Beagle	Sim	T2N1M0	Carcinossarcoma
Cadela 14	MAST	São José do Rio Preto	9	Poodle	Sim	T3N1M0	Carcinoma em Tumor Misto Grau III
Cadela 15	MAST	Jaboticabal	13	Cocker	Sim	T3N0M1	Osteossarcoma Mamário
Cadela 16	CTR	São José do Rio Preto	9	SRD	Não	-	-
Cadela 17	CTR	São José do Rio Preto	9	Cocker	Sim	-	-
Cadela 18	CTR	São José do Rio Preto	4	SRD	Não	-	-
Cadela 19	CTR	São José do Rio Preto	12	Teckel	Sim	-	-
Cadela 20	CTR	São José do Rio Preto	8	Shitzu	Não	-	-

**Fragmento sequenciado

5.2 Identificação de variantes através do sequenciamento de nova geração

Foram sequenciados sete genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CDH1*, *STK11*, *PALB2*, *ATM*) de amostras plasmáticas (n=20), sendo identificadas um total de 218 variantes. Assim, os genes que apresentaram maior quantidade de variantes foram *ATM* (127/218), *CDH1* (22/218), *BRCA1* (20/218), *BRCA2* (17/218). Em contraste, os genes que apresentaram o menor número de variantes foram o *STK11* (13/218), *PALB2* (13/218) e *TP53* (6/218).

No entanto, as variantes identificadas nos diferentes genes estudados foram categorizadas pela análise bioinformática de acordo com seu impacto. Dessa forma, a maioria das variantes 67,43% (147/218) foram observadas em regiões não codificadoras e classificadas como modificadoras (*Modifier*), enquanto 32,56% (71/218) foram localizadas em regiões codificantes e classificadas como de baixo (*Low*) 18,80% (41/218) e moderado impacto (*Moderate*) 13,76% (30/218). Neste estudo, não foi detectada nenhuma variante de alto (*High*) impacto nos genes de predisposição ao câncer de mama. A figura 9, demonstra a ocorrência de variantes conforme o impacto.

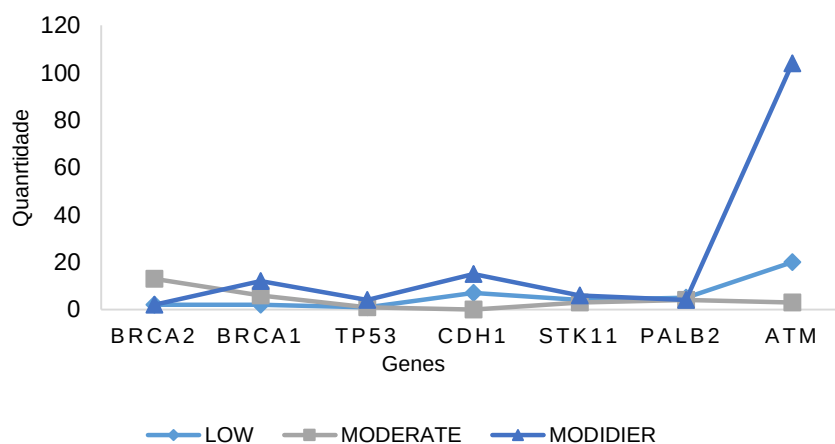


Figura 7. Representação gráfica da quantidade de variantes nos genes de alta e moderada penetrância conforme seu impacto. No eixo x, estão distribuídos os genes e no eixo y a quantidade total de variantes por gene.

Além disso, das 147 variantes *Modifier*, 99,31% (146/147) foram do tipo *intron_variant*, sendo mais frequentes nos genes *ATM* (65,82%, 104/147), *CDH1* (10,20%, 15/147) e *BRCA1* (7,48%, 11/147). Dentre as variantes de baixo impacto, observou-se que o tipo *synonymous_variant* foi o mais comum (75,60% 31/41), destacando-se nos genes *ATM* (34,14%,14/41), *CDH1* (14,63%, 6/41) e *STK11* (9,75%, 4/41). Por fim, para as variantes de moderado impacto o tipo *missense_variant* foi o mais observado (90,46%, 27/30), sendo mais evidentes nos genes *BRCA2* (36,66%, 11/30) e *BRCA1* (20%, 6/30). Em compensação no gene *CDH1* não foi identificada nenhuma variante *missense* e no gene *TP53* foi detectada somente uma. Assim, neste estudo ocorreu uma maior quantidade de variantes *moderate* nos genes de alta penetrância (76,66%, 23/30) quando comparado aos genes de moderada penetrância (23,33%, 7/30).

5.3 Classificação das variantes *moderate* de acordo com os algoritmos *in silico*

A figura 10 demonstra a distribuição das variantes *moderate* identificadas nos seis genes avaliados *BRCA2*, *BRCA1*, *TP53*, *STK11*, *PALB2* e *ATM*.

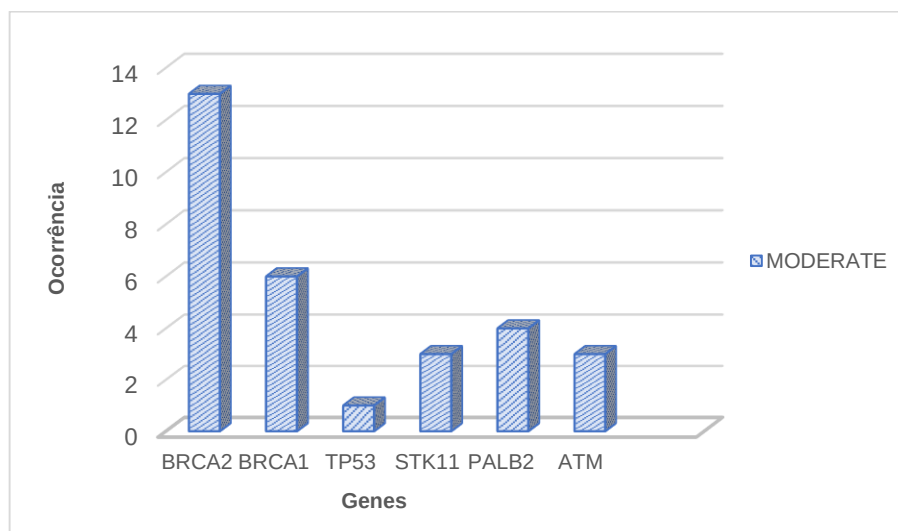


Figura 8. Representação gráfica da ocorrência de variantes *moderate* nos genes de alta e moderada penetrância. No eixo x, estão distribuídos os genes e no eixo y a quantidade total de variantes por gene.

As variantes *moderate*, são assim classificadas, pois podem alterar a eficácia da proteína, devido ao tipo de alteração que provocam na sequência. Dessa forma,

como demonstrado anteriormente o tipo *missense_variant* foi o mais comum, mas também foram identificadas variantes do tipo *disruptive_inframe_deletion* (6,66%, 2/30) nos genes *BRCA2* e *PALB2*, e *disruptive_inframe_insertion* (3,33%, 1/30) no gene *BRCA2*. No entanto, apesar das variantes de moderado impacto causarem alterações na sequência da proteína, muitas dessas variantes não fornecem evidências de um efeito patogênico e são classificadas como variantes de significado incerto. Desse modo, existem algumas maneiras de classificar essas variantes: 1) modelos computacionais, *in silico* e 2) modelos funcionais. Assim, neste estudo das 30 variantes identificadas no plasma, somente quatro (13,3%, 4/30) foram classificadas como possivelmente patogênicas pelos algoritmos *in silico*, sendo identificadas nos genes *BRCA2* e *PALB2*. Para seis (20%, 6/30) variantes ocorreu um conflito de patogenicidade, sendo detectadas nos genes *BRCA2*, *BRCA1* e *TP53*. As demais foram classificadas como possivelmente benignas (66,6%, 20/30). Na tabela 3, observa-se a predição das variantes *moderate* através dos algoritmos *in silico* no plasma das cadelas.

Tabela 3. Variantes *moderate* identificadas em genes de predisposição ao câncer de mama no plasma de cadelas (n=20) por meio do sequenciamento de nova geração

Gene	Chr	Posição	Éxon	SNPs/Indels	Variante	VEP	PROVEAN	PredictSNP	Classificação
BRCA2	25	7775268	11	c.2183C>T	p.Ala728Val	Tolerada (0,28)	Neutra	Neutra	VPB
		7775229	11	c.2222A>G	p.Asn741Ser	Tolerada (1)	Neutra	Neutra	VPB
		7770765	11	c.6686G>T	p.Cys2229Phe	Tolerada (0,35)	Neutra	Neutra	VPB
		7777441	10	c.1158T>G	p.Cys386Trp	Tolerada (1)	Neutra	Neutra	VPB
		7787056	5	c.428A>G	p.His143Arg	Tolerada(0,27)	Neutra	Neutra	VPB
		7758707	16	c.7841T>C	p.Ile2614Thr	Deletéria (0,03)	Neutra	Neutra	CP
		7758708	16	c.7840A>G	p.Ile2614Val	Deletéria (0,01)	Neutra	Neutra	CP
		7768690	12	c.6918_6920delGTT	p.Leu2307del	-	Deletéria	-	VPP
		7773147	11	c.4304A>G	p.Lys1435Arg	Tolerada (0,07)	Neutra	Neutra	VPB
		7775050	11	c.2401A>C	p.Lys801Gln	Deletéria (0,05)	Deletéria	Neutra	CP
		7735412	27	c.9995_9996insAAA	p.Met3332delinsIleLys	-	Neutra	-	VPB
		7775307	11	c.2144C>A	p.Pro715Gln	Tolerada (1)	Neutra	Neutra	VPB
		7773178	11	c.4273A>C	p.Thr1425Pro	Deletéria (0)	Deletéria	Deletéria	VPP
		19985211	9	c.877C>G	p.His293Asp	Tolerada (1)	Neutra	Neutra	VPB
BRCA1	9	19984333	8	c.607A>G	p.Lys203Glu	Tolerada (1)	Neutra	Neutra	VPB
		19985666	9	c.1332A>C	p.Arg444Ser	Deletéria (0,04)	Deletéria	Neutra	CP
		19987956	9	c.3622A>G	p.Thr1208Ala	Tolerada (1)	Neutra	Neutra	VPB
		20011910	17	c.5198G>A	p.Arg1733Lys	Tolerada (0,14)	Neutra	Neutra	VPB
		20024358	22	c.5617G>A	p.Ala1873Thr	Deletéria (0,04)	Neutra	Neutra	CP
STK11	20	57625003	1	c.286A>G	p.Met96Val	-	Neutra	Neutra	VPB
		57624996	1	c.293T>C	p.Phe98Ser	-	Neutra	Neutra	VPB
		57625180	1	c.109C>T	p.Pro37Ser	-	Neutra	Neutra	VPB
TP53	5	32563967	5	c.440G>A	p.Arg145His	Tolerada (0,08)	Deletéria	Deletéria	CP
PALB2	6	22223480	7	c.2846C>T	p.Ala949Val	Deletéria(0)	Deletéria	Deletéria	VPP
		22216269	4	c.1153G>A	p.Asp385Asn	Tolerada (1)	Neutra	Neutra	VPB
		22216303	4	c.1187G>A	p.Gly396Glu	Tolerada (1)	Neutra	Neutra	VPB
		22216884	4	c.1769_1783delCTAGCACATCAGGTG	p.Pro590_Val595delinsLeu	-	Deletéria	-	VPP
ATM	5	24251038	25	c.3431A>T	p.His1144Leu	Tolerada (0,63)	Neutra	Neutra	VPB
		24226831	36	c.5273T>C	p.Met1758Thr	Tolerada (0,58)	Neutra	Neutra	VPB
		24210065	46	c.6568G>A	p.Gly2190Arg	Tolerada (0,06)	Neutra	Neutra	VPB

VPB: variante provavelmente benigna, VPP: Variante provavelmente patogênica, CP: conflito de patogenicidade.

Cr: Cromossomo

SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único

Indels: Deleção e inserção.

5.4 Variantes *moderate* identificadas nos genes de alta penetrância *BRCA2*, *BRCA1*, *TP53*, *STK11*

A ocorrência de variantes plasmáticas nos diferentes grupos estudados está sintetizada na tabela 4.

