

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

**Comparação da Avaliação da Mutação V595E do Gene *BRAF* na Urina
de Cães com Carcinoma Urotelial de Bexiga pelos Métodos de PCR em
Tempo Real e Digital**

TATIANA ADELINO SANTOS

Botucatu – SP

Julho 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CAMPUS

DE BOTUCATU

**Comparação da Avaliação da Mutação V595E do Gene *BRAF* na Urina
de Cães com Carcinoma Urotelial de Bexiga pelos Métodos de PCR em
Tempo Real e Digital**

TATIANA ADELINO SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Co-Orientador(a) Dra. Renée Laufer Amorim

Botucatu – SP

Julho 2024

S237c Santos, Tatiana Adelino
Comparação da avaliação da mutação V595E do gene BRAF na urina de cães com carcinoma urotelial de bexiga pelos métodos de pcr em tempo real e digital / Tatiana Adelino Santos. -- Botucatu, 2024
40 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves
Coorientadora: Renée Laufer Amorim

1. Carcinoma urotelial de bexiga. 2. Cães. 3. BRAF V595E. 4. Qpcr. 5. PCR digital. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

TATIANA ADELINO SANTOS

**Comparação da Avaliação da Mutação V595E do Gene *BRAF* na Urina
de Cães com Carcinoma Urotelial de Bexiga pelos Métodos de PCR em
Tempo Real e Digital**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

Comissão Examinadora: Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Titulares: Dr. Denner Santos dos Anjos

Titulares: Priscila Emiko Kobayashi

Botucatu , SP 30 de julho de 2024

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Geraldo** e **Rosane**, que me criaram com muito amor e carinho, e que sempre me apoiaram em meus estudos e me instigaram a buscar o conhecimento. E aos meus avós Geraldo e Claudice e Manoel e Helena que sempre me apoiaram em todas as escolhas e me deram muito amor e carinho .

Ao meu noivo **Leonardo**, que ao longo desses anos sempre me apoiou em milhas escolhas, me deu forças para continuar seguindo em frente na busca de meus objetivos, sempre com muito amor, carinho e sabedoria. Obrigada por sempre confiar em mim!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador **Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves**, por me receber com grande entusiasmo como sua aluna, por toda a paciência, apoio e assistência.

À **Dra. Renée Laufer Amorin**, por toda assistência, pelas oportunidades oferecidas e por toda a paciência .

Aos colaboradores desse trabalho: **Dr. Márcio de Carvalho, Dr. Leonardo Nazário de Moraes, Ms. Thayná Silva Oliveira** pelo suporte fundamental e dedicação aos resultados.

À **Thayná Silva Oliveira** e ao Laboratório Clínico de Pequenos pelas amostras.

À todos os funcionários da secretaria da pós-graduação do Programa de Biotecnologia animal por toda a paciência e ajuda constante.

À todos os funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu.

E um agradecimento especial a equipe do Laboratório de Biologia Aplicada, em pela gentileza de ceder o equipamento de PCR digital (sob o Processo Fapesp nº 2022/02261-5) e permitirem que fosse realizado o experimento. Também agradeço por todo o aprendizado e carinho que me deram.

E também um agradecimento especial a todos os meus amigos que acompanharam de perto as etapas desse trabalho.

RESUMO

O câncer de bexiga é uma neoplasia de bexiga importante em homens e animais, devido à sua alta incidência. O carcinoma urotelial de bexiga (CUB) é considerado a neoplasia do trato geniturinário mais frequente, também chamado de carcinoma de células transicionais, o qual é encontrado frequentemente no trígono da bexiga e normalmente infiltra para a uretra e ureter. Atualmente o exame mais confiável para o diagnóstico de carcinoma urotelial de bexiga é a histopatologia, entretanto, é um teste pouco utilizado pela dificuldade de acesso à bexiga para biópsia. Por outro lado, cerca de 80% dos cães que têm CUB possuem a mutação BRAF V595E e um teste genético por meio de amostra de urina têm sido proposto para diagnóstico. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar e comparar a sensibilidade e especificidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (qPCR) e digital (ddPCR) para detecção da mutação V595E do gene *BRAF* em amostras de urina de cães com CUB. Foram incluídos 43 animais, sendo 15 cães com CUB confirmado por histopatologia, 10 cães sem alterações na bexiga (normais), 17 cães com cistite complicada e um cão com pólipos, todos escolhidos aleatoriamente independente de raça, sexo e idade. Todos os cães foram acompanhados por um período de pelo menos quatro anos. Todos os animais que vieram a óbito foram submetidos à necrópsia e dos pacientes com cistite complicada (N=17), oito apresentavam uma afecção concomitante. Dos pacientes sem alterações na bexiga, nenhuma paciente apresentou mutação em nenhuma das técnicas. Dos pacientes com CUB, 13,3% (2/15) apresentaram mutação na PCR convencional, 33,3% apresentaram mutação em um alelo (WT/MUT) (5/15) e 6,6% mutação nos dois alelos (MUT/MUT) (1/15) na qPCR, e por fim, na ddPCR, 80% dos casos (12/15) apresentaram mutação. Um dado alarmante, foi a taxa de mutação em pacientes com cistite complicada (N=17). Nenhum dos pacientes com cistite complicada tiveram mutação de BRAF no qPCR. No entanto, 70% dos pacientes com cistite complicada apresentaram mutação de BRAF na ddPCR. A sensibilidade do qPCR, ddPCR e sequenciamento de Sanger no diagnóstico do CUB foi de 46,67%, 75% e 46,67%, respectivamente. Foi possível concluir que o ddPCR é o teste mais sensível para a detecção da mutação de BRAF e que outras afecções crônicas não neoplásicas do sistema urinário podem ser positivos para a mutação.

Palavras-chave: Carcinoma Urotelial de Bexiga, Cães, BRAF V595E, Qpcr, PCR Digital

Sumário

INTRODUÇÃO	10
CARCINOMA UTOTELIAL	13
ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA.....	15
DIAGNÓSTICO.....	16
OBJETIVO GERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
Capítulo 2	22
Métodos	25
Grupos, Coleta de Urina e Armazenamento.....	25
Extração de DNA	26
Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real Quantitativa- qPCR	27
ddPCR- Reação de PCR Digital	29
Sequenciamento de Sanger	29
RESULTADOS	30
Discussão Preliminar	39
Conclusão	41

INTRODUÇÃO

O câncer pode ser classificado como uma sequência de injúrias celulares que ocasionam acúmulo de mutações genéticas e alterações nos mecanismos epigenéticos reguladores que conduzem a evolução de uma célula normal para uma célula cancerígena (PINELLO et al., 2022). Em diferentes modelos tumorais, a importância de cada fator exógeno no desenvolvimento do câncer pode mudar. Por exemplo, para as neoplasias mamárias em cadelas, os fatores hormonais apresentam grande importância, já para as neoplasias de bexiga, o uso de inseticidas, pesticidas e poluente ambientais são mais importantes.

O câncer de bexiga é uma neoplasia de bexiga importante em homens e animais. Segundo os dados do INCA, são esperados entre os anos de 2023 a 2025, 11370 casos novos por ano de câncer de bexiga com expectativa de 7870 casos para os homens e 3500 casos para as mulheres (INCA, 2023). Nos humanos, o câncer de bexiga ocupa a 12ª posição dos cânceres mais frequentes, quando considerado todos que afetam o ser humano, exceto os tumores de pele não melanoma (INCA, 2023). A predisposição para propensão dessa malignidade são indivíduos do sexo masculino bem como exposições a produtos químicos e/ou tabagismo (KNAPP, 2020).

Nos humanos, esse câncer é reportado três vezes mais em homens do que em mulheres, tendo uma taxa de maior incidência em pessoas negras e caucasianas. Nos países ocidentais e asiáticos, há uma maior incidência dessa neoplasia. Nos países desenvolvidos, 90% dos cânceres que acometem a bexiga são os carcinomas uroteliais (OLIVEIRA, 2014).

A causa exata do câncer de bexiga em cães ainda não foi estabelecida, no entanto, parece haver uma ligação entre uma predisposição genética e a exposição crônica a produtos químicos comuns para cuidar de jardins, como pesticidas e herbicidas. Em relação aos fatores genéticos, cães da raça Scottish terrier apresentam uma maior predisposição genética para desenvolvimento do carcinoma de bexiga e a exposição passiva ao cigarro é considerado um

fator de risco elevado (KNAPP et al., 2023).

Embora humanos e cães apresentem um comportamento semelhante de risco de desenvolverem câncer ao longo da vida, os cães apresentam uma incidência de risco que pode chegar a ser dez vezes mais do que os humanos. Como resultado, seu risco ao longo da vida, é afetado pela expectativa de vida consideravelmente mais curta, tornando assim, o câncer, a principal causa de morte entre os cães (CHIBUK et al, 2021). Um grande desafio das neoplasias de bexiga, incluindo o carcinoma urotelial, é o acesso à bexiga para realização de biópsia. A bexiga apresenta localização intra-abdominal e quando acometida pelo carcinoma urotelial, existe o risco de transplantação das células tumorais. Com isso, métodos de diagnósticos não invasivos são preferíveis pelos veterinários clínicos e cirurgiões em geral. Dentre esses métodos, destaca-se a citologia obtida por lavado vesical e a investigação da mutação de *BRAF* (KUCHLER et al., 2023).

O teste *BRAF* realizado como teste comercial, denominado CADET BRAF[®], trata-se de um teste realizado a partir da técnica de PCR digital (ddPCR). A técnica de ddPCR é extremamente sensível, de alto custo e foi recentemente introduzida no Brasil. Poucos centros têm disponibilidade do aparelho, e devido a sua alta especificidade, chega a identificar a mutação de *BRAF* em 89 % dos carcinomas uroteliais (KUCHLER et al., 2023). No entanto, esse dado é obtido a partir de amostra de tecido com confirmação histológica de carcinoma urotelial. Ou seja, a sensibilidade baseada na obtenção das amostras de urina ainda é incerta. Recentemente, DHAWAN et al. (2022) avaliaram como objetivo secundário de seu trabalho o valor preditivo positivo (VPP) da técnica de *BRAF* a partir de amostras de urina, e o VPP da mutação em *BRAF* em cães com diferentes afeções foi de 44%. Ou seja, de todas as amostras positivas, em 54%, apesar de serem positivas, o cão não tinha carcinoma urotelial.

