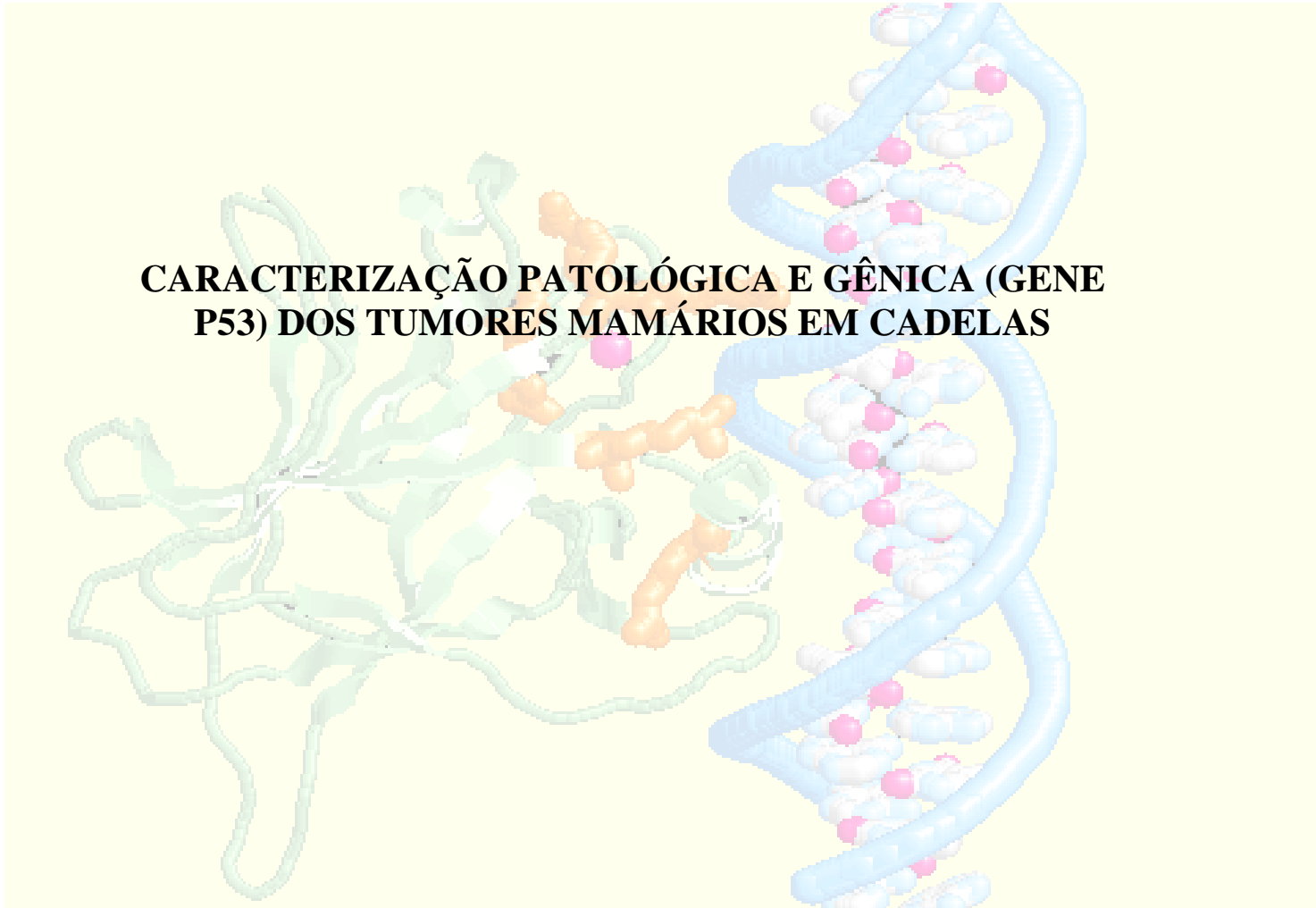


**DANIELA MARIA BASTOS DE SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E GÊNICA (GENE P53) DOS TUMORES MAMÁRIOS EM CADELAS**



RECIFE- PERNAMBUCO  
MARÇO/2006

**DANIELA MARIA BASTOS DE SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E GÊNICA (GENE  
P53) DOS TUMORES MAMÁRIOS EM CADELAS**

RECIFE- PERNAMBUCO  
MARÇO/2006



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

## CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E GÊNICA (GENE P53) DOS TUMORES MAMÁRIOS EM CADELAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Doutor em Ciência Veterinária.