Tabela 4. Ocorrência de variantes nos genes de alta penetrância detectadas no plasma dos diferentes grupos estudados (RD, MAST, CTR)

Gene	SNPS/Indels	Variante	Classif.	RD (n=10)	MAST (n=5)	CTR (n=5)	p = valor	TOTAL %
<i>BRCA2</i>	c.2183C>T	p.Ala728Val	VPB	8	5	5	0,4737	0,90
<i>BRCA2</i>	c.2222A>G	p.Asn741Ser	VPB	8	5	5	0,4737	0,90
<i>BRCA2</i>	c.2144C>A	p.Pro715Gln	VPB	8	5	5	0,4737	0,90
<i>BRCA2</i>	c.1158T>G	p.Cys386Trp	VPB	8	5	5	1	0,90
<i>BRCA2</i>	c.4304A>G	p.Lys1435Arg	VPB	6	3	1	0,4999	0,50
<i>BRCA2</i>	c.2401A>C	p.Lys801Gln	CP	1	1	3	0,1615	0,25
<i>BRCA2</i>	c.428A>G	p.His143Arg	VPB	1	1	ND	-	0,10
<i>BRCA2</i>	c.4273A>C	p.Thr1425Pro	VPP	ND	1	1	-	0,10
<i>BRCA2</i>	c.6686G>T	p.Cys2229Phe	VPB	1	ND	ND	-	0,05
<i>BRCA2</i>	c.7841T>C	p.Ile2614Thr	CP	1	ND	ND	-	0,05
<i>BRCA2</i>	c.7840A>G	p.Ile2614Val	CP	1	ND	ND	-	0,05
<i>BRCA2</i>	c.9995_9996insAAA	p.Met3332delinsIleLys	VPB	2	ND	1	0,7807	0,15
<i>BRCA2</i>	c.6918_6920delGTT	p.Leu2307del	VPP	ND	1	ND	-	0,05
<i>BRCA1</i>	c.877C>G	p.His293Asp	VPB	1	ND	ND	-	0,05
<i>BRCA1</i>	c.607A>G	p.Lys203Glu	VPB	ND	1	ND	-	0,05
<i>BRCA1</i>	c.1332A>C	p.Arg444Ser	CP	ND	1	ND	-	0,05
<i>BRCA1</i>	c.3622A>G	p.Thr1208Ala	VPB	ND	1	ND	-	0,05
<i>BRCA1</i>	c.5198G>A	p.Arg1733Lys	VPB	ND	1	ND	-	0,05
<i>BRCA1</i>	c.5617G>A	p.Ala1873Thr	CP	ND	1	ND	-	0,05
<i>STK11</i>	c.286A>G	p.Met96Val	VPB	1	ND	ND	-	0,05
<i>STK11</i>	c.293T>C	p.Phe98Ser	VPB	1	ND	ND	-	0,05
<i>STK11</i>	c.109C>T	p.Pro37Ser	VPB	4	2	ND	0,3228	0,30
<i>TP53</i>	c.440G>A	p.Arg145His	CP	1	ND	ND	-	0,05

*ND: não detectado

Dessa forma, dentre os genes de alta penetrância, o *BRCA2* destacou-se dos demais, pois foram encontradas treze variantes (56,52%, 13/23). Assim, no gene *BRCA2* foram identificados sete polimorfismos de nucleotídeo único no éxon 11, c.2222A>G (p.Asn741Ser), c.2183C>T (p.Ala728Val), c.2144C>A (p.Pro715Gln), c.4304A>G (p.Lys1435Arg), c.2401A>C (p.Lys801Gln), c.4273A>C (p.Thr1425Pro),

c.6686G>T (p.Cys2229Phe); dois no éxon 16, c.7804>G (p.Ile2614Val), c.7841T>C (p.Ile2614Thr); um no éxon 5, c.428 A>G (p.His143Arg) e um no éxon 10, c.1158T>G (p.Cys386Trp). Além disso, observou-se que as variantes p.Asn741Ser, p.Ala728Val, p.Pro715Gln e p.Cys386Trp foram mais frequentes, sendo observadas em 90% (18/20) das cadelas e classificadas como possivelmente benignas pelos programas de predição.

O segundo SNP mais comum, c.4304A>G (p.Lys1435Arg), foi detectado em 50% (10/20) dos animais (Cadelas 1, 2, 3, 5, 6, 8, 11, 13, 15, 17), sendo mais frequente em cadelas do grupo *RD* e *MAST* (60%) quando comparado ao grupo sem neoplasia *CTR* (10%), mas o resultado não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$) (Tabela 4). Além disso, essa variante foi classificada como provavelmente benigna.

O SNP, c.2401A>C (p.Lys801Gln), foi o terceiro mais comum, sendo observado em 25% (5/20) das cadelas (Cadelas 7,12,17,18,19), mas curiosamente foi mais comumente observado no grupo *CTR* (60%) quando comparado aos grupos *RD* e *MAST* (10%). Além disso, ocorreu conflito de patogenicidade para essa variante, sendo considerada deletéria pelo algoritmos VEP e PROVEAN (Tabela 4).

Os SNPs, c.4273A>C (p.Thr1425Pro) e c.428A>G (p.His143Arg) foram detectados nos animais (9,20) e (8,13), respectivamente. No entanto, a variante p.Thr1425Pro foi considerada possivelmente patogênica por todos programas de predição. Enquanto a variante p.His143Arg foi classificada como possivelmente benigna.

Por fim, observou-se que os SNPs, c.6686G>T (p.Cys2229Phe), c.7804>G (p.Ile2614Val), c.7841T>C (p.Ile2614Thr), estavam presentes somente em um animal. A variante p.Cys2229Phe foi detectada na cadela 2 e foi classificada como possivelmente benigna, enquanto que para as variantes p.Ile2614Val e p.Ile2614Thr ocorreu um conflito de patogenicidade sendo identificadas na cadela 9.

No gene *BRCA2*, também foram detectados dois *indels*, sendo uma inserção c.9995_9996insAAA (p.M3332delinsIK) e uma deleção c.6918_6920delGTT (p.Leu2307del), nos éxons 27 e 12, respectivamente. A inserção foi classificada como possivelmente benigna e foi detectada em três animais (cadelas 1, 3, 16). A deleção foi classificada como possivelmente patogênica, mas estava presente no plasma de apenas uma cadela do grupo *MAST* (Cadela 12).

No gene *BRCA1*, detectou-se um total de seis variantes *missense* (26%, 6/23), sendo todos polimorfismos de nucleotídeo único, em que três estavam localizados no éxon 9, c.877>G (p.His293Asp), c.1332>G (p.Arg444Ser), c.3622 A>G (p.Thr1208Ala); um no éxon 8, c.607A>G (p.Lys203Glu); um no éxon 17, c.5198G>A (p.Arg1733Lys) e um no éxon 22, c.5617G>A (p.Ala1873Thr). No entanto, a maioria dos SNPs foram identificados somente na cadela 14 (*MAST*), exceto o c.877>G (p.His293Asp) que foi detectado na cadela 9 (*RD*). Nesse gene, a maioria das variantes identificadas foram classificadas como possivelmente benignas, exceto p.Ala1873Thr e p.Arg444Ser, pois ocorreu um conflito de patogenicidade.

Um total de três variantes *missense* foram identificadas no gene *STK11* (13%, 3/23), sendo todas polimorfismos de nucleotídeo único e localizadas no éxon 1. O SNP mais comumente observado foi o c.109C>T (p.Pro37Ser) presente em seis cadelas (Cadela 1, 5, 6, 9, 11, 15). Interessantemente, o SNP não foi detectado no grupo *CTR* (Tabela 4), mas foi classificado como possivelmente benigno pelos programa de predição *in silico*. Em contraste, os SNPs c.293T>G (p.Phe98Ser) e c.286A>G (p.Met96Val) foram detectados somente na cadela 3 (*RD*), mas também classificados como possivelmente benignos.

Neste estudo, no gene *TP53* foi identificado somente um SNP (c.440G>A, p.Arg147His), localizado no éxon 5, detectado na cadela 2 (*RD*). Curiosamente, para essa variante ocorreu conflito de patogenicidade.

5.5 Variantes *moderate* identificadas nos genes de moderada penetrância *PALB2*, *ATM*

A tabela 5, demonstra a ocorrência de variantes plasmáticas nos diferentes grupos avaliados.

Tabela 5. Ocorrência de variantes nos genes de moderada penetrância detectadas no plasma dos diferentes grupos estudados (*RD*, *MAST*, *CTR*)

Gene	SNPS/Indels	Variante	Classif.	RD (n=10)	MAST (n=5)	CTR (n=5)	p = valor	TOTAL %
<i>PALB2</i>	c.2846C>T	p.Ala949Val	VPP	1	ND	1	-	0,10
<i>PALB2</i>	c.1153G>A	p.Asp385Asn	VPB	5	4	3	0,833	0,60
<i>PALB2</i>	c.1187G>A	p.Gly396Glu	VPB	6	4	2	0,442 7	0,60
<i>PALB2</i>	c.1769_1783 delCTAGCACATCAGGTG	p.Pro590_Val595 delinsLeu	VPP	ND	ND	1	-	0,05
<i>ATM</i>	c.3431A>T	p.His1144Leu	VPB	4	4	4	0,276	0,60
<i>ATM</i>	c.5273T>C	p.Met1758Thr	VPB	9	5	5	1	0,95
<i>ATM</i>	c.6568G>A	p.Gly2190Arg	VPB	ND	ND	1	-	0,05

ND: não detectado

No gene *PALB2* foram identificadas quatro variantes, sendo três polimorfismos de nucleotídeo único, c.2846C>T (p.Ala949Val), c.1187G>A (p.Gly396Glu), c.1153G>A (p.Asp385Asn) e uma deleção c.1769_1783delCTAGCACATCAGGTG (p.Pro590_Val595delinsLeu). Em relação à frequência das variantes na população, foi observado que os SNPs c.1153G>A (p.Asp385Asn) e c.1187G>A (p.Gly396Glu) foram os mais frequentes (60%), sendo que onze cadelas tinham ambos polimorfismos (3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 18), todos classificados como possivelmente benignos pelos algoritmos *in silico*. O SNP c.2846C>T(p.Ala949Val) e a deleção p.Pro590_Val595delinsLeu foram observados nas cadelas 8 e 20, respectivamente, sendo os dois considerados possivelmente prejudiciais.

No gene *ATM*, observaram-se três polimorfismos de nucleotídeo único, c.3431A>T (p.His1144Leu), c.5273T>C (p.Met1758Thr) e c.6568G>A (p.Gly2190Arg), localizados no éxon 25, 36 e 45, respectivamente. Em ordem crescente os SNPs mais frequentes foram o c.5273T>C (p.Met1758Thr) (95%, 19/20), c.3431A>T (p.His1144Leu) (60%, 12/20) e c.6568G>A (p.Gly2190Arg) (5%, 1/20), todos classificados como possivelmente benignos. Por fim, é importante destacar que a

maioria das variantes identificadas no plasma das cadelas recém diagnosticadas com neoplasias mamárias (*RD*), também foram observadas no fragmento tumoral (Apêndice G).

A tabela 6 demonstra as variantes conflituosas e possivelmente prejudiciais observadas na população estudada. A maioria dessas variantes foram detectadas somente em uma cadela, sendo mais frequente em cadelas com histórico de neoplasia mamária (*RD* e *MAST*). Dentre essas, a cadela 9 apresentou maior quantidade de variantes específicas no gene *BRCA2*, enquanto a cadela 14 apresentou maior quantidade de variantes específicas no gene *BRCA1*. Curiosamente, no grupo de cadelas sem histórico de neoplasia (*CTR*), na cadela 20 foram detectadas duas variantes possivelmente patogênicas. Por fim, foi observado que a maioria das cadelas portadoras dessas variantes eram cadelas de raça definida (Tabela 6)

Tabela 6. Análise individual das cadelas portadoras de variantes conflituosas e possivelmente patogênicas classificadas de acordo com os algoritmos *in silico*.