Na literatura, todos os dados são sobre a análise da mutação em *BRAF* que se baseia na técnica de ddPCR. No entanto, no Brasil, temos um cenário mais alarmante. Os laboratórios

que oferecem o teste, usam em sua metodologia, a técnica de PCR em tempo real (qPCR). Isso ocorre devido à dificuldade de utilizar técnicas mais sensíveis como o ddPCR (pelo alto custo). A detecção da mutação pela técnica de qPCR não é previamente indicada, e é totalmente incerto a sensibilidade dessa técnica na detecção do carcinoma urotelial em cães.

Devido à importância do câncer de bexiga em cães, esse estudo teve por objetivo investigar a sensibilidade e especificidade dos testes de PCR em tempo real (qPCR) e o PCR digital (ddPCR) no diagnóstico do carcinoma urotelial de bexiga em cães.

REVISÃO DE LITERATURA

Carcinoma Urotelial

O tumor mais comum do trato urinário é o carcinoma urotelial de bexiga (CUB), também chamado de carcinoma de células transicionais (CCT) (YAMASAKI, et al, 2022), o qual é encontrado frequentemente no trígono da bexiga (KUCHLER et al, 2023) e normalmente infiltra para a uretra e ureter (AHMED, B. H., et al. 2023). Esse tumor é originário de células do epitélio urotelial, o qual apresenta comportamento invasivo na lâmina própria e pode apresentar metástase à distância (YAMASAKI et al, 2022).

O carcinoma urotelial canino apresenta similaridade com o carcinoma urotelial humano, em termos de apresentação patológica que incluem: características celulares, heterogeneidade tumoral, e classificados em subtipos luminal e basal (PARKER et. al, 2020). São infiltrados localizados, caracterizados por cânceres que podem se estender por toda a bexiga, desde a submucosa, até as camadas musculares (VITTI et. al, 2020). Entretanto, nos humanos, esse câncer pode surgir em qualquer parte da bexiga (AHMED et al. 2023).

Os carcinomas uroteliais de bexiga tem diferentes formas, tamanhos e distribuições, porém, essas características podem mudar ao longo do curso da doença, em particular, em resposta ao tratamento (LEFFLER et. al, 2018). Histologicamente os cânceres de bexiga podem ser classificados como carcinoma urotelial, podendo ser classificado como invasivo (infiltrado nos músculos) ou não invasivos (superficiais) papilares (Figura 1), que são projeções em forma de dedos indo em direção ao centro da bexiga ou na superfície interna; ou podem ser classificados como planas. Alguns tipos menos comuns que podem ser encontrados são os adenocarcinomas, carcinomas de pequenas células, carcinomas de células escamosas, e também os sarcomas rabdiomiossarcomas e os sarcomas de tecidos moles (TSAMOURI et, al. 2021).

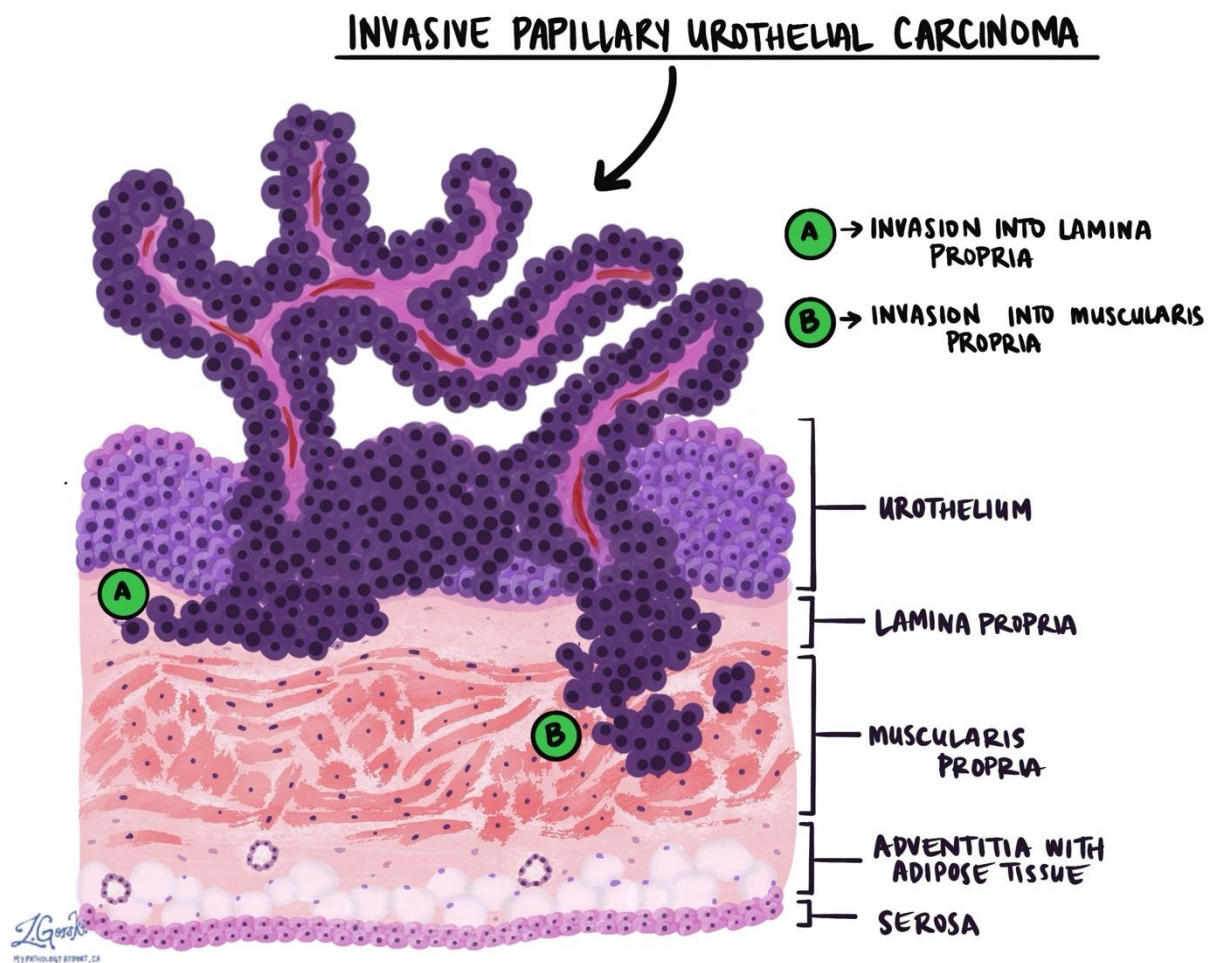


Figura 1. Representação esquemática da progressão das lesões epiteliais de bexiga, evoluindo de lesões papilares a não papilares, para padrões infiltrativos, incluindo, infiltração da camada muscular. Figura representada por um carcinoma urotelial papilar invasor. A) invasão na lâmina própria. B) Invasão na musculatura própria. Urotélio, lâmina própria, muscular própria, adventícia com tecido adiposo e serosa.

Fonte: <https://www.mypathologyreport.ca/>

O carcinoma urotelial invasivo geralmente acaba sendo mais agressivo e letal do que o não invasivo. Esse último, apresenta relatos de uma grande recorrência tumoral após o tratamento inicial, acometendo cerca de 70% dos pacientes humanos e os mesmos tendem a uma evolução de 10 a 20% do tumor apresentar um comportamento mais agressivo e de invasão

muscular, e assim, conseqüentemente, há uma necessidade maior de tratamentos mais longos, resistência a quimioterapia e maior monitoramento ao longo da vida, fazendo com que esse câncer se torne uma das doenças mais malignas ao longo da vida (SEGATTO, et al. 2021)

Etiologia e Epidemiologia

O carcinoma urotelial representa cerca de 2% de todos os cânceres diagnosticados em cães (CRONISE et al. 2022). A etiologia dessa doença é tida como multifatorial, com fatores de risco desencadeadores dessa doença, como: sexo (fêmeas), raça (Scottish Terrier, Shetland Sheepdog, Beagle e West Highland White Terrier), obesidade, inseticidas para controle de pulga e/ou carrapatos e herbicidas (RASTEIRO et al., 2022).

Já nos humanos, os homens são mais predispostos a desenvolverem essa doença do que as mulheres. A causa para essa diferença de sexo entre as espécies, ainda é desconhecida, embora, acredita-se que a exposição ocupacional e o tabagismo, sejam responsáveis por grande parte do desenvolvimento de cânceres de bexiga em homens (MUTSAERS, 2003). Assim como em humanos, esse câncer acomete cães com idade mais avançada, entre 9 e 11 anos, entretanto, uma minoria dos cães acaba desenvolvendo entre 4 e 6 anos de idade (KNAPP, 2020).

Acredita-se que parte desta agressividade esteja relacionada com o atraso no diagnóstico médico e/ou atraso na intervenção terapêutica (MOCHIZUKI, 2015), visto que o câncer de bexiga se apresenta com sinais clínicos inespecíficos, como: hematúria, polaciúria e estrangúria, que se assemelham a infecções do trato urinário, cistite e/ou pólipos que são facilmente tratáveis. Em consequência, no último estágio do carcinoma urotelial, o paciente pode perder a capacidade de urinar, devido ao aumento da bexiga em decorrência da massa (THOMAS et al, 2023).

Diagnóstico

Quando diagnosticados, a grande maioria dos tumores acabaram invadindo o músculo detrusor e a sobrevida normalmente consiste em um período inferior a 12 meses com as opções de tratamento atualmente existentes (THOMAS et. al, 2023). Atualmente o exame mais confiável para o diagnóstico de carcinoma urotelial de bexiga é a histopatologia, entretanto, este exame é invasivo. Na citologia, a identificação de células epiteliais anormais pela coleta de urina também pode ajudar no diagnóstico, entretanto, somente com a citologia não é possível diagnosticar o carcinoma urotelial canino, visto que as células normais, podem se tornar morfolologicamente anormais (semelhantes às células tumorais) em função do contato prolongado com a urina ou inflamação (KAJI et. al, 2022).