ORIENTADA: DANIELA MARIA BASTOS DE SOUZA  
ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup>. AUREA WISCHRAL  
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MANOEL ADRIÃO GOMES FILHO

RECIFE – PERNAMBUCO  
MARÇO/2006

Ficha catalográfica  
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

S729c Souza, Daniela Maria Bastos de  
Caracterização patológica e gênica (gene P53) dos  
tumores mamários em cadelas / Daniela Maria Bastos  
de Souza – 2006.  
78 f. : il.

Orientador: Áurea Wischral  
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Univer-  
sidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de  
Medicina Veterinária.  
Referências

CDD 574.88

1. DNA
2. PCR
3. Cão
4. Histopatologia
5. Mama – Tumores
6. Câncer em cão
  - I. Wischral, Aurea
  - II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E GÊNICA (GENE P53) DOS TUMORES  
MAMÁRIOS EM CADELAS**

Tese Doutorado elaborada por  
Daniela Maria Bastos de Souza  
Aprovada pela Banca Examinadora

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Aurea Wischral  
Orientadora

---

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho  
Co-orientador

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mirian NogueiraTeixeira

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Márcia Maria Bezerra da Silva

---

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos

---

Prof. Dr. Paulo Fernandes de Lima

## SUMÁRIO

	Páginas
Dedicatória	
Agradecimentos	
RESUMO	
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A glândula mamária	4
2.2 Neoplasias das glândulas mamárias	6
2.3 O ciclo celular	9
2.4 A proteína p53	13
2.5 A atividade da proteína p53	14
2.6 Mutações no gene p53	15
3 ARTIGO 1	21
Caracterização histopatológica das neoplasias mamárias e sua relação com fatores de risco em cadelas na cidade do Recife-PE, Brasil.	
4 ARTIGO 2	45
Estudo de mutações nos exons 4 a 8 do gene p53 em tumores malignos em glândulas mamárias de cadelas.	
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
7 ABSTRACT	79
8 ANEXO	80

## Dedico

*Gabriela, Ulysses, Ignês e Joaquim*

*Dedico a vocês a minha vida.*

*No meio das tempestades eu encontrava a luz nos teus olhares.*

*Sim eram anjos. E foi em vocês que meu coração encontrou o abrigo e a paz tão sonhada, é na família que mora a felicidade.. Pude então saber que o amor contido em meu coração era de vocês.*

## *Agradecimentos*

*A Luz que nos guia, Deus*

*A minha filha Gabriela agradeço-lhe, você é a melhor parte da minha vida.*

*A meus pais Ignês e Joaquim que sempre foram incentivadores natos, que sempre acreditaram nas minhas escolhas. Pelo apoio intensivo nesta última fase.*

*A meu amor Ulysses, pelo carinho, dedicação, paciência e sobretudo apoio que sempre me foi dado.*

*A meus irmãos Isaac e David e cunhadas Eliane e Sandra, pelo companheirismo.*

*A meus sobrinhos, Alessandra, Isaac, Rafaela, Bruno e David, pelas alegrias e carinhos por esta Tia Dani.*

*A minha avó Iracy e tia Severina (In memorian) e tia Terezinha pelo carinho.*

*A meu tio Isaac pelo primeiro excelente modelo de Veterinário e meu tio Inaldo por sempre resolver as broncas do computador.*

*À Profa. Dra. Aurea Wischral, pela confiança, amizade, calma e delicadeza que conduz a orientação e sobretudo pelo exemplo de ser humano, pelo respeito as pessoas, estimo minha admiração.*

*Ao Prof. Dr. Manoel Adrião pelos ensinamentos, incentivos e principalmente pelo entusiasmo com o trabalho.*

*A minha grande amiga Zoraide, pela vontade em ajudar, pelo carinho, amizade sincera, dedico este trabalho.*

*A meu amigo Simonal, pelo prazer em ajudar, dedicação e sobretudo amizade sincera, e Kelly sua namorada que em muitas situações certamente sentiu a falta do seu amor*