Animal	Grupo	Idade	Raça	Catração	Estágio	Diagnóstico	Gene	Variante Plasma	Variante Fragmento	Classif.
CADELA 2	RD	15	Pequinês	sim	T2N0M1	Osteossarcoma Mamário	BRCA1	—	p.Pro525Ser	CP
CADELA 2	RD						TP53	p.Arg147His	—	CP
CADELA 2	RD						BRCA2	p.Cys2229Phe	p.Cys2229Phe	VPB*
CADELA 3	RD	7	SRD	não	T2N0M0	Ca tubular e misto grau 2	BRCA2	—	p.Leu2307del	VPP
CADELA 3	RD						BRCA2	—	p.Lys801Gln	CP
CADELA 3	RD						STK11	p.Phe98Ser	p.Phe98Ser	VPB*
CADELA 3	RD						STK11	p.Met96Val	p.Met96Val	VPB*
CADELA 8	RD	13	Yorkshire terrier	sim	T1N0M0	Ca tubular grau 1	PALB2	p.Ala949Val	p.Ala949Val	VPP
CADELA 9	RD	13	Pastor Belga Branco	sim	T2N0M0	Ca em tumor misto Grau 1	BRCA2	p.Ile2614Thr	—	CP
CADELA 9	RD						BRCA2	p.Ile2614Val	—	CP
CADELA 9	RD						BRCA2	p.Thr1425Pro	—	VPP
CADELA 9	RD						BRCA1	p.His293Asp	—	VPB*
CADELA 12	MAST	10	SRD	sim	T2N1M1	Ca tubular grau 3	BRCA2	p.Leu2307del	—	VPP
CADELA 14	MAST	9	Poodle	sim	T3N1M0	Ca em tumor misto Grau 3	BRCA1	p.Arg444Ser	—	CP
CADELA 14	MAST						BRCA1	p.Thr1208Ala	—	VPB*
CADELA 14	MAST						BRCA1	p.Arg1733Lys	—	VPB*
CADELA 14	MAST						BRCA1	p.Ala1873Thr	—	CP
CADELA 14	MAST						BRCA1	p.Ala1873Thr	—	CP
CADELA 20	CTR	8	Shih Tzu	não			BRCA2	p.Thr1425Pro	—	VPP
CADELA 20	CTR						PALB2	p.Pro590_Val595 delinsLeu	—	VPP

*VPB: detectadas somente em um animal

CP: conflito de patogenicidade

VPP: Variante possivelmente patogênica

6 DISCUSSÃO

Há alta ocorrência de neoplasias mamárias em cadelas idosas (+10 anos) de raças definida (60%), esses resultados são comumente relatados por outros pesquisadores (Salas et al., 2016; Vascellari et al., 2016; Oliveira, 2016; Pastor et al., 2018; Nunes et al., 2018), demonstrando a importância destes fatores (raça e idade) em diferentes populações. No entanto, no grupo recém diagnosticado (*RD*), metade dos animais foram classificados como SRD, sabe-se que os tumores mamários também acometem animais sem raça definida (Andrade et al., 2017; Senhorello, 2017). Dessa forma, a associação entre raça e neoplasia mamária também depende do local em que a pesquisa é realizada, como neste estudo havia poucos animais provenientes de diferentes regiões não foi possível estabelecer um perfil racial da população estudada.

Além da idade e da raça, a castração tardia também contribui para o desenvolvimento do câncer de mama em cadelas, sendo considerada um dos principais fatores associados à doença (Schneider et al., 1969). Neste contexto, foi observado que metade (50%) das cadelas recém diagnosticadas com neoplasias mamárias eram castradas, mas castradas tardiamente o que pode ter contribuído para o aparecimento dos tumores (Tabela 2). Apesar do número limitado de animais os resultados obtidos estão de acordo com a literatura e levantamentos epidemiológicos brasileiros que constataram tais achados, ao caracterizarem as fêmeas geriátricas não castradas ou castradas tardiamente, as mais suscetíveis para o desenvolvimento da doença (Toríbio et al., 2012; Salas et al., 2015; Firmo, 2016; Sorenmo et al., 2020).

Em relação ao tipo histológico, verificou-se que a maioria das cadelas foram diagnosticadas com tumores epiteliais (73,33%), sendo o subtipo carcinoma em tumor misto o mais frequente (40%), esse resultado é similar ao descrito recentemente por Nunes et al. (2018). Segundo os autores cadelas diagnosticadas com carcinoma em tumor misto normalmente apresentam tempo de sobrevida maior quando comparado a outros subtipos. No entanto, além do tipo histológico outros fatores devem ser considerados para prever o curso clínico dos tumores mamários caninos. Atualmente os mais utilizados são estadiamento clínico e o grau histopatológico (Goldsmith, 2011; Cassali et al., 2014).

Em mulheres, a presença de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* também podem auxiliar a prever o comportamento clínico da doença e direcionar condutas terapêuticas. Neste contexto, portadoras de mutação no gene *BRCA1* desenvolvem principalmente tumores com fenótipos mais agressivos (RE, RP, HER2 negativos), enquanto as portadoras de mutação no gene *BRCA2* têm maior probabilidade de desenvolverem tumores positivos para receptores de estrogênio e progesterona (Talhouet et al., 2020). Dessa forma, é importante relatar que dentre os animais diagnosticados com carcinoma em tumor misto, apenas as cadelas 9 e 14, apresentaram variantes específicas nos genes *BRCA2* e *BRCA1*, respectivamente. A maioria dessas variantes não foram identificadas em outras cadelas (Tabela 6). Interessantemente, a cadela 14, diagnosticada com carcinoma em tumor misto grau III e metástase linfática, apresentou cinco variantes no gene *BRCA1*, demonstrando a necessidade de se investigar a presença de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* no câncer de mama em cadelas buscando associá-las às características tumorais.

Curiosamente, também foi observado que a maioria das cadelas de raça foram diagnosticadas com tumores mamários mais agressivos, como o Osteossarcoma (Cocker Spaniel e Pequínês), Condrossarcoma (Basset Hound) e Carcinossarcoma (Beagle), enquanto todas as cadelas sem raça definida foram diagnosticadas com tumores epiteliais. Neste contexto, a análise multivariada demonstrou alguma associação entre raça e tipo histológico em cadelas portadoras de neoplasia mamária, sendo os tumores mesenquimais associados à raça Cocker e os epiteliais às sem raça definida (Salas et al., 2015). Segundo os autores os resultados obtidos instigam a investigação do câncer de mama hereditário através da genética molecular.

Vale a pena ressaltar que na população estudada os animais de raça definida tinham maior quantidade de variantes conflituosas e possivelmente patogênicas quando comparadas às cadelas sem raça definida (Tabela 6). No entanto, dentre as cadelas com diagnóstico de neoplasia mesenquimal, a cadela 2 foi a única que apresentou variantes específicas, identificadas nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*, sendo que para as variantes Pro525Ser (*BRCA1*) e Arg147His (*TP53*) ocorreu um conflito de patogenicidade. Interessantemente, em mulheres, a variante germinativa identificada no gene *TP53*, p.Arg158His, tem sido classificada como patogênica e relatada em vários indivíduos com a síndrome de Li-Fraumeni (CLINVAR, 2020).

Dentre os animais de raça definida, a cadela 20, também merece evidência, pois trata-se de uma cadela Shih Tzu, sem histórico de neoplasia mamária (CTR), mas portadora de duas variantes possivelmente patogênicas, p.Thr1425Pro e p.Pro590_Val595delinsLeu, nos genes *BRCA2* e *PALB2*, respectivamente. Estudos têm sugerido aumento significativo de câncer em animais da raça Shih Tzu associados à castração precoce (Hart et al., 2020), mas também parece ser uma raça predisposta ao aparecimento do câncer de mama em idade precoce e com fenótipos mais agressivos (Im et al., 2013). Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo reforçam a hipótese proposta por Salas et al. (2015).

De modo similar ao que ocorre nos genes de predisposição ao câncer de mama em mulheres, analisados por meio do NGS, foi observada grande quantidade de variantes que não fornecem evidências de um efeito patogênico nas cadelas, sendo que para 86,23% (*Modifier e Low*) não se espera nenhuma patogenicidade e para 13,76% (*Moderate*) o significado da variante é incerto. Por esse motivo, o foco principal do estudo foi classificar as variantes de significado incerto (*missense e inframe*), através de programas computacionais na busca de variantes com possível efeito patogênico, pois essas estão localizadas em regiões codificantes e foram classificadas como de moderado impacto.

No entanto, é importante comentar que apesar das variantes modificadoras estarem localizadas em regiões não codificantes, por isso não se espera nenhuma patogenicidade, na medicina humana, existem evidências que variantes não codificantes podem contribuir para o desenvolvimento do câncer hereditário, pois a presença dessas podem impactar na transcrição do gene ou interferir na metilação, o que ocasiona padrão aberrante. Além disso, podem impactar na pós-transcrição, criando ou interrompendo sítios de ligação complementar de microRNA e interferindo na estabilidade de RNAs e microRNAs. As sequências não codificantes correspondem a 98% do genoma, portanto, deve-se priorizar a identificação de regiões com maior chance de portar uma variante que contribua para a doença (Dos Santos et al., 2018).

Dentre as variantes categorizadas como de moderado impacto (13,76%, 30/218), o tipo *missense_variant* foi o mais comum (90,46%, 27/30). Segundo o *National Cancer Institute* (NCI, 2020), a variante *missense* é uma alteração genética

em que a substituição de um único nucleotídeo altera o código genético, pois produz um aminoácido diferente do aminoácido usual naquela posição. Assim, algumas variantes *missense* (ou mutações *missense*) irão alterar a função da proteína. No entanto, como mencionado anteriormente, apesar da variante *missense* alterar o aminoácido da proteína, essas variantes são classificadas como de significado incerto e há necessidade de classificá-las corretamente como deletérias (Concolino et al., 2019).

O gene *BRCA 2*, foi o que apresentou a maior quantidade de variantes *missense*, sendo identificados um total de onze polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), a maioria (7/11) no éxon 11. Neste sentido, estudos têm demonstrado que o éxon 11 é o local mais acometido por SNPs (Hsu et al., 2010; Borge et al., 2011, Ozmen et al., 2017; Maués et al., 2018), e alguns autores têm sugerido uma possível associação entre os SNPs identificados no éxon 11 com o desenvolvimento do câncer de mama em cadelas (Maués et al., 2018). No entanto, apesar deste estudo corroborar com os resultados obtidos por outros pesquisadores, não foi possível estabelecer uma associação significativa dos SNPs identificados com o desenvolvimento do câncer de mama em cadelas.

Neste contexto, verificou-se que os SNPs c.2222A>G (p.Asn741Ser), c.2183C>T (p.Ala728Val), c.2144C>A (p.Pro715Gln) no éxon 11 foram comumente detectados nas cadelas (90%) e classificados como provavelmente benignos pelos programas de predição. Além disso, foi observado por meio do IGV que os polimorfismos se encontravam em homozigose e presentes na maioria das amostras de DNA do plasma e tecido. Interessantemente, os resultados obtidos são semelhantes à pesquisa recentemente publicada por Huskey et al. (2020), mas os autores sugeriram uma possível associação das variantes com o câncer de mama em cadelas o que não foi observado neste estudo. Portanto, com base nos resultados obtidos sugere-se que essas variantes detectadas no gene *BRCA2* são comuns na população canina e provavelmente não estão associadas as neoplasias mamárias.

De modo similar, o SNP c.1158T>G (p.Cys386Trp) identificado no éxon 10, foi comumente detectado nas cadelas (90%), sendo observado em homozigose na maioria das pacientes. Dessa forma, levando em consideração a frequência elevada de polimorfismos homozigóticos na população, classificados como possivelmente

benignos, infere-se que essa variante não esteja associada as neoplasias mamárias em cadelas. No entanto, no estudo realizado por Huskey et al. (2020) também foi sugerido uma possível associação dessa variante com o câncer de mama em cadelas, pois na comparação das frequências alélicas entre os casos de tumores mamários com o controle foi constatada diferença significativa associada principalmente a raça Husky Siberiano, porém estudos maiores avaliando diferentes raças devem ser realizados para validar essa associação.