Um método não invasivo e alternativo é a cistoscopia, o qual apresenta muitas vantagens, dentre elas destacam-se: visualização direta bexiga, uretra e óstios ureterais. Essa técnica acaba sendo superior as outras técnicas devido a ampliação fornecida pela excelente visualização, falta de distorção e um campo visual claro. As principais desvantagens dessa técnica são: 1: instrumentação rígida para obtenção de biópsias de remoção cálculos, pólipos e tumores e elevado custo, 2: diferentes portes das diferentes raças de cães, com instrumental sem diâmetro apropriados para os diferentes calibres da uretra e passagem no osso peniano e 3: obtenção de amostras pouco representativas, sem possibilidade de avaliação das camadas da bexiga (MCCARTHY, 2021).

Recentemente a mutação de *BRAF* foi proposta como diagnóstica para o carcinoma urotelial, a partir de amostras de urina. O teste *BRAF* se tornou muito popular no Brasil à uma velocidade muito rápida, e pode ser considerado um dos testes mais realizados atualmente no país esse diagnóstico do CUB. No entanto, sua sensibilidade e especificidade são incertas (CONRAD et

al, 2022).

Mutação *BRAF V595E*

A mutação do gene *BRAF V595E* canino é uma mutação homóloga ao *BRAF V600E* humano que consiste em uma transversão de T para A no éxon 15, o que resulta na substituição do aminoácido vanila, para o ácido glutâmico (CONRAD et al, 2022), dentro da região ativadora da proteína quinase serina/treonina *BRAF* no códon 595 intitulado de V595E (THOMAS et. al, 2023). Essa mutação é uma consequência da ativação da via MAP quinase, a qual conduz células aberrantes, crescimento e proliferação (VARVIL et, al. 2022). Essa mutação somática é encontrada nos *Canis Lupus Familiaris* (AHMED, B. H., et al. 2023) especificamente em carcinoma prostático e urotelial canino (CONRAD et al, 2022).

Cerca de 80% dos cães que tem CCT possuem a mutação *BRAF V595E* (TAGAWA et al. 2020). Esse dado é obtido a partir de extração de DNA de amostras de CUB confirmados por histologia (não de amostras obtidas de urina de cães) (DECKER et al., 2015). A partir dos estudos em tecido identificado alta taxa de mutação, um teste de PCR foi desenvolvido por pesquisadores japoneses para diagnóstico em meio líquido (amostra de urina – biópsia líquida) (MOCHIZUKI et al. 2015). Esses autores adaptaram o teste de ddPCR para detecção dessa mutação, que permite detectar a mutação do gene *BRAF* utilizando apenas alguns mililitros de urina do cão. Uma vantagem importante deste teste é o fato de não ser um procedimento invasivo (DOBSON, 2019). No entanto, por se tratar de uma mutação de um único nucleotídeo (SNP), a técnica de ddPCR é considerada a mais fidedigna para esse diagnóstico (MOCHIZUKI et al., 2015).

O tutor pode coletar em casa a amostra de urina e posteriormente encaminhar a mesma para análise laboratorial. Após a amostra ser encaminhada ao laboratório para a análise, o DNA

é isolado das células presentes na urina e adicionado marcadores fluorescentes que irão determinar a existência ou não da mutação genética. Ao final do ensaio, se houver a coloração verde o teste é negativo, entretanto se a cor apresentada, for azul, o animal é positivo para a mutação *BRAF V595E* (CADETSM *BRAF*, 2018).

Para a detecção da mutação *BRAF V595E* pode ser colhido amostra de urinado paciente com suspeita de neoplasia e/ou cistite (CADETSM *BRAF*, 2018) e feito um teste de PCR digital, o qual a partir de uma única fita simples de DNA gerarão várias cópias da mesma, a qual passará por três ciclos para a análise da urina (THOMAS et. al, 2023). Primeiro ocorrerá a desnaturação da fita simples de DNA, em seguida é adicionado um primer pelo qual o mesmo se anela a fita simples do DNA alvo e posteriormente é codificado a sequência de aminoácidos desse DNA. A última etapa ocorre a extensão dessa fita simples (AHRBER et al., 2016).

Visto o prognóstico desfavorável da doença e a necessidade de criar /ou aperfeiçoar testes diagnósticos eficazes, minimamente ou não invasivos, é justificada a realização dessa pesquisa para uma melhor compreensão destas tecnologias e promoção de adaptadores. Em cães com a mutação *BRAF V595E* normalmente são realizados testes de PCR, sendo utilizadas como marcador de diagnóstico principal para detectar carcinomas do trato urinário ou da próstata. (KUCHLER, L. et al, 2023)

A técnica de PCR atualmente vem sendo muito utilizadas na prática clínica. Nas aplicações para as técnicas de pesquisas envolvendo cânceres, pode-se citar: detecções de mutações, detecções de genes relacionados a tumores, como genes supressores de tumor, genes metastáticos ou mesmo genes supressores metastáticos e vírus relacionados a tumores, bem como, genes resistentes a medicamentos antitumorais (WANG M. et al, 2023).

OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar a sensibilidade e especificidade da qPCR e da ddPCR para detecção da mutação V595E do gene *BRAF* em amostras de urina de cães com Carcinoma Urotelial de Bexiga.

Objetivos Específicos

- Verificar a ocorrência da mutação V595E no Gene *BRAF* em cães com CUB, e no grupo controle (animais com cistite e sem lesões);
- Mensurar a sensibilidade e especificidade diagnóstica da qPCR, ddPCR e sequenciamento de Sanger para casos de CUB.

REFERÊNCIAS

- 1- Pinello, Katia, et al. "Vet-OncoNet: Malignancy Analysis of Neoplasms in Dogs and Cats." *Veterinary Sciences* (2022).
- 2- Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022.
- 3- Knapp, D.W, et al. Naturally-Occurring Invasive Urothelial Carcinoma in Dogs, a Unique Model to Drive Advances in Managing Muscle Invasive Bladder Cancer in Humans. *Front. Oncol* (2020).
- 4- Oliveira, P. A., Regina A., and Carmen V. A. "Animal models of urinary bladder cancer and their application to novel drug discovery." *Expert opinion on drug discovery* (2014).
- 5- Chibuk, J., et al. "Horizons in veterinary precision oncology: fundamentals of cancer genomics and applications of liquid biopsy for the detection, characterization, and management of cancer in dogs." *Frontiers in Veterinary Science* (2021).
- 6- Yamasaki, H. *et al.* Establishment and characterization of urothelial carcinoma cell lines with and without *BRAF* mutation (V595E) in dogs. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* (2022).
- 7- KÜchler, L., et al. "Artificial Intelligence to Predict the *BRAF* V595E Mutation in Canine Urinary Bladder Urothelial Carcinomas." *Animals* (2023).
- 8- Ahmed, B. H., et al. "Role of the tumour microenvironment in bladder cancer pathogenesis and value of the reverse translational approach: a tale of two species." *Clinical and Translational Discovery* (2023).
- 9- Parker, H. G., *et al.* Os padrões de expressão de RNAseq do carcinoma urotelial invasivo canino revelam dois grupos tumorais distintos e regiões compartilhadas de desregulação com tumores de bexiga humana. *BMC Câncer* (2020).
- 10- Vitti, G. V. et, al. A Comparative Meta-Analysis and *in silico* Analysis of Differentially Expressed Genes and Proteins in Canine and Human Bladder Cancer. *Frontiers*. 2020.
- 11- Leffler, A. J., et al. "Comparison of computed tomography and ultrasound techniques for

- quantifying canine urinary bladder transitional cell carcinoma tumor volume." *Veterinary radiology & ultrasound: the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* (2018).
- 12- Tsamouri, M.M. et, al. *Comparative Cancer Cell Signaling in Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder in Dogs and Humans*. *Biomedicines* 2021.
- 13- Segatto, N. V, et al. "Perspective: humanized pig models of bladder cancer." *Frontiers in Molecular Biosciences* 8 (2021).
- 14- Cronise, K. E., et al. "Characterizing the molecular and immune landscape of canine bladder cancer." *Veterinary and Comparative Oncology* (2022).
- 15- Rasteiro, A. M., *Molecular Markers in Urinary Bladder Cancer: applications for diagnosis, prognosis and therapy*. *Veterinary Sciences*, 2022.
- 16- Mutsaers, A. J., William R. W., and Deborah W. K. "Canine transitional cell carcinoma." *Journal of veterinary internal medicine* (2003).
- 17- Mochizuki H, Shapiro S. G, Breen M .Detection of *BRAF* Mutation in Urine DNA as a Molecular Diagnostic for Canine Urothelial and Prostatic Carcinoma. *PLoS ONE* (2015).
- 18- Thomas R. et, al. Whole exome sequencing analysis of canine urothelial carcinomas without *BRAF* V595E mutation: Short in-frame deletions in *BRAF* and *MAP2K1* suggest alternative mechanisms for MAPK pathway disruption. *PLoS Genetic* (2023).
- 19- Kaji, K.; et, al. Detection of Canine Urothelial Carcinoma Cells in Urine Using 5-Aminolevulinic Acid. *Animals* 2022.
- 20- McCarthy, T. C. Cystoscopy. *Veterinary Endoscopy for the Small Animal Practitioner*, (2021).
- 21- Conrad, D., et, al. Molecular Genetic Investigation of Digital Melanoma in Dogs. *Frontiers Veterinary Science* (2022).
- 22- Mochizuki H, Shapiro SG, Breen M. Detection of *BRAF* Mutation in Urine DNA as a Molecular Diagnostic for Canine Urothelial and Prostatic Carcinoma. *PLoS One*. 2015 Dec 9;10(12):e0144170. doi: 10.1371/journal.pone.0144170. PMID: 26649430; PMCID:

PMC4674145.