*Mirella, pela ajuda fundamental na execução deste trabalho, pelos ensinamentos, amizade e sobretudo pelo carinho, a Seu Namorado Victor, que também abdicou da sua convivência*

*A grande amiga Karina Melo, que sempre foi incentivadora nata, que sempre acreditou no meu trabalho.*

*A querida amiga Lirêda, que sempre tinha uma palavra de carinho, um gesto delicado e pelo apoio durante o experimento.*

*A Vandilson, pelo incentivo e coleta das amostras, fundamental para execução deste trabalho.*

*A Profa. Márcia Pereira e Prof. Fernando Leandro pela leitura das lâminas de histopatológico e pelo carinho.*

*Aos alunos da graduação Jarbas que sempre esteve ajudando nas coletas e Thaysa pelo carinho.*

*Aos funcionários da Animal Vet Center, Karina Feitosa, Tanagra, Silvani e José Ricardo, por tantas vezes ouvir pacientemente as vivências deste trabalho.*

*A área de Reprodução, que sempre foi inspiradora.*

*Ao Prof. Paulo Fernandes de Lima pelo carinho e primeira oportunidade na área de Reprodução.*

*À Profa. Maria Madalena Pessoa Guerra, pela afeição.*

*À Profa. Márcia Brayner Paes Barreto, pelo incentivo.*



*A querida Edna, por sempre está disposta a nos ajudar.*

*A área de Cirurgia, por ter permitido, através de Vandilson, Acácio, Vera e Ilma a coleta das minhas amostras.*

*A área de Fisiologia, através do Prof. Manoel Adrião que permitiu a utilização do laboratório FAMA para desenvolvimento deste trabalho.*

*A Dra. Márcia e Dra. Alessandra. que nos mostrou o caminho certo para o desenvolvimento e avaliação dos resultados.*

*Ao Dr. Gaus que nos mostrou como dar os primeiros passos da Biologia Molecular.*

*À Universidade Federal Rural de Pernambuco, através do curso de Pós-graduação em Ciência Veterinária, representado pela Profa. Dra. Aurea Wischral.*

*À CAPES e o CNPq pelo apoio financeiro fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos animais, principalmente Kidinho (In memorian) que mesmo não estando presente fisicamente é ele que sempre me faz amar cada vez mais minha profissão, Steban, Tonica, Teça, Sheik, Kid Júnior, Kika, Princesa, Columbia, Catarina, Petruquio, Pretinha, Cida, Anka, Uti e Preta (In memorian).*

## RESUMO

Os tumores mamários em cadelas tem alta incidência e malignidade sendo provocados por vários fatores de risco incluindo idade, atividade hormonal, nutrição, vírus, pseudogestação e administração de progestágenos exógenos. O gene p53, conhecido como um gene supressor de tumor, tem apresentado mutações relacionadas com neoplasias. Neste trabalho, o objetivo foi caracterizar os tumores mamários em cadelas, avaliar o comprometimento da mama lateral ao tumor e o envolvimento de fatores de risco sobre a ocorrência dos tumores; analisar o gene p53, na região entre os exons 4 e 8 e relacionar os tumores malignos e mamas normais com as mutações ocorridas neste gene. Foram utilizadas 50 cadelas com tumor de mama e 11 cadelas normais que foram atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram colhidas amostras dos tumores e das mamas adjacentes, clinicamente normais, bem como biopsias de mamas das cadelas normais, para análise histopatológica segundo as técnicas rotineiras. Outros fragmentos foram processados para extração do DNA, amplificação dos exons pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos específicos e sequenciamento. Os animais foram de raças variadas tendo idade compreendida entre 4 e 19 anos para as cadelas com tumor e entre 7 meses e 6 anos para as cadelas normais, sendo que a faixa etária entre 9 e 13 anos foi a que apresentou a maior frequência de neoplasias (48%). Das 50 alterações mamárias, 68% foram carcinosarcomas, 24% foram carcinomas, 2% tumor misto benigno, 2% hemorrágicas, 2% fibroses e 2% foram processos inflamatórios inespecíficos. Não houve diferença na relação entre os fatores de risco e a ocorrência de tumores nas cadelas. Das mamas laterais aos tumores, apenas 36% foram normais, 48% apresentavam carcinoma, 6% carcinosarcomas, 2% hiperplasia, 2% fibrose e em 6% o material não foi suficiente para garantir o diagnóstico. Foram escolhidas amostras de 9 carcinomas e 7 carcinosarcomas com as respectivas mamas normais adjacentes, e de 6 cadelas normais, que foram seqüenciadas em seqüenciador automático e analisadas para a presença de mutações em comparação com a seqüência de nucleotídeos da p53 canina (GenBank - S77819). Foram encontradas mutações em 85% das amostras que após o sequenciamento apresentaram homologia com a proteína p53 canina, de 86,3% em média (GenBank - AAB42022.1). Das mutações observadas, as mais frequentes foram as missense e os exons mais acometidos foram o 5 e o 8 com, respectivamente, 23,2% e 24,9% das mutações. As alterações de nucleotídeos mais frequentes foram deleções e inserções, que resultaram na maioria das mutações missense. Conclui-se que nos animais estudados não houve interferência dos fatores pseudogestação e uso de anticoncepcionais no surgimento dos tumores, mas que a idade é um fator relevante, sendo, entretanto, a idade avançada considerada um fator de risco elevado. Considerando a alta frequência de tumores nas mamas laterais às neoplásicas e a ocorrência de mutações nos genes destas amostras, sugere-se que na exérese do tumor seja retirada a cadeia lateral completa para evitar recidiva. A alta incidência de mutações no segmento do gene que transcreve a parte da proteína que se liga ao DNA, sugere a possibilidade da alteração na funcionalidade da proteína, o que é ressaltado pela alta malignidade dos tumores estudados.