Em relação ao polimorfismo c.4304A>G (p.Lys1435Arg) localizado no éxon 11, não foi possível estabelecer uma associação significativa com o câncer de mama em cadelas e também foi classificado como possivelmente benigno pelos programas de predição *in silico*. No entanto, é importante destacar que, p.Lys1435Arg, foi comumente observada em cadelas recém diagnosticadas com neoplasia mamária (60%, RD) quando comparadas ao grupo sem neoplasia (10%, CTR) (Tabela 4). Esse resultado foi semelhante ao observado por Maués et al. (2018), no qual observaram a presença da variante em 68,8% das cadelas com tumores mamários. Interessantemente, Lys1435Arg tem equivalência a mutação Lys1440Arg classificada como uma VUS pelo banco de dado humano (CLINVAR, 2020).

Contrariamente aos modelos computacionais, estudos sugerem que essa variante seja possivelmente prejudicial, pois está localizada em um domínio importante do gene *BRCA2* (BRC3), que em condição normal interage com enzima RAD51, visando o reparo do DNA e a manutenção da integridade genômica das células. Dessa forma, os autores supõem que alterações nessa região podem enfraquecer a ligação e provocar um reparo defeituoso (Yoshikawa et al., 2008; Yoshikawa et al., 2012). Além disso, estudos recentes têm demonstrado predominância da variante em animais de raças predispostas ao câncer de mama, como Poodle e Chihuahuas (Maués et al., 2018; Ochiai et al., 2015). Neste estudo, não foi possível estabelecer uma associação com uma raça definida, mas foi observado que cadelas de diferentes raças eram portadoras da variante, sugerindo que o polimorfismo seja derivado de diferentes ancestrais corroborando com Ochiai et al. (2015).

Do mesmo modo, a variante Thr1425Pro está localizada no domínio BRC3 do éxon 11 do gene *BRCA2*, sendo considerada possivelmente patogênica (Yoshikawa

et al., 2012; Ozmen et al., 2017). Porém, em contraste a Lys1435Arg, a variante Thr1425Pro foi considerada deletéria por todos programas de predição. Além disso, em um ensaio com o sistema de dois híbridos de mamífero (*MTH, Mammalian two-hybrid system*), uma técnica de alto rendimento para avaliar interações entre proteínas, a combinação BRC3-4 contendo o alelo 1425P em BRC3 reduziu claramente a força de ligação o que não ocorreu para a variante Lys1435Arg (Ochiai et al., 2015). Os autores também observaram somente dois animais com alelos homozigóticos para 1425P (2/236) e nenhum cão da raça labrador portador da variante (n=51). Dessa forma, os pesquisadores sugeriram que o alelo 1425P pode estar associado à predisposição a tumores mamários. Neste estudo, somente uma cadela do grupo *RD* era portadora da variante Thr1425Pro corroborando com o estudo realizado por Maués et al. (2018) que observaram a variante somente em 10% das cadelas (5/48). Como já citado, foi observado que a cadela 20, do grupo *CTR*, era portadora do alelo 1425P, o que pode sugerir uma maior predisposição ao câncer, devido a mutação possivelmente patogênica identificada no gene *BRCA2*.

Para c.2401A>C (p.Lys801Gln) ocorreu um conflito de patogenicidade, sendo considerada possivelmente prejudicial pelo VEP e PROVEAN, mas foi identificada no plasma de apenas uma cadela recém diagnosticada com neoplasia mamária (1/10) e presente no fragmento tumoral de três cadelas (3/10). A Lys801Gln foi recentemente relatada em cadelas com tumores mamários com uma frequência superior a observada neste estudo (Maués et al., 2018). No entanto, no estudo realizado por Huskey et al. (2020) não ocorreu diferença significativa entre o grupo controle e os casos de tumor mamário, porém os autores sugeriram uma possível associação ($p=0,0868$), justificando que o resultado foi influenciado pelo número reduzido de animais (n=14). Em vista disso e de acordo com Maués et al. (2018), existe à possibilidade de Lys801Gln estar associada ao câncer de mama em cadelas, pois está localizada em uma área fortemente conservada e uma alteração nessa região do gene tem probabilidade maior de ocasionar à doença do que polimorfismos ocorrendo em regiões com menor grau de conservação.

Como neste estudo a variante também foi frequente no grupo sem neoplasia (3/5), a hipótese é que Lys801Gln não está associada aos tumores mamários caninos ou os animais ainda irão desenvolver a neoplasia mamária, pois são cadelas idosas,

não castradas ou castradas tardiamente. Além disso, a presença da mutação aumentaria o risco, mas são necessários vários fatores contribuintes para o aparecimento do câncer de mama.

Do mesmo modo, o SNP c.428A>G (p.His143Arg), foi mais frequente no fragmento tumoral (5/10) de cadelas do grupo recém diagnosticado (*RD*), sendo detectado no plasma de apenas uma cadela (*RD*), mas foi classificada como uma variante provavelmente benigna. Na literatura, as pesquisas têm demonstrado resultados contraditórios para essa variante, sendo inicialmente não associada ao câncer de mama por Yoshikawa et al. (2008), mas posteriormente prevista como possivelmente patogênica por Borge et al. (2011) e atualmente associada ao risco de câncer de mama em Golden Retrievers (Huskey et al., 2020).

No gene *BRCA2*, além dos polimorfismos de nucleotídeo único, também foram identificados dois *indels*. Dessa forma, foi visto que duas cadelas recém diagnosticadas com neoplasia mamária (*RD*) e uma cadela sem neoplasia (*MAST*), eram portadoras da variante c.9995_9996insAAA (p.M3332delinsIK). A inserção 9996insAAA é equivalente a 10204insAAA descrita por Yoshikawa et al. (2005) e a priori foi descrita como uma variante possivelmente prejudicial, pois estava associada a uma taxa de morbidade tumoral significativamente maior quando comparada com a deleção 1024delAAA. Esse resultado foi semelhante ao descrito por Borge et al. (2011). No entanto, estudos posteriores sugeriram que a inserção seja possivelmente benigna (Yoshikawa et al., 2012; Enginler et al., 2014). Além disso, essa variante foi considerada benigna pelo programa de predição PROVEAN. No entanto, recentemente um estudo levantou novamente a hipótese que a inserção seja possivelmente prejudicial, pois na comparação das frequências alélicas entre o grupo controle com cadelas portadoras de tumores mamários a inserção foi associada a um risco aumentado de câncer de mama, sendo mais fortemente associado aos Huskies Siberianos (Huskey et al., 2020), porém os autores sugeriram estudos maiores para sustentar essa associação.

A deleção, p.Leu2307del, foi considerada como possivelmente patogênica pelo programa de predição PROVEAN, porém essa variante foi detecta somente no plasma da cadela 12 e no fragmento tumoral da cadela 3 ambas *SRD* e com diagnóstico histopatológico de carcinoma tubular (Tabela 6). No entanto, apesar da

deleção ter sido classificada como deletéria pelo algoritmo *in silico*, na literatura ainda não foi relatada uma associação com o câncer de mama em cadelas (Enginler et al., 2014; Huskey et al., 2020).

Por fim, dentre os animais portadores de variantes no gene *BRCA2*, a cadela 9 apresentou a maior quantidade de variantes conflituosas e possivelmente patogênicas (Ile2614Thr, Ile2614Val, Thr1425Pro), sugerindo que essas variantes no gene *BRCA2* podem estar associadas ao câncer de mama nesta cadela, mas são necessários estudos funcionais com uma quantidade maior de animais para validação dessas variantes.

De forma geral, observou-se que no gene *BRCA1* a quantidade de variantes detectadas foi inferior ao gene *BRCA2*, sendo o éxon 9 o mais acometido. Esses resultados também foram relatados por outros pesquisadores, mas nesses estudos foram identificadas somente variantes sinônimas (*synonymos_variant*) (Borge et al., 2011; Enginler et al., 2014), que são classificadas como de baixo impacto, por ocasionarem uma mutação silenciosa. Em contraste, neste estudo foram detectadas seis novas variantes *missense* (nonsynonymous) que ainda não foram descritas na literatura e já comentadas anteriormente.

No gene *STK11*, foram identificadas três variantes *missense* todas localizadas no éxon 1. Dentre os polimorfismos detectados, o mais frequente foi o c.109C>T (Pro37Ser ou P37S) ocorrendo em 30% da população estudada. Em contraste, os SNPs c.293T>G (p.Phe98Ser) e c.286A>G (p.Met96Val) foram identificados somente na cadela 3. No entanto, todos os polimorfismos foram classificados como possivelmente benignos pelos programas de predição.

Contrariamente aos modelos computacionais, no estudo realizado por Huskey et al. (2020), foi sugerido que essas variantes desempenham um papel fundamental no risco de câncer de mama em cadelas, pois os autores observaram diferença estatística entre as frequências alélicas nas diferentes raças estudadas, sendo gerados valores de *p* significativos para as variantes Met96Val (*p*=0,0002) e Phe98Ser (*p*=0,0148) nas raças *Siberian Huskies* e *Standard Schnauzers*, respectivamente. Já a variante p.Pro37Ser, foi detectada somente em uma cadela Dálmata, mas nas análises específicas os autores sugeriram que a variante possivelmente aumente o risco de tumores mamários nessa raça (*p*=0,0148).

No entanto, os resultados obtidos neste estudo se diferem em partes dos resultados obtidos por esses autores, principalmente em relação as características raciais, que não foram avaliadas devido ao número reduzido de animais e para a variante, Pro37Ser, que foi frequentemente observada, sendo detectada em animais de diferentes raças. Vale a pena destacar que apesar de não ocorrer diferença significativa dessa variante entre os grupos estudados, foi observado que nenhuma cadela do grupo *CTR* apresentou essa variante, demonstrando a necessidade de estudos com uma quantidade maior de animais de diferentes raças predispostas para verificar se realmente não há associação com o câncer de mama em cadelas. Nesse sentido, as raças avaliadas por Huskey et al. (2020) não são fortemente reconhecidas como predispostas ao câncer de mama, refletindo provavelmente a população de cadelas da região do estudo.

Em relação aos genes de moderada penetrância associados ao CM em mulheres foram identificadas variantes de moderado impacto que ainda não foram descritas na literatura. No gene *PALB2* foram identificados um total de quatro variantes, sendo três polimorfismos únicos c.1187G>A (p.Gly396Glu), c.2846C>T (p.Ala949Val), c.1153G>A (p.Asp385Asn) e uma deleção c.1769_1783delCTAGCACATCAGGTG (p.Pro590_Val595delinsLeu). Dentre os polimorfismos identificados, os mais comuns na população e classificados como possivelmente benignos foram: c.1187G>A (p.Gly396Glu) e c.1153G>A (p.Asp385Asn). Em contraste, as variantes p.Ala949Val e p.Pro590_Val595delinsLeu detectadas nas cadelas 8 e 20, respectivamente. Foram consideradas possivelmente patogênicas pelos programas de predição *in silico*. Assim, baseado nos resultados obtidos pelos modelos computacionais, os dados sugerem que as variantes p.Gly396Glu e p.Asp385Asn provavelmente não estão associadas ao câncer de mama em cadelas, enquanto que as variantes possivelmente patogênicas no gene *PALB2* (p.Ala949Val e p.Pro590_Val595delinsLeu) podem estar associadas a um risco aumentado de câncer.

No gene *ATM*, dentre os polimorfismos detectados, os mais comuns na população foram: c.5273T>C (p.Met1758Thr) e c.3431A>T (p.His1144Leu), sendo classificados como provavelmente benignos pelos programas de predição. Além disso, foi observado, por meio do IGV, que a maioria dos polimorfismos estavam em

homozigose. Em vista disso e levando em consideração os resultados obtidos pelos algoritmos *in silico*, infere-se que as variantes *missense* detectadas no gene *ATM* são comuns na população canina e provavelmente não estão associadas ao câncer de mama em cadelas.