- 23- Decker B, Parker HG, Dhawan D, Kwon EM, Karlins E, Davis BW, Ramos-Vara JA, Bonney PL, McNiel EA, Knapp DW, Ostrander EA. Homologous Mutation to Human *BRAF* V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer--Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test. *Mol Cancer Res.* 2015 Jun;13(6):993-1002. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0689. Epub 2015 Mar 12. PMID: 25767210; PMCID: PMC4470794.
- 24- Varvil, M. S., et al. "The miRNome of canine invasive urothelial carcinoma." *Frontiers in Veterinary Science* (2022).
- 25- Tagawa M, et al. Quantitative analysis of the *BRAF* V595E mutation in plasma cell-freeDNA from dogs with urothelial carcinoma. *PLoS ONE* (2020).
- 26- Dobson, J.M. Significant advances in veterinary oncology – 60 years on. *Journal of Small Animal Practice*, vol 60. p.711-722.
- 27- CADETSM *BRAF* Mutation Detection Assay. VetBloom, 2018.
- 28- Wang, M, et al. "PCR Techniques and Their Clinical Applications." (2023).

Capítulo 2

Artigo Científico a ser submetido para o periódico “Cancer Research Communications”

Sensibility and specificity of different PCR techniques for the diagnosis of *BRAF* V595E mutation in urine of canine patients suspicious of urothelial carcinoma

Tatiana Adelino Santos¹, Thayná Silva Oliveira², Mácio Carvalho², Renee Laufer-Amorim², Carlos Eduardo Fonseca-Alves^{1,3,4*}, Leonardo Nazário de Moraes⁵, Rejane Maria Tommasini Grotto⁵

¹Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University – UNESP, Brazil.

²Department of Veterinary Clinic, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University – UNESP, Brazil.

³Institute of Health Sciences, Paulista University – UNIP, Bauru. Brazil

⁴Institute of Veterinary Oncology – IOVET, São Paulo, Brazil.

⁵Laboratory of Applied Biotechnology, São Paulo State University (Unesp), Medical School, Botucatu

ABSTRACT

Urothelial carcinoma of the bladder (UCB) is considered the most frequent neoplasm of the genitourinary tract, also called transitional cell carcinoma, which is often found in the bladder trigone and typically infiltrates the urethra and ureter. Currently, the most reliable test for diagnosing urothelial carcinoma of the bladder is histopathology; however, it is a test rarely used due to the difficulty of accessing the bladder for biopsy. On the other hand, about 80% of dogs with transitional cell carcinoma have the *BRAF* V595E mutation, and a genetic test using a urine sample has been proposed for diagnosis. In this context, the objective of this study is to evaluate and compare the sensitivity and specificity of conventional polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR (qPCR), and digital PCR (ddPCR) for detecting the V595E mutation of the *BRAF* gene in urine samples from dogs with UCB. Forty-three animals were included, 15 dogs with UCB confirmed by histopathology, 10 dogs with no bladder alterations (normal), 17 dogs with complicated cystitis, and one dog with a polyp, all chosen randomly regardless of breed, sex, and age. All dogs were monitored for at least four years. All deceased animals underwent autopsy, and of the patients with complicated cystitis (N=17), eight had a concurrent condition. Of the patients with no bladder alterations, no patient had a mutation in any of the techniques. Of the patients with UCB, 13.3% (2/15) had a mutation in conventional PCR, 33.3% had a mutation in one allele (WT/MUT) (5/15), and 6.6% had a mutation in both alleles (MUT/MUT) (1/15); in ddPCR, 80% of the cases (12/15) had a mutation. An alarming finding was the mutation rate in patients with complicated cystitis (N=17). None of the patients with

complicated cystitis had the *BRAF* mutation in qPCR. However, 70% of patients with complicated cystitis had the *BRAF* mutation in ddPCR. The sensitivity of qPCR, ddPCR, and Sanger sequencing in diagnosing UCB was 46.67%, 75%, and 46.67%, respectively. It was concluded that ddPCR is the most sensitive test for detecting the *BRAF* mutation and that patients with other chronic non-neoplastic urinary system conditions may test positive for the mutation.

Keywords: Urothelial Carcinoma of the Bladder, Dogs, *BRAF V595E*, qPCR, Digital PCR.

Introduction

Urothelial carcinoma (UC) of the bladder is one of the most important urogenital cancers in dogs, it is a highly invasive cancer and it is considered an important model for human muscle-invasive bladder cancer. Several risk factors have been proposed for UC development, including breed predisposition, environmental exposure to chemicals, and cigarette smoking exposure (KNAPP, 2020). Usually, these tumors are diagnosed at late stages, with tumors invading the wall bladder layers, including the muscle layer (TSAMOURI et al., 2021). One of the biggest challenges in the UC approach is assessing tumor samples through different surgical procedures for histopathological diagnosis (VITTI GAMBIMet al., 2020).

The difficulty of assessing the bladder for collecting tissue biopsy is related to the bladder's intra-abdominal location and the necessity of open cystotomy procedures. (VITTIGAMBIM et al., 2020). Moreover, there is a risk of tumor cell transplantation during tumor manipulation and some veterinarians do not indicate surgical procedure for histopathological diagnosis. Moreover, cytological evaluation is usually performed for bladder UC diagnosis (MEUTEN et al., 2016). The major concern about using cytological smears is the absence of tissue structural analysis and misdiagnosis due to the evaluation of isolated or aggregated cells instead of tissue architecture. However, non-invasive diagnostic methods are still important in clinical routine, and recently, investigation of *BRAF* mutation in urine samples

was proposed as a diagnostic (MOCHIZUKI et al., 2015) tool in Brazil, and clinical veterinarians and surgeons prefer this evaluation in general.

The *BRAF* test is commercially available as CADET *BRAF*®, and it is performed using digital polymerase chain reaction (ddPCR). However, should be used carefully, since the test sensibility and sensitivity still need to be evaluated in larger studies. In a recent case report, detection of *BRAF*^{V595E} mutation associated with cytology was used for the diagnosis of canine UC with a misdiagnosis (Chambers et al., 2023). The cytological indicated minimal atypia, however, *BRAF* was positive and the dogs were subjected to total cystotomy. However, the morphological diagnosis revealed a mucosa dysplasia, being a benign lesion (Chambers et al., 2023). This case demonstrated that we should be careful when using *BRAF*^{V595E} mutation as a definitive diagnostics tool.

In Brazil, *BRAF*^{V595E} mutation became very popular among veterinarians. Moreover, *BRAF*^{V595E} mutation in Brazil is not assessed by ddPCR. The ddPCR technique is highly sensitive but with high cost and has been introduced in Brazil mainly for human diagnosis, including COVID-19 diagnosis. Since the proposed diagnosis tool is based on ddPCR, the previous literature lacks information regarding the sensitivity of qPCR for the detection of urothelial carcinoma in dogs.

Due to the importance of bladder cancer in dogs, this study aimed to investigate the sensitivity and specificity of real-time polymerase chain reaction (qPCR) and digital polymerase chain reaction (ddPCR) in diagnosing bladder urothelial carcinoma in dogs.

Métodos

Grupos, Coleta de Urina e Armazenamento

Essa pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética institucional de uso de animais em pesquisa,

CEUA-UNESP, sob protocolo #0297/2023. O presente estudo foi prospectivo, randomizado incluiu inicialmente 46 animais entre janeiro de 2020 à janeiro de 2021. Foram incluídos nesse estudo pacientes com suspeita de carcinoma urotelial, em que foi realizado histopatologia para confirmar o diagnóstico do paciente, pacientes sem alterações urinárias e que o exame ultrassonográfico não mostrou alterações de bexiga (grupo controle) e pacientes com doenças complicadas crônicas do trato urinário. O grupo de pacientes controle e de doenças complicadas do trato urinário não foram submetidos à biópsia da bexiga, por isso, os mesmos foram ou acompanhados pelo período mínimo de quatro anos para assegurar ausência de evolução para carcinoma de bexiga ou aqueles que foram á óbito, foram submetidos à necrópsia.

Os critérios para exclusão foram: pacientes que apresentaram hematúria acentuada, o que impossibilitou extração do DNA, amostras com alta degradação do DNA e tutores que não permitiram acompanhamento dos pacientes até o período mínimo de quatro anos ou que recusaram a necrópsia no fim do período experimental quando o paciente veio à óbito. Ao fim, os animais foram agrupados de acordo com seus diagnósticos em: grupos de amostras controle, grupo de pacientes com afecções complicadas do trato urinário, pacientes com lesões benignas e grupo de pacientes com CUB.

As amostras de urina foram coletadas dos pacientes por meio de uma sonda e/ou coletor universal e a extração de DNA foi realizada no menor tempo possível, considerando o máximo período de 24 horas mantendo a amostra sob refrigeração (2°C) após coleta.

Extração de DNA

Para extrair o material genético da urina foi utilizado um protocolo extração de DNA por Fenol e Clorofórmio, onde se coletou pelo menos 4mL de urina para a extração do DNA com

posterior centrifugação a 14.000 RPM por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação a amostra foi lavada com tampão PBS pH 7.4. As amostras foram incubadas com 400µL de tampão de lise celular e 20µL de proteinase k por 12 horas a 50°C.

Após a digestão, a amostra foi adicionada 500µL de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25: 24: 1) com centrifugação a 14.000 RPM por 20 minutos a temperatura ambiente, esta etapa foi repetida mais uma vez. O sobrenadante foi centrifugado a 14.000 RPM por 20 minutos a temperatura ambiente com 500µL de clorofórmio. O DNA genômico foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e 0,5 volume de acetato de sódio 7,5M por aproximadamente 2h no gelo com posterior centrifugação a 14.000 RPM por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado foi lavado em 1mL de etanol 70% com centrifugação a 14.000RPM por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a extração do DNA genômico, o mesmo foi ressuspendido em água livre de nuclease e quantificado com a relação 230/260nm no espectrofotômetro NANODROP 8000 (THERMO FISHER, EUA).