Palavras Chave: câncer, patologia, DNA, neoplasias, PCR, biologia molecular

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as neoplasias que acometem as cadelas, o tumor de mama é uma das mais freqüentes (50%) (DE NARDI et al., 2002) apresentando alta taxa de malignidade – 50% (CASSALI, 2000). Poucas doenças causam tanto temor quanto o câncer, pois apesar de existirem fatores carcinogênicos que desencadeiam o processo, com freqüência o câncer parece surgir ao acaso. No organismo normal, o ciclo de proliferação celular é rigorosamente controlado para que as células constituam comunidades organizadas. No entanto, as células cancerígenas não se submetem a esse esquema de cooperação, são células com o DNA danificado que escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular (LOPES et al., 2002). Elas se dividem de forma descontrolada, de modo que muitas das terapias anticâncer são estratégias para debelar rapidamente células em divisão. Como consequência, muitas células normais, que também estão em divisão, são prejudicadas pelos efeitos colaterais (KREUZER e MASSEY, 2002).

Via de regra, todo aumento de tecido mamário deve ser avaliado considerando uma possível neoplasia. Aumentos generalizados, que não estejam relacionados com pseudociese, lactação ou mastite, devem receber atenção especial. De forma semelhante, tumores de origem diversa daquele do tecido mamário podem aparecer na região das glândulas mamárias, sendo de grande importância, pois diferentes tratamentos podem ser indicados (ZUCCARI et al., 2001a).

Os estudos sobre alterações mamárias vem crescendo em relação aos estudos de outras afecções, e as técnicas de biologia molecular vêm favorecendo o aprofundamento dos conhecimentos genéticos, conduzindo a diagnósticos precoces e precisos (FARAH,

2000; ZUCCARI, et al., 2001a). A biopatologia dos tumores mamários caninos, interessa à comunidade científica em geral pelo fato destes tumores terem sido propostos como modelo comparativo para o estudo do câncer de mama da mulher. Em ambas as espécies, o sexo feminino é mais afetado, tendo-se observado, no tipo histológico adenocarcinoma, semelhanças histológicas e comportamentais notórias (QUEIROGA e LOPES, 2002).

Uma estratégia que tem permitido avançar no conhecimento dos diferentes aspectos da carcinogênese mamária comparada tem sido a utilização de modelos animais, buscando maior entendimento dos fatores responsáveis pela doença no homem e a expectativa de que estes possam ser identificados, eliminados ou controlados. O estudo dos tumores mais freqüentes em animais pode fornecer dados epidemiológicos e indicações para a melhor compreensão de sua etiologia, bem como material para investigação biológica e terapêutica (CASSALI, 2000).