Por fim, neste estudo foram detectadas variantes conflituosas e possivelmente patogênicas nos genes de alta (*BRCA1*, *BRCA2*, *STK11* e *TP53*) e moderada penetrância (*PALB2*) associados ao CM em mulheres nas cadelas com histórico de neoplasia mamária, sendo a maioria identificada em raças específicas. No entanto, a maioria das variantes possivelmente patogênicas foram classificadas por modelos computacionais *in silico* e detectadas somente em uma cadela. Dessa forma, são necessárias pesquisas clínicas experimentais com um número maior de animais para investigar os efeitos funcionais que não podem ser analisados por esses algoritmos, mas vale ressaltar que neste estudo verificou-se que os fatores genéticos individuais existem e devem ser levados em consideração para que se possa atingir os objetivos da medicina de precisão.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo, em função dos resultados obtidos, conclui-se que:

- ✓ O sequenciamento de nova geração conseguiu detectar no plasma de cadelas com e sem neoplasia mamária uma grande quantidade de variantes germinativas, ainda de significado incerto, nos genes de alta e moderada penetrância associados ao câncer de mama em mulheres.
- ✓ A maioria das variantes germinativas *missense* são consideradas possivelmente benignas pelos algoritmos *in silico*.
- ✓ As variantes possivelmente benignas, Lys1435Arg e Pro37Ser, detectadas nos genes *BRCA2* e *STK11*, são mais frequentes em cadelas com histórico de neoplasia mamária em relação às cadelas sem neoplasia.
- ✓ Genes importantes associados ao câncer de mama, *BRCA2* e *PALB2*, apresentam variantes consideradas possivelmente patogênicas: Thr1425Pro, p.Leu2307del e p.Ala949Val, p.Pro590_Val595delinsLeu.
- ✓ Estudos adicionais são necessários para validar as variantes detectadas em cadelas com neoplasias mamárias para que futuramente as pacientes possam se beneficiar com uma terapia personalizada.

8 REFERÊNCIAS

- Abdelmegeed SM, Mohammed S (2018) Canine mammary tumors as a model for human disease. **Oncology Letters** 15:8195–8205.
- Alemar B, Gregório C et al. (2017) BRCA1 and BRCA2 mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? **PLoS One** 12:e0187630.
- Alkaf A, Al-Jafari A, Wani TA, Alqattan S, Zargar S (2017) Expression of STK11 gene and its promoter activity in MCF control and cancer cells. **Three Biotech** 7:362.
- Alkan C, Coe B, Eichler E (2012) GATK toolkit. **Nature Reviews Genetics** 12:363–76.
- Andrade MB, Guimarães EC, Coletto AF, Soares NP, Medeiros-Ronchi AA (2017) Retrospective Study of Mammary Lesions in Bitches - Uberlândia, MG, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae** 45:1509.
- Andrews S (2010) **FastQC**: a quality control tool for high throughput sequence data. Cambridge, United Kingdom: Babraham Bioinformatics, Babraham Institute.
- Antoniou A, Pharoah PD et al. (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. **American Journal of Human Genetics** 72:1117–1130.
- Antoniou AC, Casadei S et al. (2014) Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. **The New England Journal of Medicine**. 37:497-506.
- Apostolou P, Fostira F. (2013). Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. **BioMed Research International** 2013:747318.
- Bendl J, Stourac J et al. (2014) PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. **PLoS Computational Biology** 10:e1003440.
- Borge KS, Borresen-Dale AL, Lingaas F (2011) Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumor. **Veterinary and Comparative Oncology** 9:241-250.
- Bowden NA (2014) Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? **Cancer Letters** 346:163-71.
- Burrai GP, Tanca A et al. (2015) Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer? **Tumour Biology** 36:9083-91.

Canadas A, Santos M, Nogueira A, Assis J, Gomes M, Lemos C, Medeiros R, Dias-Pereira P (2018) Canine mammary tumor risk is associated with polymorphisms in RAD51 and STK11 genes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 30:733-738.

Cassali GD, Jark PC et al. (2020) Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors – 2019. **Brasilian Journal of Veterinary Pathology**. 13:555 – 574

Cassali GD, Lavalle GE et al. (2014) Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine mammary Tumors. **Brasilian Journal of Veterinary Pathology** 7:38-69.

Chen H, Wu J, Zhang Z., Tang Y, Li X, Liu S, Cao S, Li X (2018) Association between BRCA Status and Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. **Frontiers in pharmacology** 9:909.

Choi M, Kipps T, Kurzrock R (2016) ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. **Molecular Cancer Therapeutics**. 15:1781-91.

Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012) Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. **PLoS One** 7:e46688.

Cingolani P, Platts A et al. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. **Fly** 6:80–92.

Ciriello G, Gatza ML et al. (2015) Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. **Cell** 163:506–519.

Public Archive of Interpretations of Clinically Relevant Variants (2020) **ClinVar**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Acesso em: 09 Nov. 2020

Clouaire T, Marnef A, Legube G (2017) Taming Tricky DSBs: ATM on duty. **DNA Repair** 56:84-91

Coelho AS, Santos MAS, Caetano RI, Piovesan CF, Fiuza LA, Machado RLS, Furini AAC (2018) Hereditary predisposition to breast cancer and its relation to the BRCA1 and BRCA2 genes: literature review. **Revista Brasileira Análises Clínicas** 50:17-21.

Concolino P, Gelli G, Rizza R, Costella, A, Scambia G, Capoluongo E (2019) BRCA1 and BRCA2 Testing through Next Generation Sequencing in a Small Cohort of Italian Breast/Ovarian Cancer Patients: Novel Pathogenic and Unknown Clinical Significance Variants. **International Journal of Molecular Sciences** 20:3442.

Cooley DM, Beranek BC, Schlittler DL, Glickman NW, Glickman LT, Waters DJ (2002) Endogenous gonadal hormone exposure and bone sarcoma risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention** 11:1434-40.

Corso G, Figueiredo J et al. (2014) E-cadherin germline mutation carriers: clinical management and genetic implications. **Cancer and Metastasis Review** 33:1081-94.

Corso G, Figueiredo J et al. (2018) hereditary lobular breast cancer with an emphasis on E-cadherin genetic defect. **Journal of Medical Genetics** 55:431-441.

Couch FJ, Hart SN et al. (2015) Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. **Journal of Clinical Oncology** 33:304-11.

Cremona C, Behrens A (2014) ATM signalling and cancer. **Oncogene** 33:3351–3360

De Nardi AB, Ferreira TMMR, Assunção KA (2016) Neoplasias Mamárias. In.: De Nardi AB, Daleck CR (Eds). **Oncologia de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, p. 726-756

De Silva S, Tennekoon KH, Karunanayake EH (2019) Overview of the genetic basis toward early detection of breast cancer. **Breast Cancer (Dove Medical Press)** 11:71–80.

De Talhouet S, Peron J et al. (2020) Clinical outcome of breast cancer in carriers of *BRCA1* and *BRCA2* mutations according to molecular subtypes. **Scientific Reports** 10:7073.

Dziadkowiec KN, Gąsiorowska E, Nowak-Markwitz E, Jankowska A (2016) PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. **Przegląd Menopauzalny** 15:215–219.

Elazezy M, Joosse SA (2018) Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. **Computational and Structural Biotechnology Journal** 16:370-378.

Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology** 19:403-10.

Enginler SO, Akış I et al. (2014) Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours. **Veterinary Research Communication** 38:21-27.

Evans MK, Longo DL (2014) PALB2 mutations and breast-cancer risk. **The New England Journal of Medicine** 371:566–568.

Farmer H, McCabe N et al. (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. **Nature** 434:917-21.

Felicio PS (2015) **Caracterização genética e epigenética do gene brca1 em mulheres brasileiras em risco para câncer de mama hereditário**. 127 f. Dissertação (Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Fenton, HMD, Carlile BRDO et al. (2006) Expressão da proteína LKB1 em câncer de mama humano, **Immunohistochemistry & Molecular Morphology** 14:146-153

Firmo BF (2016) **Aspectos clinico-epidemiológicos das neoplasias mamárias em cadelas atendidas pela Unesp – campus de Jaboticabal**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Fonseca CS, Daleck CR (2000) Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural** 30: 731-735.

Foulkes WD (2008) Inherited susceptibility to common cancers. **The New England Journal of Medicine** 20:2143-53.

Gabriel CA, Domchek SM (2010) Breast cancer in young women. **Breast Cancer Research** 12:212.

Gama A, Paredes J, Gärtner F, Alves A, Schmitt F (2008) Expression of E-cadherin, P-cadherin and beta-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. **Veterinary Journal** 177:45-53.

Geredeli C, Yasar N, Sakin A (2019) Germline Mutations in BRCA1 and BRCA2 in Breast Cancer Patients with High Genetic Risk in Turkish Population. **Internacional Journal of Breast Cancer** 2019:7.

Godet I, Gilkes DM (2017) BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. **Integrative Cancer Science and Therapeutics** 4:1-17.

Goebel K, Merner ND (2017) A monograph proposing the use of canine mammary tumours as a model for the study of hereditary breast cancer susceptibility genes in humans. **Veterinary Medicine and Science** 3:51–62.

Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V (2011) Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**. 48:117-31.

Goldschmidt MH, Peña L, Napoli V (2017) Tumors of the Mammary Gland. In.: Meuten DJ (Eds) **Tumors in Domestic Animals**. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc, p. 723-765.

Gonzalez-Angulo AM, Timms KM et al. (2011) Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. **Clinical**

Cancer Research: an official Journal of the American Association for Cancer Research 17:1082–1089.

Gray M, Meehan J, Martínez-Pérez C, Kay C, Turnbull A.K, Morrison LR, Pang LY, Argyle D (2020). Naturally Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. **Frontiers in Oncology** 10:617.

Hart BL, Hart LA, Thigpen AP, Willits NH (2014) Long-term health effects of neutering dogs: comparison of Labrador Retrievers with Golden Retrievers. **PLoS One** 9: e102241

Hart BL, Hart LA, Thigpen AP, Willits NH (2020) Assisting Decision-Making on Age of Neutering for 35 Breeds of Dogs: Associated Joint Disorders, Cancers, and Urinary Incontinence. **Frontiers in veterinary science** 7:388.

Hearle N, Schumacher V et al. (2006) Frequency and spectrum of cancers in the Peutz–Jeghers syndrome. **Clinical Cancer Research** 12:3209–3215.

Horne HN, Oh H et al (2018). E-cadherin breast tumor expression, risk factors and survival: Pooled analysis of 5,933 cases from 12 studies in the Breast Cancer Association Consortium. **Scientific Reports** 8:6574.

Housman G, Byler S, Heerboth S, et al. (2014) Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers (Basel)** 6:1769-92.

Hsu WL, Huang YH, Chang TJ, Wong ML, Chang SC (2010) Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. **Veterinary Journal** 184:351-356.

Huskey A, Goebel K, Lloveras-Fuentes C, McNeely I, Merner ND (2020) Whole genome sequencing for the investigation of canine mammary tumor inheritance - an initial assessment of high-risk breast cancer genes reveal BRCA2 and STK11 variants potentially associated with risk in purebred dogs. **Canine Medicine and Genetics** 7: 8.

Huszno J, Grzybowska E (2018) TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer. **Oncology Letters** 16:34–40.

Im KS, Kim IH, Kim NH, Lim HY, Kim JH, Sur JH (2013) Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. **Veterinary Journal** 195:366-72.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Ministério da Saúde (2020). **Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 122 p.

Januškevičienė I, Petrikaitė V (2019) Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. **Life Sciences** 239:1-31

Jenne DE, Reimann H et al. (1998) Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase **Nature Genetics** 18:38–43.

Jerzak KJ, Mancuso T, Eisen A. (2018) Ataxia-telangiectasia gene (ATM) mutation heterozygosity in breast cancer: a narrative review. **Current Oncology** 25:e176-e180.

Kadthur JC, Rao S et al. (2011) Prognostic Value of Ki 67 Proliferation Antigen in Canine Malignant Mammary Gland Tumours. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology** 4:36-40.

Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E (2015) Breast cancer risk factors. **Prz Menopauzalny** 14:196-202.

Kamps R, Brandão RD, Bosch BJ, Paulussen AD, Xanthoulea S, Blok MJ, Romano A (2017) Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. **International Journal of Molecular Sciences** 18:308.

Kudela E, Samec M et al. (2019) Breast Cancer in Young Women: Status Quo and Advanced Disease Management by a Predictive, Preventive, and Personalized Approach **Cancers** 11:1791.

Kurian AW, Antoniou AC, Domchek SM (2016) Refining Breast Cancer Risk Stratification: Additional Genes, Additional Information. **American Society of Clinical Oncology** 35:44-56.

Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes AM, Kruse TA (2014) Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. **Breast Cancer (Auckl)** 8:145-155.

Lavalle GE, De Campos CB, Bertagnolli AC, Cassali GD (2012) Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. **In Vivo** 26:375-9.

Lee CH, Kweon OK. (2002) Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science** 3:321-325.

Li H, Handsaker B et al. (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. **Bioinformatics** 25:2078–2079.

Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. **Bioinformatics** 25:1754–1760.

Lim, HY et al. (2015) Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. **The Veterinary Journal**, 203: 326-331.

Litton JK, Rugo HS et al. (2018) Talazoparib in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA mutation. **New England Journal of Medicine** 379:753-63.

Marabelli M, Cheng SC, Parmigiani G (2016) Penetrance of ATM Gene Mutations in Breast Cancer: A Meta-Analysis of Different Measures of Risk. **Genetic Epidemiology** 40:425-31

Matos AJ, Lopes C, Carvalheira J, Santos M, Rutteman GR, Gärtner F (2006) E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. **Journal Comparative Pathology** 134:182-189

Maués T, El-Jaick KB et al. (2018) Common germline haplotypes and genotypes identified in BRCA2 exon 11 of dogs with Mammary Tumors and histopathological analyses. **Veterinary and Comparative Oncology** 16:1–6.

Mavaddat N, Barrowdale D et al. (2012) Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). **Cancer Epidemiol Biomarkers** 21:134-47.

Maxwell KN, Wubbenhorst B et al. (2015) Prevalence of mutations in a panel of breast cancer susceptibility genes in BRCA1/2-negative patients with early-onset breast cancer. **Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics** 17:630-638.

McLaren W, Gil L et al. (2016) The Ensembl Variant Effect Predictor (VEP). **Genome Biology** 17:122.

Mealey KL, Martinez SE et al. (2019) Personalized medicine: going to the dogs? **European Journal of Human Genetics** 138:467–481.

Mersch J, Jackson MA, Park M, Nebgen D, Peterson SK, Singletary C, Arun BK, Litton JK (2015) Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. **Cancer** 121:269–275.

Morrell D, Chase CL, Swift M (1990) Cancers in 44 families with ataxia-telangiectasia. **Cancer Genet Cytogenet** 50:119-23.

Mylavarapu S, Das A, Roy M (2018) Role of BRCA Mutations in the Modulation of Response to Platinum Therapy. **Frontiers in Oncology** 8:16.

National Cancer Institute (NIH) (2020) **NCI Dictionary of Genetics Terms**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/>. Acesso em: 01 set. 2020.

Nieto A, Pérez-Alenza MD et al. (2003) BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. **Journal of Comparative Pathology** 12:260-268.

Nunes FC, Campos CB, Teixeira SV, Bertagnolli AC, Lavallo GE, Cassali GD. (2018). Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with

mammary neoplasms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 70: 1714-1722.

Ochiai K, Ishiguro-Oonuma T et al. (2015) Polymorphisms of canine BRCA2 BRC repeats affecting interaction with RAD51. **Biomedical Research** 36:155-158.

Oliveira JR (2016) **Perfis hemostático e hematológico de cadelas acometidas por carcinoma mamário**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Osaki T, Sunden Y, Sugiyama A, Azuma K, Murahata Y, Tsuka T, Ito N, Imagawa T, Okamoto Y (2016) Establishment of a canine mammary gland tumor cell line and characterization of its miRNA expression. **Journal of Veterinary Science** 17:385–390.

Owen LN (1980) **TNM Classification of tumors in domestic animals**. Geneva: World Health Organization. 53 p.

Ozmen O, Kul S, Risvanli A, Ozalp G, Sabuncu A, Kul O (2017) Somatic SNPs of the BRCA2 gene at the fragments encoding RAD51 binding sites of canine mammary tumors. **Veterinary and Comparative Oncology** 15:1479-1486.

Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pellè E, Quaresmini D, Tucci M, Silvestris F (2018) Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. **Therapeutic Advances Medical Oncology** 10:1758835918794630.

Parachoniak CA, Rankin A et al. (2017). Exceptional durable response to everolimus in a patient with biphenotypic breast cancer harboring an STK11 variant. **Cold Spring Harbor Molecular Case Studies** 3:a000778.

Pastor NI, Caballé NC, Santella M, Ezquerra LJ, Tarazona R, Duran E (2018) Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. **Austral Journal of Veterinary Sciences** 50:143-147.

Pastor N, Esquerra LJ, Santella M, Caballé NC, Tarazona R, Durán ME (2020) Prognostic significance of immunohistochemical markers and histological classification in malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology** 2020:1-10.

Peutz JL (1921) Very remarkable case of familial polyposis of mucous membrane of intestinal tract and nasopharynx accompanied by peculiar pigmentations of skin and mucous membrane. **Nederl Maandischr v Geneesk** 10:134–46

Prapa M, Solomons J, Tischkowitz, M (2017) The use of panel testing in familial breast and ovarian cancer. **Clinical Medicine** 17:568–572.

Qiu HB, Sun WD, Yang X, Jiang QY, Chen S, Lin DG (2015) Promoter mutation and reduced expression of BRCA1 in canine mammary tumors. **Research in Veterinary Science** 103:143-8

Raposo-Ferreira TM, Bueno RC et al. (2016) Downregulation of ATM Gene and Protein Expression in Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology** 53:1154

Reiman A, Srinivasan V et al. (2011) Lymphoid tumours and breast cancer in ataxia telangiectasia; substantial protective effect of residual ATM kinase activity against childhood tumours. **British Journal of Cancer** 105:586-91.

Richards S, Aziz N et al. (2015) ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine** 17:405-23.

Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K, Von Euler H (2009) mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. **Cancer research** 69:8770–8774.

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H et al. (2011) Integrative genomics viewer. **Nature Biotechnology** 29:24-6.

Robson M, Im S-A et al. (2017) Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA Mutation. **New England Journal of Medicine** 377:523-33.

Rosenthal ET, Evans B, Kidd J, Brown K, Goringe H, Orman MV, Manley S (2017) Increased Identification of Candidates for High-Risk Breast Cancer Screening Through Expanded Genetic Testing. **Journal of the American College of Radiology** 4:561-568.

Roy R, Chun J, Powell SN (2011) BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nature Reviews Cancer** 12:68-78.

Rummel S, Varner E, Shriver CD, Ellsworth RE (2013) Evaluation of BRCA1 mutations in an unselected patient population with triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment** 137:119-25.

Salas Y, Márquez A, Diaz D, Romero L (2015) Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A growing animal health problem. **Plos One** 10:e0127381.

Santana Dos Santos E, Lallemand F, Burke L, Stoppa-Lyonnet D, Brown M, Caputo SM, Rouleau E (2018) Non-Coding Variants in BRCA1 and BRCA2 Genes: Potential Impact on Breast and Ovarian Cancer Predisposition. **Cancers (Basel)** 10:453.

Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics** 27:863–864.

Schneider R, Dorn CR, Taylor DON (1969) Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute** 43:1249-1261.

Schon K, Tischkowitz M (2018) Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. **Breast Cancer Research and Treatment** 167:417–423.

Senhorello ILS (2017) **Valor clínico do CEA e da AFP na detecção de carcinoma de mama em cadelas**. 32f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Shabani Azim F, Hourri H, Ghalavand Z, Nikmanesh B (2018) Next Generation Sequencing in Clinical Oncology: Applications, Challenges and Promises: A Review Article. **Iranian Journal of Public Health** 47:1453–1457.

Shafiee R, Javanbakht J, Atyabi N, Kheradmand P, Kheradmand D, Bahrami A, Daraei H, Khadivar F (2013) Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: a Clinico-Cytohstopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. **Cancer Cell International** 13:79.

Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH (2011) Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology** 48:85-97.

Sorenmo KU, Worley DR, Goldschmidt MH (2013) Tumors of the mammary gland. In.: Withrow SJ, Macewen EG (Eds) **Small Animal Clinical Oncology**. Missouri: WB Saunders, p. 538–556.

Sorenmo KU, Worley DR, Zappulli V (2020) Tumors of the Mammary. In.: Vail DM, Thamm DH, Liptak JM (Eds). **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. St. Missouri, ST: Elsevier, p. 604-625

Souza DMB, Barros MGO, Silva JSC, Silva MB, Coletto ZF, Jimenez GC, Adrião M, Wischral A (2012) Detection of mutations within exons 4 to 8 of the p53 tumor suppressor gene in canine mammary glands. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 64:341-348.

Spencer DM, Bilardi RA, Koch TH, Post GC, Nafie JW, Kimura K, Cutts SM, Phillips DR (2008) DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. **Mutation Research** 638: 110-21.

Stoppa-Lyonnet D (2016) The biological effects and clinical implications of BRCA mutations: where do we go from here? **European Journal of Human Genetics**, 24 Suppl1:S3–S9.

Stratton M, Campbell P, Futreal P (2009) The cancer genome. **Nature** 458:719–724.
Taylor AM, Metcalfe JA, Thick J, Mak YF (1996) Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. **Blood** 87:423–438.

The European Bioinformatics Institute of the European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) (2020) **Ensembl**. Disponível em: <https://www.ensembl.org/index.html>. Acesso em: 11 out. 2020.

Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, Byrd P, Taylor M, Easton DF. (2005) Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. **Journal of the National Cancer Institute** 97:813-22.

Thumser-Henner P, Nytko KJ, Rohrer Bley C (2020) Mutations of BRCA2 in canine mammary tumors and their targeting potential in clinical therapy. **BMC Veterinary Research** 16:30.

Timoteo ARS (2016) **Identificação e caracterização molecular de mutações germinativas em indivíduos com síndrome de câncer de mama e ovário hereditário**. 117 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – UFRN, Natal.

Toríbio JMML, Estrela Lima A et al. (2012) Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres** 59:427-433.

Torres de la Riva G, Hart BL, Farver TB, Oberbauer AM, Messam LL, Willits N, Hart LA (2013) Neutering dogs: effects on joint disorders and cancers in golden retrievers. **PLoS One** 8:e55937.

Varallo GR, Gelaleti GB, Maschio-Signorini LB, Moschetta MG, Lopes JR, De Nardi AB, Tinucci-Costa M, Rocha RM, De Campos Zuccari D (2019) Prognostic phenotypic classification for canine mammary tumors. **Oncology letters** 18:6545–6553.

Veldhoen N, Watterson J, Brash M, Milner J (1999) Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. **British Journal of Cancer** 81:409–415.

Venkitaraman AR (2014) Cancer Suppression by the Chromosome Custodians, BRCA1 and BRCA2 **Science** 343:1470.

Wakui S, Muto T, Yokoo K, Yokoo R, Takahashi H, Masaoka T, Hano H, Furusato M. (2001) Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. **Anticancer Research** 21:611-616.

Wu S, Zhou J, Zhang K, Chen H, Luo M, Lu Y, Sun Y, Chen Y (2020) Molecular Mechanisms of PALB2 Function and Its Role in Breast Cancer Management. **Frontiers in Oncology** 10:301.

Wysocker A, Tibbetts K, Fennell T (2013) Picard tools. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <http://broadinstitute.github.io/picard/>. Acesso: em Julho 2019.

Yoshikawa Y, Morimatsu M et al. (2005) Analysis of genetic variations in the exon 27 region of the canine BRCA2 locus. **Journal Veterinary Medicine Science** 67:1013-1017.

Yoshikawa Y, Morimatsu M, Ochiai K, Nagano M, Tomioka Y, Sasaki N, Hashizume K, Iwanaga T (2008) Novel variations and loss of heterozygosity of BRCA2 identified in a dog with mammary tumors. **American Journal Veterinary Research** 69:1323-8

Yoshikawa Y, Ochiai K et al. (2012) Effects of the Missense Mutations in Canine BRCA2 on BRC Repeat 3 Functions and Comparative Analyses between Canine and Human BRC Repeat 3. **PLoS One** 7:e45833.

Yuan Y, Yost SE et al. (2017) Genomic mutation-driven metastatic breast cancer therapy: a single center experience. **Oncotarget** 8:26414–26423.