Posteriormente é quantificado a amostra e feito o sequenciamento pelo método SANGER e com a ajuda do programa CROMA versão 2.6.6 é observado se há a mutação ou não do *BRAF* V595E na urina através de uma curva. Caso haja a mutação o programa mostra a letra W, observando-se um T e um A na mesma curva impossibilitando assim de saber qual nucleotídeo estamos lidando. Com isso, sabe-se que estamos diante da mutação desejada.

Em seguida, os dados foram analisados no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (BLASTNCBI) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome#) onde foi verificado se o produto de sequenciamento obtido correspondia a região do gene *BRAF*.

Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real Quantitativa- qPCR

Para amplificação da região do gene *BRAF* com eventual mutação V595E (c.1349T>A), foi feita com os primers *Forward*: 5′AAGCAGGTCACATATGCCAAA3′ e *Reverse*: 5′ATTTTGGACCCTGAGGTGC3′. Os mesmos foram desenhados no programa Prime3web versão 4.1.0 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3/>). O sequenciamento foi feito de acordo com protocolo do IBTEC, o qual oferece este tipo de serviço. A reação de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foi realizada no equipamento QuantStudio 12K flex (THERMO FISHER) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Ao término da reação, os produtos de qPCR foram submetidos à curva de desnaturação para verificar a presença da mutação V595E, que consiste em desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e aumento gradual da temperatura até 95°C (High Resolution Melt), com posterior anelamento a 60°C por 1 minuto.

O reagente usado na reação de qPCR foi o Melt Doctor HRM Master Mix (ThermoFisher), em cada reação foi usado 10µL de Melt Doctor HRM Master Mix (2X) com 1,2 µL (600nM) de primer Forward e Reverse, 20ng de DNA genômico e água livre de nucleasse para completar o volume final de 20µl. O resultado da reação foi avaliado com programa SDS v1.4 (Thermo Fisher). Como controle positivo da reação foi usada amostra de carcinoma urotelial de bexiga com a mutação V595E confirmada por sequenciamento Sanger.

Para confirmar a mutação por PCR em tempo real, foi desenhado oligonucleotídeo com *mismatch* na região 3′ (Figura 4), dessa forma, somente, as amostras com a presença da mutação BRAF V595E amplificaram.

Na figura 5 foi apresentado o gráfico de multicomponente do corante SYBR GREEN onde pode-se observar que a marcação em ROC foi utilizada para normalizar quaisquer flutuações em que no sinal de fluorescência não foram relacionadas a PCR.

ddPCR- Reação de PCR Digital

Para o ensaio de PCR digital foi utilizado 20 µL de 1 x Droplet Supermix, 1 µL de DNA genômico isolado de cada amostra de paciente, 15 µL da enzima de restrição MseI, e 250 nM de sondas TaqMan® MGB marcadas com VIC e FAM para as sequências V595E e selvagem. A mistura de reação de PCR foi particionada em uma emulsão de aproximadamente 20.000 gotículas no equipamento QX200™ PCR digital. Posteriormente foi realizada a PCR no termociclador T100™, com os seguintes ciclos: desnaturação a 95° C por 10 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos e 59° C por 10 minutos, segundos de anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Após a PCR, as gotículas foram analisadas no equipamento QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad).

Os resultados são definidos com base na fluorescência emitidas pelas gotas. O número de gotas positivas e negativas foi registrado e após a conclusão dos resultados, foi utilizado o software QuantaSoft versão 1.7.4.0917 para calcular o resultado final e posteriormente o mesmo foi fotografado.

Para a classificação dos pacientes em positivos ou negativos para a mutação do gene *BRAF* foi considerado ao menos cinco gotículas positivas como sendo positivas para a mutação, enquanto as amostras obtidas com uma leitura menor de cinco gotículas foram classificadas como sendo negativas.

Sequenciamento de Sanger

O status da mutação *cBRAF* V595E de todas as amostras incluídas no estudo foi avaliado por sequenciamento de Sanger. A amplificação por PCR foi realizada para amplificar um fragmento de DNA de 391 pb que abrange a região do *cBRAF* V595E, conforme descrito

anteriormente (MUCHIZUKI et al., 2015).

Análise Estatística

Os dados foram tabulados em uma planilha de Excel e avaliados quanto a frequência e a distribuição de forma qualitativa e quantitativa. Posteriormente, foram aplicados testes de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e acurácia utilizando o programa estatístico MedCalc® (Versão 22.030; acessada em 26 de julho de 2024).

RESULTADOS

1. Dados Epidemiológicos

Foram coletadas urinas de 60 cães, das quais 43 foram testadas pelos critérios de inclusão e exclusão citados. 17 amostras foram excluídas por não atenderem aos critérios determinados na pesquisa. Das amostras para padronização (n=5), foram selecionados tumores e diferentes reações foram realizadas para se obter a amplificação do gene. Após padronização, o produto da qPCR foi sequenciado, para confirmação da presença da mutação. As outras 17 amostras (17/43), foram avaliadas após padronização da técnica. Dentre os animais incluídos, 34,88% (15/43) apresentaram CUB, 6,69% lesões benignas (N=3) e cistite complicada (N=15) representaram 41,8% (18/43) e cães sem alterações na bexiga representaram 23,32%.

Os dados referente a idade, sexo, raça, tratamento, sobrevida, encontram-se na tabela 1

IDADE	SEXO	RAÇA	DIAGNÓSTICO PRÉVIO	Tratamento	SOBREVIDA
16	F	paudlo	TCC	Não infarmada	
11	M	paudlo toy		Não infarmada	Mocrápria em 2021
	M	SRD	TCC	Não infarmada	Mocrápria em 2021
5	F	Paudlo	carcinoma uratelial de boxiqa	Não infarmada	
13	M	zhi-tzu		Não infarmada	
10	M	labrador	leishmaniose infeccção recorrente de urina	Não infarmada	Faleceu em 2021
0	M	paudlo		Não infarmada	
16	M	zhi-tzu		Não infarmada	
7	F	SRD	carcinoma uratelial de boxiqa	Não infarmada	
	M	SRD	tcc	Não infarmada	
9 a 10	M	SRD	pielonefrite	Levofloxacina	Eutanásia em 09/2021
8	M	SRD	cúrtite	Doxiciclina	
11	F	fax terrier	TCC	Piraxican/ ciclafarfamina	Eutanásia em 02/09/2021
14	F	border collie	hiperplasia uratelial	Não infarmada	
12	F	malt&r	TCC	Eletraquimioterapia	
7	F	SRD	tcc	Cor&nica, Leucaqen	Mocrápria em 08/2021
10	M	malt&r	epit&lia transicional dúpl&rica	Ciclafarfamina	
13	M	zhi-tzu	carcinoma uratelial	Acupuntura, q&rtaid, pra cart&rama	Eutanásia em 09/2021
9	F	zcatirh terrier	Neoplasia uratelial	Ciclafarfamina + piraxican	
10	F	SRD	pr&ceza inflam&t&ria bacteriana	daxi + imidaxal + prodin&zana	
9	M	yarkshira terrier	p&lipa	Não infarmada	
6	F	zhi-tzu	reatividade tumoral	Não infarmada	
14	F	darchaund	carcinoma uratelial	Não infarmada	
12	F	SRD		pra-rim	Faleceu em 17/06/2024
9	M	lhara apra		Não infarmada	
15	F	labrador		Não infarmada	Faleceu em 30/01/2024
15	F	rrd	carcinoma utatelial	Não infarmada	Viva em 02/07/2024
				Não infarmada	Viva em 02/07/2024
13	F	tockel-darchaun	uralt&fare	Não infarmada	
6	M	zhi-tzu	Neoplasia espl&nica	Doxiciclina	Eutanásia em 30/08/2023
10	M	SRD		Não infarmada	
15	M	Pincher	daen&ça renal cr&nica	Não infarmada	
8	M	lhara apra	cúrtite	Não infarmada	Viva em 03/07/2024
8	M	SRD	cúrtite enfim&mat&ra	Marba	Faleceu em 01/2024
1	M	SRD	daen&ça renal cr&nica	Não infarmada	
4 meses	M	Husk Siberiana		Não infarmada	
1	M	SRD	cúrtite	Não infarmada	
2	F	SRD	cúrtite bacteriana	Não infarmada	
8	F	Border Collie	daen&ça renal cr&nica	Não infarmada	
16	M	paudlo		Não infarmada	
1 meses	M	SRD		Não infarmada	Viva em 03/07/2024
13	F	SRD	daen&ça renal cr&nica	Não infarmada	Faleceu em 08/2023
16	M	SRD	cúrtite	Não infarmada	Faleceu 02/04/2023

Tabela 1- Dados dos pacientes (sexo, raça, idade, tratamento, diagnóstico e sobrevida) incluídos no presente estudo

Todas as amostras selecionadas foram amplificadas por PCR em tempo real com os oligonucleotídeos referentes à região genômica contendo a mutação *BRAF V595E* (Figura 1). Os produtos de PCR em tempo real foram purificados e posteriormente sequenciados para verificar a presença da mutação *BRAF V595E*. Em duas amostras foi possível verificar a troca do nucleotídeo Adenina por Timina, no eletroferograma existem dois picos, um referente a Timina e outro a Adenina, possivelmente nestas duas amostras existam células sem a mutação e células com a mutação (Figuras 2 A e B).