Qualquer processo que se repete inúmeras vezes é passível de erro. Embora o DNA duplique sua molécula com precisão, com milhões de divisões celulares que acontecem ao longo da vida de um organismo, os erros podem ocorrer. Existe dentro da célula um sistema de controle de qualidade, que tende a reparar os erros que acontecem na cópia da informação genética, chamado de sistema de reparo do DNA, porém, algum defeito pode, eventualmente escapar, provocando mutação (FARAH, 2000). O gene p53 faz parte deste sistema e tem sido um dos mais importantes alvos das mutações (MOURA-GALLO et al., 2004).

O estudo dos mecanismos moleculares, por meio de técnicas como hibridação do DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e a produção de anticorpos monoclonais identificaram, isolaram e caracterizaram genes e produtos de genes clinicamente importantes. Porém, o maior uso destes conhecimentos estão direcionados aos seres

humanos, desta forma à medida que novos métodos diagnósticos e terapêuticos estiverem disponíveis na Medicina Veterinária, a compreensão mais abrangente com relação à biologia da neoplasia, permitirá ao Médico Veterinário o tratamento mais efetivo para os animais, podendo levar a respostas no campo da Medicina Humana (RICHARDSON et al., 1997).

Com o objetivo de identificar a frequência e os tipos de mutações no gene p53 em cadelas com câncer de mama, foram estudadas as seqüências dos nucleotídeos em 7 exons do gene p53. Foram analisadas as possíveis associações entre a presença de tumores de mama e fatores de risco clássicos como idade, ocorrência de pseudogestação e uso de hormônios contraceptivos. E ainda, a associação entre a presença de mutações no p53 e os tipos de tumores malignos e glândulas mamárias macroscopicamente e microscopicamente normais laterais aos tumores.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

A cada ano, cresce o número de pessoas e de animais domésticos acometidos por algum tipo de neoplasia. A etiologia da neoplasia da glândula mamária em cadelas é desconhecida, mas há indícios de que múltiplos fatores influenciam o micro ambiente das células susceptíveis do tecido mamário causando o câncer (MORRISON, 1998). O estilo de vida da sociedade moderna contribui para aumentar a exposição da população a alguns fatores ambientais, nutricionais, químicos e hormonais potencialmente carcinogênicos. É claro que a interferência do homem nos hábitos alimentares dos animais e no seu ambiente também o coloca sob o mesmo risco. Talvez essa seja uma das explicações pela qual a frequência de algumas neoplasias tem aumentado no homem e nos animais domésticos (MOULTON, 1990).

### **2.1 A glândula mamária**

As glândulas mamárias são glândulas cutâneas, especificamente sudoríparas modificadas (CASSALI, 2003) que se desenvolvem lentamente a partir do ectoderma cutâneo do embrião. Na vida intra-uterina, formam-se espessamentos paralelos e lineares de ectoderma cutâneo, são as linhas mamárias, que se estendem de ambos os lados desde a axila até a região inguinal da parede abdominal ventral. A continuidade da crista que se forma rompe-se no número apropriado de botões mamários que darão origem à parte funcional da glândula mamária (REECE, 1996; CUNNINGHAM, 2004). O mesênquima dérmico, que envolve os condutos, se diferencia em tecido conjuntivo frouxo, que circunda os condutos e suas ramificações, e em tecido conjuntivo denso, que forma os tabiques entre os primórdios de conduto e divide a glândula em lobos (KOLB, 1984; GENESER, 2000; HENSON, 2003).

O desenvolvimento da glândula mamária na vida pós-fetal sofre modificações aparentes a partir do primeiro ciclo estral pela influência do estrógeno que promove o desenvolvimento do sistema ductal e discreto aumento das células adiposas,

observando-se um aumento discreto no volume da glândula, o que acontece, sobretudo nas mamas abdominais caudais e inguinais. O desenvolvimento de alvéolos a partir das extremidades terminais dos ductos requer o aumento de progesterona e prolactina na metade da gestação ou pseudogestação, quando atingem sua maturação morfológica e atividade funcional completa (CUNNINGHAM, 2004; ZUCCARI et al. 2001b; CASSALI, 2003; OLIVEIRA et al., 2003).