Zink MC, Farhooody P, Elser SE, Ruffini LD, Gibbons TA, Rieger RH (2014) Evaluation of the risk and age of onset of cancer and behavioral disorders in gonadectomized Vizslas. **Journal American Veterinary Medicine Association** 244:309-319.

Considerações Finais

Um dos principais desafios deste estudo foi interpretar a grande quantidade de variantes de significado clínico desconhecido detectadas, especialmente do tipo *missense*. A maioria das variantes *missense* são classificadas como polimorfismos de nucleotídeo único e não se pode descartar por completo a possibilidade de serem patogênicas. Desta forma, para classificá-las vários pontos devem ser considerados, tais como: a frequência nos pacientes e no indivíduos controle, a ocorrência da variante possivelmente patogênica em um ou mais indivíduos testados, a segregação da variante com doença em familiares, as análises *in silico* e os estudos funcionais.

Embora existam algoritmos que auxiliam a prever o efeito de uma mutação *missense*, estes programas computacionais *in silico* permitem apenas avaliar a probabilidade da patogenicidade, baseados no grau de conservação, posição e natureza do aminoácido ou nucleotídeo alterado. No entanto, a maioria foram desenvolvidos para avaliar variantes de sequência em seres humanos, mas alguns permitem análises em animais e são amplamente utilizados para rastrear danos nos genes que podem estar associados ao risco da doença. Apesar dos programas de predição serem úteis, não podem substituir as análises de segregação, que são extremamente difíceis de se aplicar na medicina veterinária, e os estudos funcionais.

Dessa maneira, para tentar classificar as variantes *missense* identificadas neste estudo além de três modelos computacionais utilizados, também foi verificada a ocorrência das variantes nos diferentes grupos estudados correlacionando os dados obtidos com o descrito na literatura, mas muitas variantes foram identificadas somente em um animal e ainda não foram descritas. Para auxiliar na interpretação dos resultados os polimorfismos também foram visualmente inspecionados para determinar se o alelo encontrava-se em homozigose ou heterozigose. Além disso, todas variantes foram inspecionadas no bando de dado (Clinvar) para identificar mutações equivalentes em seres humanos.

No entanto, é importante mencionar que em mulheres portadoras de variantes de significado incerto, atualmente está determinado que sua presença não justifica a

adoção de intervenções para redução do risco. Uma vez que não há informações suficientes sobre seus efeitos e não tem como determinar se a mesma confere um risco maior para a portadora, mas é aconselhado que as mulheres realizem exames periodicamente, principalmente naquelas com histórico de câncer de mama na família, enquanto as informações dessas mutações são acompanhadas até que seja definida sua significância clínica.

Outro desafio deste estudo foi em relação à análise bioinformática, pois diferentemente do que ocorre em humanos, o genoma de referência utilizado para detectar variantes de sequência em cães é derivado somente de uma raça, sendo o genoma de um cão Boxer. Dessa maneira, foi observado que a sequência do genoma de cadelas com tumores mamários se difere em alguns pontos da sequência do genoma do boxer não afetado pela doença, demonstrando que essas variantes precisam ser investigadas para determinar se contribuem para o risco da doença nas cadelas da raça Boxer. Além disso, ficou demonstrado que controles de várias raças podem trazer benefícios para interpretação das variantes de sequência. Neste estudo, o genoma dos diferentes grupos estudados foi comparado ao genoma de referência (Boxer) e posteriormente as variantes identificadas no grupo com histórico de neoplasia mamária foram comparadas ao grupo controle, permitindo detectar variantes que podem estar associadas à doença.

De forma geral, apesar do número limitado de animais e dos desafios encontrados, a maioria dos resultados obtidos são semelhantes à literatura e contribuirão para pesquisas adicionais, mas são necessários estudos padronizados com quantidade maior de animais para que se possa estabelecer o perfil genético do câncer de mama em cadelas.

APÊNDICES

Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(De acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na resolução nº 714/2002)

Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Debora Ap. P. C. Zuccari – Coordenadora
Francine Moraes Gonçalves – Mestranda
Jéssica Rodrigues de Oliveira- Doutoranda

Para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no câncer de mama em cadelas, os pesquisadores estão desenvolvendo uma pesquisa científica a fim de elucidar questões a respeito da biologia tumoral e do prognóstico de cada subtipo, para assim oferecer novas possibilidades de tratamentos e melhora na qualidade de vida dos animais.

Nesse âmbito, estamos desenvolvendo o projeto de pesquisa intitulado "Marcadores Tumores em Biópsia Líquida – Estudo dos Mecanismos de Resistência por Bloqueio do Reparo de DNA". O objetivo geral desse trabalho é utilizar a biópsia líquida para identificar mutações responsáveis pela resistência tumoral, comprovando sua efetividade em cultura de organoides, bem como utilizar inibidores de PARP associados a diferentes quimioterápicos analisando sua relação com o SLFN11 e o AGTR-1, e as mutações originadas após a quimiorresistência em neoplasias mamárias caninas.

Assim, será coletada uma amostra de sangue do animal (3 a 5 ml) e fragmentos do tumor, bem como da região adjacente, no momento da cirurgia. Não haverá mudança na técnica cirúrgica e nem na conduta do veterinário para as coletas.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador sobre a utilização para estudo de amostra de sangue e fragmento tumoral a ser retirado durante o procedimento cirúrgico, já estipulado no tratamento, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo e manter contato com o grupo para informações adicionais posteriores a cirurgia. Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão, e comprometo-me a manter o pesquisador informado no caso de mudança de endereço ou telefone.

Nome do(a) proprietário(a):

Nome do animal:

Endereço residencial:

nº

Bairro:

Telefone:

Celular:

Data: 31/10/2018 Assinatura: Elaine Benari

Declaração de Responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de

Apêndice B


Laboratório de Investigação Molecular no Câncer
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
 Autarquia Estadual – Lei nº 8899 de 27/09/94
 (Reconhecida pelo Decreto Federal nº 74.179 de 14/06/74)



FICHA CLÍNICA Nº 3

IDENTIFICAÇÃO		
Nome da paciente: <u>Dolly</u>		
Raça: <u>Poodle</u>	Idade: <u>10 anos</u>	Peso: <u>4,2 Kg</u>
Registro LIMC: _____		
Veterinário Colaborador: <u>Alceni</u>		
Proprietário: <u>Rosita Serraglio</u>		Telefone: () _____
Data: <u>23 / 10 / 18</u>		

História Clínica:

1. () Recidiva () Metástase 1ª ocorrência

2. () Nullipara () Multipara

Relação Hormonal:

Castrada: () sim ☒ não Se sim → Quando: _____

Administração de anticoncepcionais: () sim ☒ não Qual: _____

Ciclo estral: () não sabe informar ☒ regular () irregular () não observa

Se regular → frequência: 5 meses duração: 2 semanas

Partos: () sim ☒ não Se sim → nº de gestações: _____

Falsa gravidez: () sim ☒ não

Se sim → frequência: _____ secreção: () sim () não tipo: _____

Dieta / Escore Corporal

Alimentação: ☒ ração () comida caseira () ambas

Escore corporal: () caquético ☒ magro () normal () sobrepeso () obeso

Apêndice 2B

Relação ao Tumor:

Tempo de evolução: 1 mês () até 6 meses () mais de 6 meses ☒

Número de nódulos: Único () Múltiplos ☒

Envolvimento de linfonodos regionais (macroscopia): _____

☒ N0: sem envolvimento evidente

N1: envolvimento unilateral N1a: móveis N1b: fixos

N2: envolvimento bilateral N2a: móveis N2b: fixos

Quanto à confirmação histológica de envolvimento de linfonodos: (-) ou (+)

Metástase à distância: onde? _____

☒ M0: sem metástases evidentes

M1: metástases à distância incluindo linfonodos não regionais

Mx: impossível avaliar existência de metástases

Características do tumor:

Ulceração: sim () não ☒

Vascularização: moderada () abundante ☒ *0 mais tumor na região inguinal

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES:

Possui diagnóstico citológico: () sim ☒ não Laudo:

Possui diagnóstico histopatológico: () sim ☒ não Laudo:

Histórico familiar acerca de neoplasias: ☒ não sabe informar

() ausente

() presente Quem: Tumor:

Apêndice 3B

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO:

Técnica Cirúrgica Empregada na Remoção da Neoplasia

Mastectomia regional ☒

Mastectomia unilateral ()

Mastectomia bilateral ()

Nodulesctomia ()

De qual cadeia foi removido o tumor?

☒ cadeia direita () cadeia esquerda

Data da colheita: 23/10/18

Mapeamento e Caracterizações das Lesões (mensurações e descrições dos tumores)

Cadeia Mamária Direita	Cadeia Mamária Esquerda
M1:	M1:
M2: <u>nódulo firme, não aderido, não ulcerado</u> <u>Ø 0,4cm</u>	M2:
M3:	M3:
M4:	M4:
M5: <u>nódulo firme, não aderido, não ulcerado</u> <u>Ø 2,0cm x 2,5cm</u>	M5: <u>nódulo firme, não aderido, não ulcerado</u> <u>Ø 0,36cm</u>

M1: torácica cranial; M2: torácica caudal; M3: abdominal cranial; M4: abdominal caudal; M5: inguinal

Dimensões do maior tumor (T): 2,0 x 2,5 x 2,0 (cm)

T0: ausência do tumor primário evidente ou ausência de recidiva

☒ T1: ≤ 3 cm

T2: entre 3 e 5 cm

T3: > 5 cm

Apêndice C

Tabela 1C. Dados Referentes aos animais excluídos dos grupos experimentais.

Nome	Grupo	Origem (Cidade)	Idade (anos)	Raça	Castração	Tamanho Tumoral	Diagnóstico
Cadela 21	<i>RD</i>	Jaboticabal	10	Beagle	Sim	T1N0M0	Mastocitoma*
Cadela 22	<i>RD</i>	Jaboticabal	12	Dachshund	Não	T3N0M0	Carcinoma Apócrino Ductal*
Cadela 23	<i>RD</i>	Jaboticabal	12	Poodle	Não	T1N0M0	Carcinoma Tubular Grau 1§
Cadela 24	<i>RD</i>	Jaboticabal	6	Beagle	Sim	T2N1M0	Carcinoma Micropapilar Grau 3 §
Cadela 25	<i>RD</i>	São José do Rio preto	16	SRD	Sim	T3N0M0	Carcinoma em Tumor misto †
Cadela 26	<i>MAST</i>	São José do Rio preto	13	Poodle	Sim	Não informado	Não informado¶
Cadela 27	<i>MAST</i>	São José do Rio preto	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado¶
Cadela 28	<i>CTR</i>	São José do Rio preto	13	Pinsher	Sim		**
Cadela 29	<i>CTR</i>	São José do Rio preto	2	SRD	Não		***

*Não diagnóstico de neoplasia mamária, §Quantidade insuficiente de DNA na amostra (*Too Low*), ¶ Ausência de dados, † grande quantidade de variantes detectadas, **DNA não capturado, *** Idade inferior à 4 anos

Apêndice D

Tabela. 1D – Dados referentes as características clínicas e tumorais das cadelas recém diagnosticadas com neoplasia mamária (RD)

Nome	Anticoncepcional	Pseudociese	Partos	Mapeamento das Lesões	Fragmento sequenciado	Diagnóstico
Cadela 1	Não	Não	Não	Direita: M2, M3, M4 e M5	M5D	M3 e M5: Carcinoma em tumor misto, grau II
Cadela 2	Não	Não	Não	Esquerda: M5	M5E	Osteossarcoma mamário
Cadela 3	Não	Não	Não	Direita: M2 Esquerda: M3 e M5	M5E	M3: Carcinoma tubular**; M5: Carcinoma em tumor misto, grau II
Cadela 4	Não	Não	Não	Esquerda: M4	M4E	Tumor misto benigno
Cadela 5	Não	Não	Não	Direita: M2 e M5 Esquerda: M5	M5E	Carcinoma em tumor misto, grau I
Cadela 6	Não	Sim	Sim	Direita: M1, M2, M3 e M4 Esquerda: M1, M2, M3, M4 e M5	M4E	M4: Condrossarcoma mamário M3: Carcinoma tubular grau II**
Cadela 7	Não	Não	Não	Esquerda: M1, M2, M3, M4 e M5 (Bilateral)	M5E	M5: Carcinoma em tumor misto, grau I
Cadela 8	Não	Não	Não	Direita: M5 (unilateral)	M5D	Carcinoma tubular, grau I
Cadela 9	Não	Não	Não	M5	M5	Carcinoma em tumor misto, grau I
Cadela 10	Sim	Não	Não	M5	M5	Carcinoma Indiferenciado (Autólise)

M: Glândula mamária acometida, **

Apêndice E

Tabela 1F Painel de Genes associados ao câncer de Mama submetidos ao sequenciamento de nova geração.