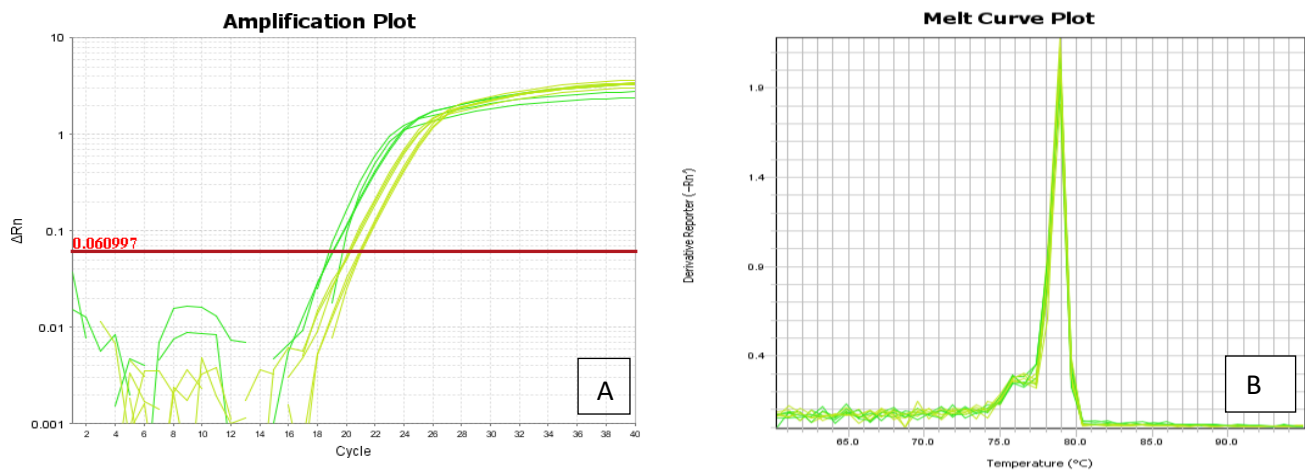


Figura 1. Curva de Amplificação e Dissociação das amostras de Urina de cão com Carcinoma Urotelial. A: Amplificação por PCR em tempo Real da região do DNA genômico contendo a mutação *BRAF* V595E. B: Curva de dissociação, demonstrando a amplificação da região desejada.

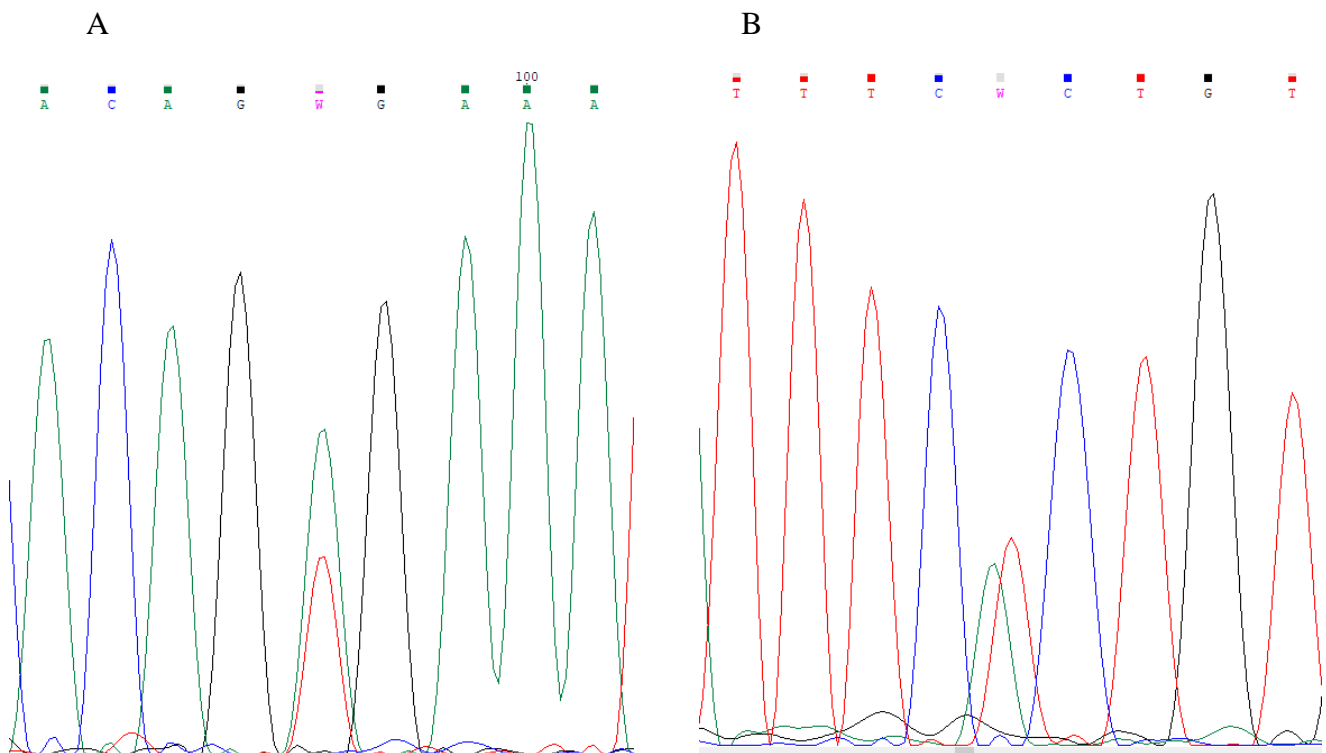


Figura 2. Eletroferograma do sequenciamento Sanger das amostras de urina de cães com carcinoma urotelial. A: Eletroferograma da fita *forward* do produto de PCR em tempo real. B: Eletroferograma da fita reverse do produto de PCR em tempo real. Nas duas fitas é possível

identificar a mutação *BRAF V595E*.

Em outros casos, identificou-se a mutação, entretanto, a intensidade no eletroferograma foi menor, sendo assim, a quantidade de células tumorais com a mutação é menor (Figuras 3 A e B). Já em outras amostras de carcinoma urotelial não foi possível identificar a mutação referida por sequenciamento. Um animal com pólipos na bexiga, sem sinais de neoplasia no exame histopatológico, mas que ainda está sendo acompanhado, sem sinais de desenvolvimento neoplásico que apesar de ter tido resultado de mutação do *BRAF* no sequenciamento e na PCR. A veterinária responsável pelo caso foi contatada e a mesma relatou que o animal está bem e sem massa na bexiga por exame de imagem ultrassonográfico e sequenciamento.

Para confirmar a mutação por PCR em tempo real, foi desenhado oligonucleotídeo com *mismatch* na região 3' (Figura 4), dessa forma, somente, as amostras com a presença da mutação *BRAF V595E* amplificaram. As amostras com a troca de nucleotídeo Adenina por Timina com dois picos evidentes no eletroferograma e aquelas com picos menores foram amplificadas por PCR em tempo real. A curva de amplificação foi tardia nas amostras com menor pico no eletroferograma em relação as amostras com picos evidentes. Houve também amplificação nas amostras, que no sequenciamento não foi possível determinar a presença da mutação (Figura 4). Desse modo, o oligonucleotídeo com *mismatch* mostrou-se eficiente nas situações avaliadas. Na figura 5 foi apresentado o gráfico de multicomponente do corante SYBR GREEN podendo-se observar que a marcação em ROC foi utilizada para normalizar quaisquer flutuações em que no sinal de fluorescência não estejam relacionados a PCR.

A

B

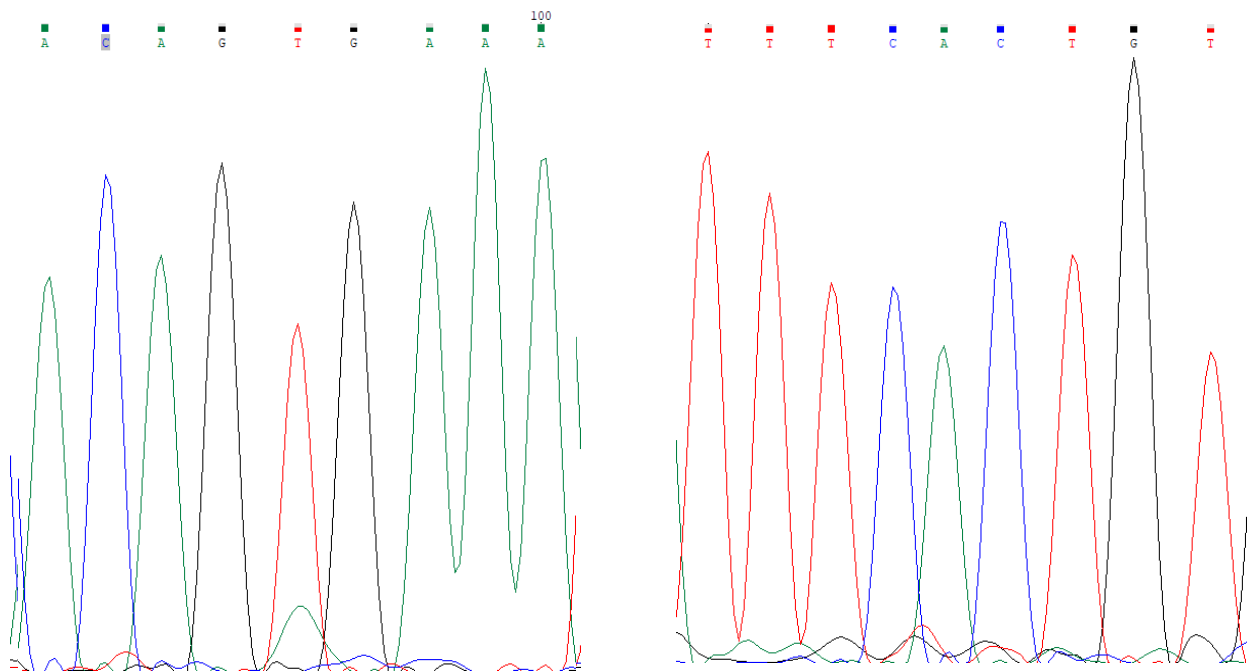


FIGURA 3 – Eletroferograma do sequenciamento Sanger das amostras de urina de cães com carcinoma urotelial. A – Eletroferograma da fita *forward* do produto de PCR em tempo real. B - Eletroferograma da fita *reverse* do produto de PCR em tempo real. Em apenas uma das fitas é possível identificar a mutação.