As mamas apresentam dois tipos celulares em sua estrutura, as células epiteliais luminiais, que sintetizam e excretam proteínas lácteas e lipídios durante a lactação, e as células epiteliais basais ou mioepiteliais, que se contraem, sob a influência de ocitocina, expelindo o leite dos ductos. Ambos os tipos celulares são derivados de uma única população celular ou células tronco. Além do tecido epitelial, ainda há a presença de fibroblastos e células adiposas que compõem e fazem a sustentação do tecido mamário. O tecido subcutâneo da parede ventral do abdome contém as mamas torácicas, abdominais e inguinais e os vasos e nervos que as suprem (HOWARD e DELAHUNTA, 2001).

Na fêmea canina, os vasos epigástricos craniais superficiais são vistos subcutaneamente, junto a papila mamária abdominal cranial. A artéria epigástrica superficial caudal segue cranialmente à superfície profunda da mama inguinal e fornece os ramos mamários. A artéria prossegue para suprir a mama abdominal caudal e fazer anastomose com ramos da artéria epigástrica superficial cranial. Os linfonodos inguinais superficiais ficam adjacentes aos vasos epigástricos superficiais caudais e craniais, drenando as mamas e a parede ventral do abdome, cranialmente até o umbigo (Fig.1) (HOWARD e DELAHUNTA, 2001).

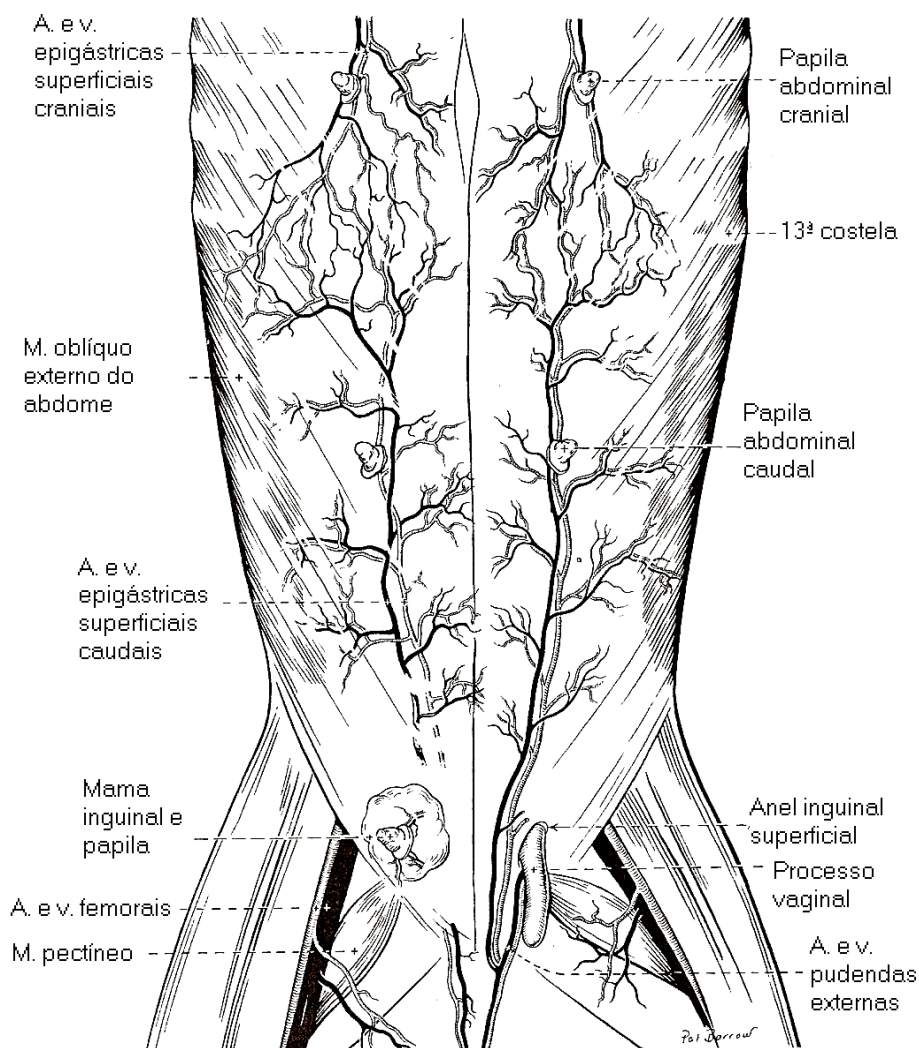


Figura 1 – Veias e artérias superficiais do abdome canino.  
 Fonte: HOWARD e DELAHUNTA, 2001.