GENES		
AKT1	ERBB4	NDC80
ALOX12	ESR1	NF1
ANLN	EXO1	NRAS
ATM**	FGFR4	NUF2
AURKA	FOXA1	ORC6
BAG1	FOXC2	PALB2**
BARD1	GATA3	PGR
BCL2	GPR160	PIK3CA
BIRC5	GRB7	PMS2
BLVRA	IGF2R	PTEN
BMP6	KIF2C	RAD51
BRAF	KRT14	RAD51C
BRCA1*	KRT17	RAD51D
BRCA2*	KRT5	RRM2
BRIP1	MAP3K1	SFRP1
CCNE1	MAPT	SLC39A6
CDC20	MDM2	STK11*
CDC6	MELK	TGFBR3
CDH1*	MKI67	TMEM45B
CDH3	MLH1	TP53*
CDK2	MLPH	TYMS
CEP55	MMP11	UBE2C
CHEK2	MSH2	UBE2T
CXXC5	MSH6	USH2A
DDR1	MTOR	
DLG2	MYBL2	
EGFR	MYC	
ERBB2		

Genes de alta e moderada* penetrância**, avaliados neste estudo.

Apêndice F

Tabela 1E. Quantificação do DNA no equipamento *QuiBT* de amostras plasmáticas e tumorais

CADELA	[] DNA plasma (ng/ul)	[] DNA Tumoral (ng/ul)
CADELA 1	0,126	43,2
CADELA 2	0,216	0,057
CADELA 3	0,295	32,6
CADELA 4	0,313	41,7
CADELA 5	0,084	41,7
CADELA 6	0,512	17,8
CADELA 7	0,673	18,2
CADELA 8	0,419	8,54
CADELA 9	0,621	5,92
CADELA 10	0,317	38,4
CADELA 11	0,151	-
CADELA 12	0,26	-
CADELA 13	0,356	-
CADELA 14	0,193	-
CADELA 15	0,333	-
CADELA 16	0,304	-
CADELA 17	0,644	-
CADELA 18	0,251	-
CADELA 19	0,094	-
CADELA 20	0,137	-

[] Concentração

Apêndice G

Tabela 1G. Dados referentes as variantes *missense* identificadas no plasma e fragmento tumoral de cadelas recém diagnosticadas com neoplasia mamária (RD)

Animal	Idade	Raça	Castração	Estágio	Diagnóstico Histopatológico	GENE	Variante Plasma	Variante Fragmento	Classificação
CADELA 1	10	SRD	sim	T2N0M0	Ca em tumor misto grau 2	BRCA2	p.Ala728Val	p.Ala728Val	VPB
CADELA 1						BRCA2	p.Asn741Ser	p.Asn741Ser	VPB
CADELA 1						BRCA2	p.Cys386Trp	p.Cys386Trp	VPB
CADELA 1						BRCA2	p.Lys1435Arg	p.Lys1435Arg	VPB
CADELA 1						BRCA2	p.Met3332 delinslleLys	—	VPB
CADELA 1						BRCA2	p.Pro715Gln	p.Pro715Gln	VPB
CADELA 1						BRCA2	—	p.Lys801Gln	CP
CADELA 1						BRCA2	—	p.His143Arg	VPB
CADELA 1						STK11	p.Pro37Ser	p.Pro37Ser	VPB
CADELA 1						PALB2	p.Gly396Glu	p.Gly396Glu	VPB
CADELA 1						ATM	p.Met1758Thr	p.Met1758Thr	VPB
CADELA 1						ATM	p.His1144Leu	p.His1144Leu	VPB
CADELA 2	15	Pequinês	sim	T2N0M1	Osteossarcoma Mamário	BRCA2	p.Ala728Val	p.Ala728Val	VPB
CADELA 2						BRCA2	p.Asn741Ser	p.Asn741Ser	VPB
CADELA 2						BRCA2	p.Cys2229Phe	p.Cys2229Phe	VPB
CADELA 2						BRCA2	p.Cys386Trp	p.Cys386Trp	VPB
CADELA 2						BRCA2	p.Lys1435Arg	p.Lys1435Arg	VPB
CADELA 2						BRCA2	p.Pro715Gln	p.Pro715Gln	VPB
CADELA 2						BRCA1	—	p.Pro525Ser	CP
CADELA 2						TP53	p.Arg147His	—	CP
CADELA 2						PALB2	—	p.Gly396Glu	VPB
CADELA 2						ATM	p.Met1758Thr	p.Met1758Thr	VPB
CADELA 2						ATM	—	p.His1144Leu	VPB

CADELA 3	7	SRD	não	T2N0M0	Ca em tumor misto e tubular grau 2	BRCA2	p.Ala728Val	p.Ala728Val	VPB
CADELA 3						BRCA2	p.Asn741Ser	p.Asn741Ser	VPB
CADELA 3						BRCA2	p.Cys386Trp	p.Cys386Trp	VPB
CADELA 3						BRCA2	p.Lys1435Arg	p.Lys1435Arg	VPB
CADELA 3						BRCA2	p.Met3332delinsIleLys	—	VPB
CADELA 3						BRCA2	p.Pro715Gln	p.Pro715Gln	VPB
CADELA 3						BRCA2	—	p.Leu2307del	VPP
CADELA 3						BRCA2	—	p.Lys801Gln	CP
CADELA 3						STK11	p.Phe98Ser	p.Phe98Ser	VPB
CADELA 3						STK11	p.Met96Val	p.Met96Val	VPB
CADELA 3						PALB2	p.Asp385Asn	p.Asp385Asn	VPB
CADELA 3						PALB2	p.Gly396Glu	p.Gly396Glu	VPB
CADELA 3						ATM	p.Met1758Thr	p.Met1758Thr	VPB
CADELA 3						ATM	—	p.His1144Leu	VPB
CADELA 4	10	SRD	não	T1N0M0	Tumor misto Benigno	BRCA2	—	p.Lys1435Arg	VPB
CADELA 4						BRCA2	—	p.Asn741Ser	VPB
CADELA 4						BRCA2	—	p.Ala728Val	VPB
CADELA 4						BRCA2	—	p.Pro715Gln	VPB
CADELA 4						BRCA2	—	p.Cys386Trp	VPB
CADELA 4						BRCA2	—	p.His143Arg	VPB
CADELA 4						STK11	—	p.Pro37Ser	VPB
CADELA 4						PALB2	—	p.Asp385Asn	VPB
CADELA 4						PALB2	—	p.Gly396Glu	VPB
CADELA 5	10	Poodle	não	T1N0M0	Ca em tumor misto Grau 1	BRCA2	p.Cys386Trp	p.Cys386Trp	VPB
CADELA 5						BRCA2	p.Lys1435Arg	p.Lys1435Arg	VPB
CADELA 5						BRCA2	—	p.Asn741Ser	VPB
CADELA 5						BRCA2	—	p.Ala728Val	VPB
CADELA 5						BRCA2	—	p.Pro715Gln	VPB
CADELA 5						BRCA2	—	p.His143Arg	VPB

CADELA 5						STK11	p.Pro37Ser	p.Pro37Ser	VPB
CADELA 5						PALB2	—	p.Asp385Asn	VPB
CADELA 5						PALB2	—	p.Gly396Glu	VPB
CADELA 5						ATM	p.Met1758Thr	p.Met1758Thr	VPB
CADELA 5						ATM	—	p.His1144Leu	VPB
CADELA 6	10	Basset	não	T3N1M0	Condrossarcoma/ Ca Tubular Grau 2	BRCA2	p.Ala728Val	p.Ala728Val	VPB
CADELA 6						BRCA2	p.Asn741Ser	p.Asn741Ser	VPB
CADELA 6						BRCA2	p.Cys386Trp	p.Cys386Trp	VPB
CADELA 6						BRCA2	p.Lys1435Arg	p.Lys1435Arg	VPB
CADELA 6						BRCA2	p.Pro715Gln	p.Pro715Gln	VPB
CADELA 6						BRCA2	—	p.His143Arg	VPB
CADELA 6						STK11	p.Pro37Ser	p.Pro37Ser	VPB
CADELA 6						PALB2	p.Asp385Asn	p.Asp385Asn	VPB
CADELA 6						PALB2	p.Gly396Glu	p.Gly396Glu	VPB
CADELA 6						ATM	p.Met1758Thr	p.Met1758Thr	VPB
CADELA 6						ATM	p.His1144Leu	p.His1144Leu	VPB
CADELA 7	16	SRD	sim	T2N0M0	Ca em tumor misto Grau1	BRCA2	p.Ala728Val	p.Ala728Val	VPB
CADELA 7						BRCA2	p.Asn741Ser	p.Asn741Ser	VPB
CADELA 7						BRCA2	p.Cys386Trp	p.Cys386Trp	VPB
CADELA 7						BRCA2	p.Lys801Gln	p.Lys801Gln	CP
CADELA 7						BRCA2	p.Pro715Gln	p.Pro715Gln	VPB
CADELA 7						PALB2	p.Asp385Asn	p.Asp385Asn	VPB
CADELA 7						PALB2	p.Gly396Glu	p.Gly396Glu	VPB
CADELA 7						ATM	p.Met1758Thr	p.Met1758Thr	VPB
CADELA 8	13	YORK	sim	T1N0M0	Ca tubular Grau 1	BRCA2	p.Ala728Val	p.Ala728Val	VPB
CADELA 8						BRCA2	p.Asn741Ser	p.Asn741Ser	VPB
CADELA 8						BRCA2	p.Cys386Trp	p.Cys386Trp	VPB
CADELA 8						BRCA2	p.His143Arg	p.His143Arg	VPB
CADELA 8						BRCA2	p.Lys1435Arg	p.Lys1435Arg	VPB

CADELA 8						BRCA2	p.Pro715Gln	p.Pro715Gln	VPB
CADELA 8						PALB2	p.Asp385Asn	p.Asp385Asn	VPB
CADELA 8						PALB2	p.Gly396Glu	p.Gly396Glu	VPB
CADELA 8						PALB2	p.Ala949Val	p.Ala949Val	VPP
CADELA 8						ATM	p.Met1758Thr	p.Met1758Thr	VPB
CADELA 9	13	Pastor Belga Branco	sim	T2N0M0	Ca em tumor misto Grau 1	BRCA2	p.Ala728Val	—	VPB
CADELA 9						BRCA2	p.Asn741Ser	—	VPB
CADELA 9						BRCA2	p.Cys386Trp	—	VPB
CADELA 9						BRCA2	p.Ile2614Thr	—	CP
CADELA 9						BRCA2	p.Ile2614Val	—	CP
CADELA 9						BRCA2	p.Pro715Gln	—	VPB
CADELA 9						BRCA2	p.Thr1425Pro	—	VPP
CADELA 9						BRCA1	p.His293Asp	—	VPB
CADELA 9						STK11	p.Pro37Ser	p.Pro37Ser	VPB
CADELA 9						PALB2	p.Asp385Asn	—	VPB
CADELA 9						PALB2	p.Gly396Glu	—	VPB
CADELA 9						ATM	p.Met1758Thr	—	VPB
CADELA 9						ATM	p.His1144Leu	—	VPB
CADELA 10	10	SRD	não	T2N1M1	Ca indiferenciado (autólise)	BRCA2	p.Ala728Val	—	VPB
CADELA 10						BRCA2	p.Asn741Ser	—	VPB
CADELA 10						BRCA2	p.Cys386Trp	—	VPB
CADELA 10						BRCA2	p.Pro715Gln	—	VPB
CADELA 10						ATM	p.Met1758Thr	—	VPB
CADELA 10						ATM	p.His1144Leu	—	VPB