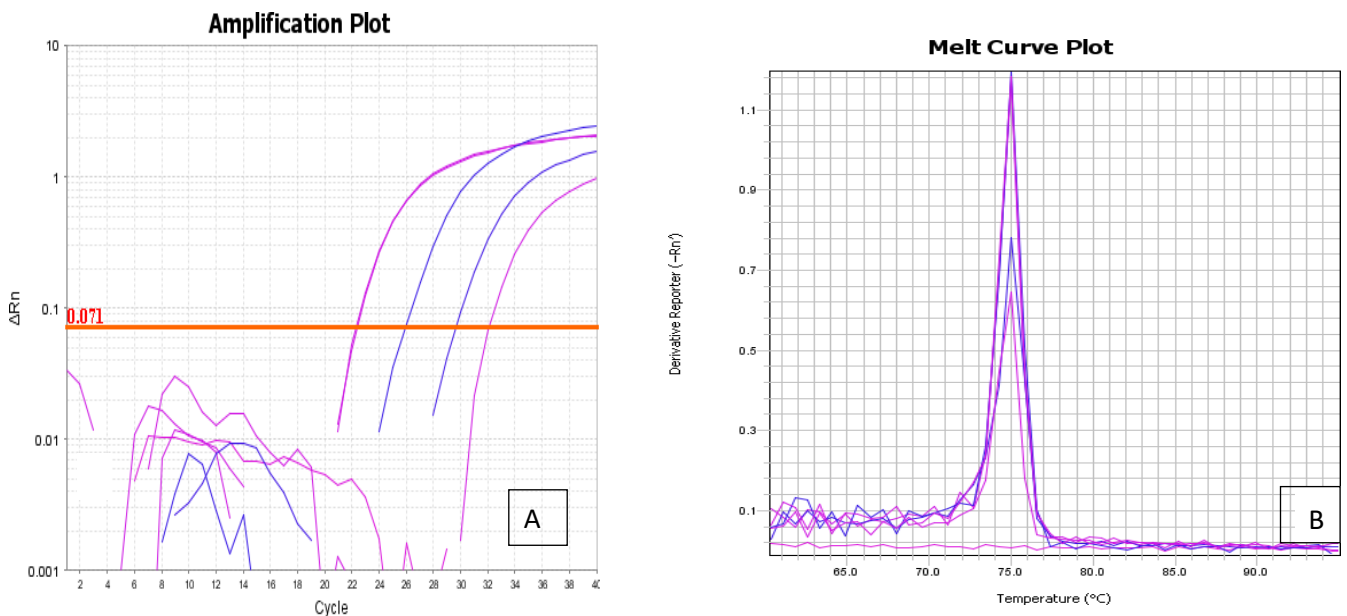


FIGURA 4 – Curva de Amplificação e Dissociação das amostras de Urina de cães com Carcinoma Urotelial. A – Amplificação por PCR em tempo Real da região do DNA genômico contendo a mutação *BRAF* V595E. B – Curva de dissociação, demonstrando a amplificação da região desejada.

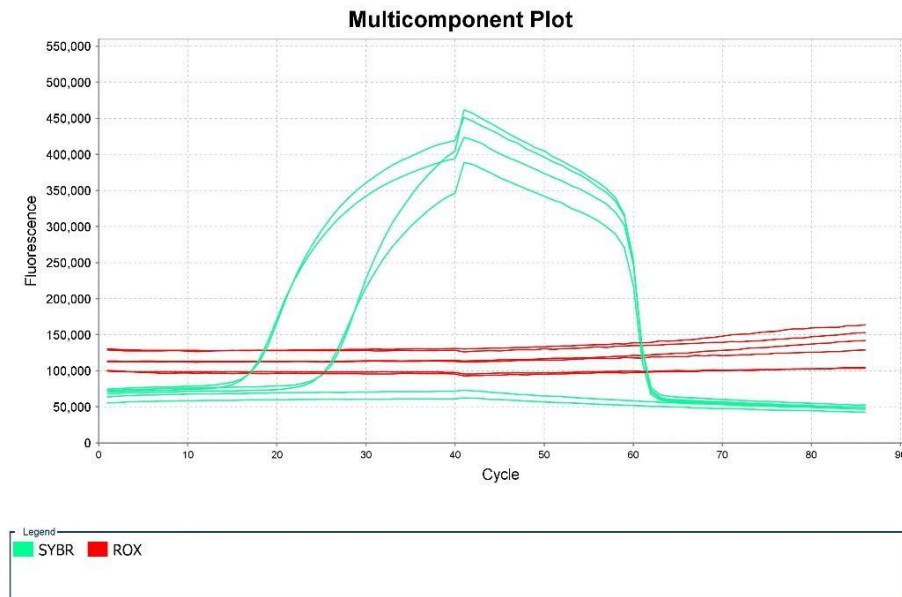


Figura 5 – Gráfico multicomponente do corante SYBR.

Para confirmar a mutação por PCR em tempo real, foi desenhado oligonucleotídeo com *mismatch* na região 3' (Figura 6), dessa forma, somente, as amostras com a presença da mutação *BRAF* V595E amplificaram. No gráfico de discriminação de alelos (Figura 7) pode-se observar algumas marcações. A marcação em X foi representada pela indeterminação dos alelos, a marcação em vermelho, mostrou quatro homozigotos apresentando o wild type, a marcação em verde apresentou três amostras contendo o heterozigoto que apresenta o wild type e a mutação desejada e a marcação em azul apresentou 8 homozigotos contendo a mutação desejada.

Na figura 8 foi apresentado o gráfico de multicomponente da sonda TAQMAN onde pode-se observar que a marcação em ROC é utilizada para normalizar quaisquer flutuações que no sinal de fluorescência não estão relacionadas a PCR. Quanto a marcação em FAM foi utilizada para as expressões gênicas e a marcação em VIC foi realizada para garantir que o gene controle está mais expresso que o gene alvo.

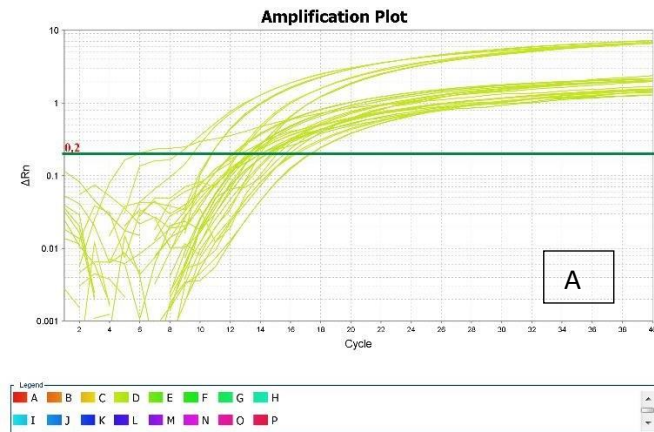


Figura 6 – Curva de Amplificação das amostras de Urina de cães com Carcinoma Urotelial em sonda TAQMAN. A – Amplificação por PCR em tempo Real da região do DNA genômico contendo a mutação *BRAF* V595E.

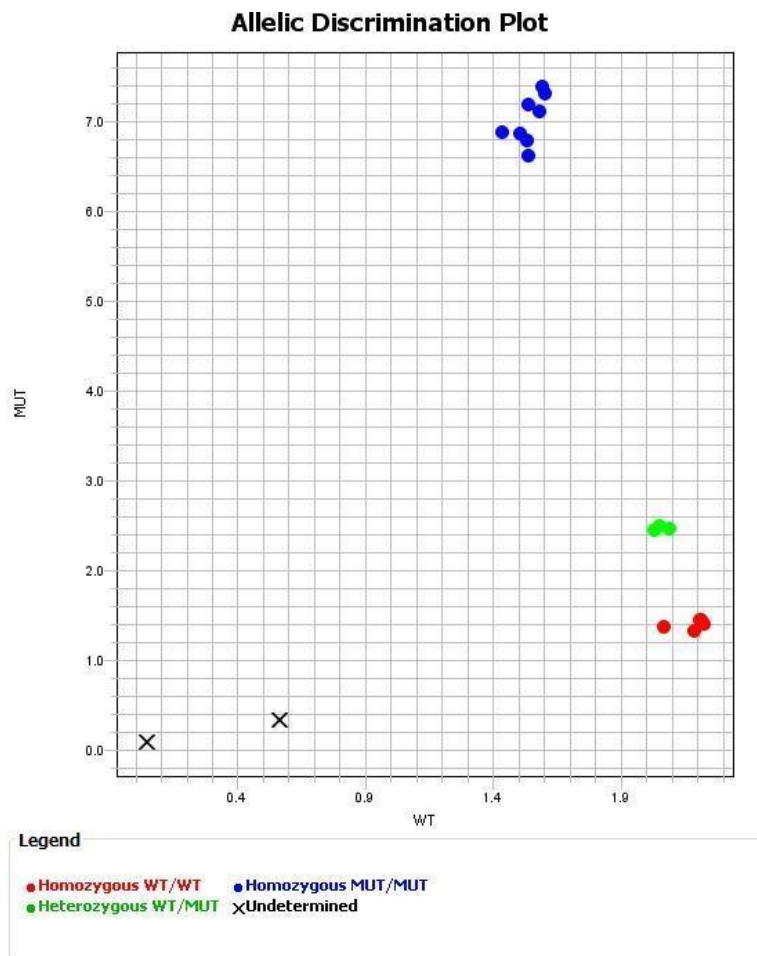


Figura 7 – Gráfico de discriminação de alelos pela sonda TAQMAN.

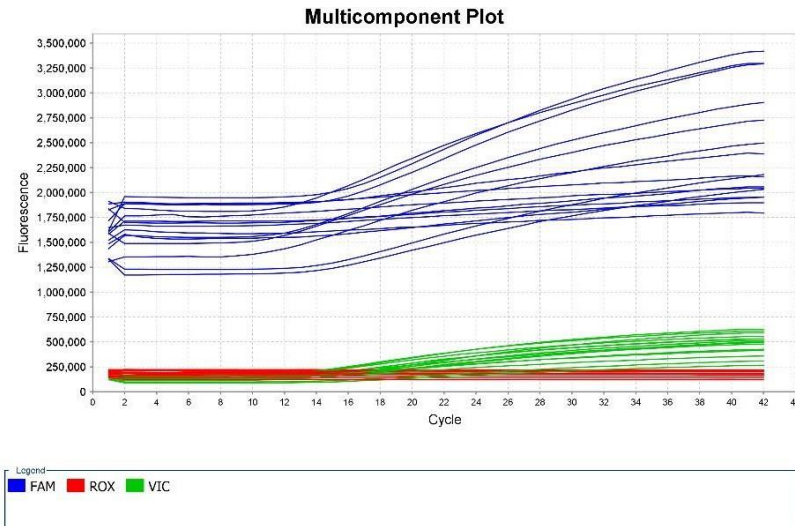


Figura 8 – Gráfico multicomponente da sonda Taqman.

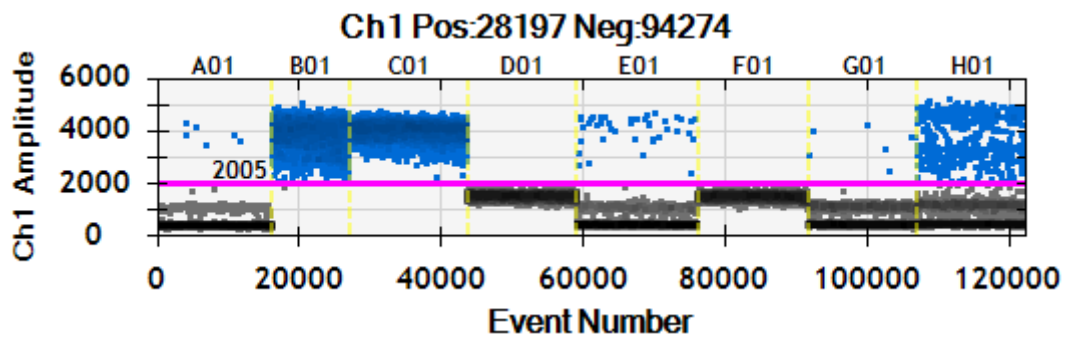


Figura 9 – Histograma da PCR digital com marcação FAM

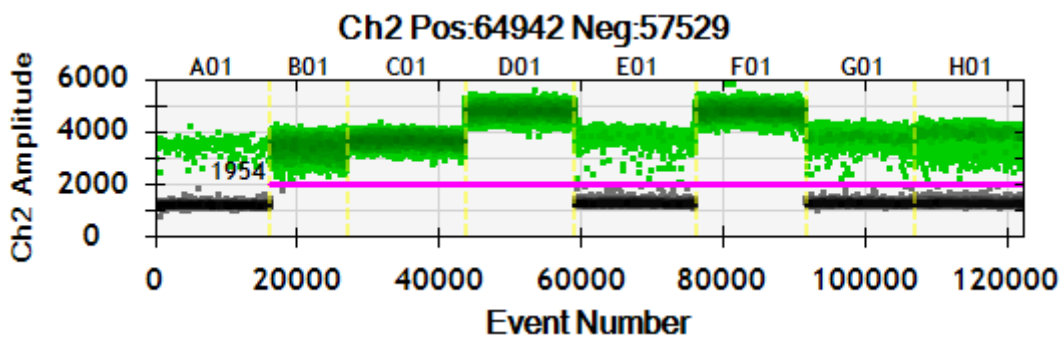


Figura 10 – Histograma da PCR digital com marcação VIC

Quanto a marcação em FAM (azul) foi utilizada para as expressões gênicas e a marcação em VIC (verde) foi realizada para garantir que o genecontrole está mais expresso que o gene alvo. Para classificar as amostras positivas (FAM) e negativas (VIC) foi considerado uma amplitude de 4000. Cada coluna analisada representa uma amostra (A01-H01).

Sensibilidade e Especificidade dos Testes

Dos pacientes com CUB, 13,3% (2/15) apresentaram mutação na PCR em tempo real, 33,3% apresentaram mutação em um alelo (WT/MUT) (5/15) e 6,6% mutação nos dois alelos (MUT/MUT) (1/15), na ddPCR, 80% dos casos (12/15) apresentaram mutação. Um dado alarmante, foi a taxa de mutação em pacientes com cistite complicada (N=17). Nenhum dos pacientes com cistite complicada tiveram mutação de *BRAF* no qPCR. No entanto, 70% dos pacientes com cistite complicada apresentaram mutação de *BRAF* na ddPCR. A sensibilidade do qPCR, ddPCR e sequenciamento de Sanger no diagnóstico do CUB foi de 46,67%, 75% e 46,67%, respectivamente. Os dados de sensibilidade, especificidade e acurácia podem ser encontrados na Tabela 2.

Condition	Sensitivity	Specificity	Positive Likelihood Ratio	Negative Likelihood Ratio	Positive Predictive Value	Negative Predictive Value	Accuracy
qPCR	46.67%	100%	-	0.53	100%	77.14%	80.95%
ddPCR	75%	55.56%	1.69	0.45	55.56%	75%	63.83%
Sanger Sequencing	46.67%	98.3%	12.6	0.55	87.5%	76.47%	78.57%

Discussão

O gene *BRAF* possui uma mutação em sua estrutura pela qual há uma troca de um aminoácido timina por um aminoácido adenina e conseqüentemente há uma troca do aminoácido valina para o ácido glutâmico (CONRAD, D. et al, 2022). Cerca de 80% dos carcinomas uroteliais canino abrigam essa mutação (ROSSMAN, et. Al, 2021).

No presente projeto foi utilizado o corante SYBR GREEN para o teste de qPCR, entretanto foi visto que o mesmo não é tão sensível nas amostras de urina quanto o PCR digital, uma vez que a maioria das amostras confirmadas de CUB, por histopatologia ou citologia vesical, foram negativas na qPCR. Sybr green quando adicionado a amostra, liga-se instantaneamente a toda fita DNA presente na amostra. Assim, no processo da PCR, a DNA polimerase amplifica a sequência alvo e gera produtos de PCR (amplicons). Conforme a PCR avança, mais e mais amplicons são gerados. Como o SYBR GREEN se liga a toda fita dupla de DNA, tem-se um resultado de aumento da intensidade fluorescência, a qual é proporcional a quantidade de produtos gerados pela PCR (MOREIRA, 2017; ZHANG, 2021).

Frente a esta dificuldade, foi utilizado a sonda TaqMan, que apresentam maior sensibilidade ao teste. Entretanto, mesmo a sonda taqman apresentando maior sensibilidade para o teste de Qpcr.(MOREIRA, 2017; ZHANG, 2021).

Analizando os dados obtidos na tabela 2 a pcr em tempo real obteve uma sensibilidade de 46,67% e uma especificidade de 100%. A razão de verossimilhança positiva não gerou resultado e a razão de verossimilhança negativa obteve-se um valor de 0,53. O valor preditivo positivo foi de 100% e o valor preditivo negativo foi de 77,14%. Sua acurácia: 80,95%.

A pcr em tempo real apresentou uma alta especificidade o que indicando que os resultados positivos apresentam alta confiabilidade. No entanto, a sensibilidade relativamente baixa sugere que quase metade dos casos positivos pode não ser detectada com este método. Enquanto que o valor preditivo positivo de 100% é um indicativo de que todos os casos identificados como

positivos para a mutação *BRAF V595E* são verdadeiramente positivos.

Em contrapartida a ddPCR obteve uma Sensibilidade de 75% e uma especificidade de 55,56%. A razão de Verossimilhança Positiva foi de 1,69 e a razão de verossimilhança negativa foi de 0,45. O valor preditivo positivo foi de 55,56% e o valor preditivo negativo foi de 75%. Sua acurácia foi de 63,83%.

Demonstrando assim, que a ddPCR possui maior sensibilidade em comparação com a qPCR, sendo capaz de detectar uma maior proporção de casos positivos. Contudo, a especificidade mais baixa indica que há uma maior probabilidade de falsos positivos. A razão de verossimilhança positiva indica uma moderada utilidade na confirmação de casos, enquanto a razão de verossimilhança negativa sugere uma melhoria na exclusão de casos negativos.

O sequenciamento de sanger apresentou uma sensibilidade de 46,67% e uma especificidade de 98,33%. A razão de verossimilhança positiva foi de 28 e a razão de verossimilhança negativa foi de 0,55. O valor preditivo positivo foi de 87,5% e o valor preditivo negativo foi de 76,47%. Sua acurácia foi de 78,57%.

Apresentando assim, alta especificidade com uma sensibilidade intermediária, similar à qPCR. A razão de verossimilhança positiva muito alta indica uma excelente capacidade de confirmar a presença da mutação. Apesar disso, a razão de verossimilhança negativa e a sensibilidade indicam que uma porção considerável de casos positivos pode não ser positivos.

Contudo, os métodos de PCR digital e o sequenciamento de Sanger apresentaram especificidade muito alta, enquanto que a PCR em tempo real teve sensibilidade mais baixa. O ddPCR, embora com menor especificidade, mostrou-se mais sensível, indicando uma maior capacidade de identificar casos positivos de CUB.

Conclusão

Para o teste de qPCR houve uma certa dificuldade para encontrar o reagente mais sensível para detecção do *BRAF* V595E, com isso foram realizados testes com a SYBR green e a sonda taqman os quais apresentaram pouca sensibilidade quando comparados com a técnica do ddPCR.

Foi possível concluir que o ddPCR é o teste mais sensível para a detecção da mutação de *BRAF* e que outras afecções crônicas não neoplásicas do sistema urinário podem ser positivos para a mutação.

REFERÊNCIAS

- 1-Conrad, D., et, al.Molecular Genetic Investigation of Digital Melanoma in Dogs. *Frontiers Veterinary Science* (2022)..
- 2-Rossman, P, et al. "Phase I/II trial of vemurafenib in dogs with naturally occurring, *BRAF*-mutated urothelial carcinoma." *Molecular Cancer Therapeutics* (2021).
- 3-Moreira O. C, et al. Development of conventional and real-time multiplex PCR-based assays for estimation of natural infection rates and *Trypanosoma cruzi* load in triatomine vectors. *Parasit Vectors*. (2017)
- 4-Zhang, L., & Hu, X. (Eds.).Long Non-Coding RNAs. *Methods in Molecular Biology*. (2021).
- 5-Alvarez, M. L., and Stefania C. D. "SYBR® green and TaqMan® quantitative PCR arrays: Expression profile of genes relevant to a pathway or a disease state." *RNA Mapping: Methods and Protocols*, Springer (2014).