## 2.2 Neoplasias das glândulas mamárias

As neoplasias da mama canina se originam de células de revestimento epitelial, ductal ou alveolar, de células mioepiteliais periféricas e do tecido conectivo intersticial (CARRUIDO et al., 2003). As que se originam de células epiteliais são denominadas de carcinomas e aquelas com origem no tecido conjuntivo ou muscular são denominadas sarcomas (ALBERTS et al., 1997). Nas cadelas, devido à elevada incidência de tumores de mama, o estudo desta patologia vem crescendo, pela importância dos cães como animal de companhia e também por representar um modelo experimental de grande



valor e viabilidade técnica nas pesquisas do câncer humano, devido às similaridades histológicas entre os tumores, além da facilidade na realização das mastectomias parciais ou totais dos segmentos mamários (LUIZ et al., 2002), por não haver limitações estéticas, facilitando a retirada de glândulas macroscopicamente normais, fundamentais para um estudo mais aprofundado.

De todos os fatores envolvidos no aparecimento do câncer, o componente de natureza hormonal tem sido o mais aceito, devido às diferenças na incidência de tumores mamários entre cadelas castradas e não castradas (MIALOT, 1988; DONNAY et al., 1996; SOARES e SILVA, 1998; ZUCCARI et al., 2001b; FOSSUM et al., 2002). Quando a ovariectomia foi realizada antes do primeiro ciclo estral, o risco de ocorrer câncer mamário foi de aproximadamente 0,5%; naquelas em que a castração foi realizada após o primeiro ciclo estral, o risco foi de 8%, e após dois ou mais ciclos estrais o risco foi de 26%. Em animais castrados após 2,5 anos de idade o efeito profilático para o câncer mamário, foi mínimo, tendo em vista que nesta idade as glândulas mamárias já se desenvolveram plenamente (MIALOT, 1988; SOARES e SILVA, 1998; ZUCCARI et al., 2001b; FOSSUM et al., 2002; QUEIROGA et al., 2005).

O rápido desenvolvimento das glândulas mamárias durante a puberdade, pode contribuir para a formação de clones de células alteradas que se tornam nódulos hiperplásicos. Tais nódulos, que têm entre 1 e 4 mm de diâmetro e não são detectáveis clinicamente podem, sob ação de fatores carcinogênicos, sofrer transformação neoplásica demonstrando que o estrógeno tem um papel indireto no desenvolvimento tumoral. Ele induz à proliferação do epitélio ductal das glândulas mamárias e, desta forma, propicia as condições necessárias para que mutações genéticas ocorram, nas

diferentes fases do ciclo celular (NETO, 1992; NETO, 1997; O'KEEFE, 1997; PÉREZ et al. 2001; ZUCCARI et al., 2001b).

A atividade normal da célula depende da perfeita integração entre as várias vias metabólicas. Grande parte desse metabolismo é controlada pelos hormônios, lançados no sangue até os órgãos alvos. Como as necessidades de um determinado hormônio variam continuamente, torna-se necessário que suas concentrações estejam sujeitas à regulação (GUYTON, 1997). Quando há descontrole da secreção hormonal, ocorre perda da homeostasia celular resultando em várias alterações, dentre elas o câncer. Os hormônios estão dentre os vários fatores indutores ou promotores da carcinogênese e sejam endógenos ou exógenos, eles estimulam a proliferação celular predispondo aos erros do DNA na divisão celular (HENDERSON e FEIGELSON, 2000).

Neoplasias de caráter maligno são as mais importantes em cadelas não castradas, uma vez que elas são as mais freqüentes e normalmente produzem metástases em outros órgãos. Na cadela existem cinco pares de glândulas mamárias localizadas ao longo da parte ventral do tórax e abdome (ARGYLE, 1998). A ocorrência das neoplasias das glândulas mamárias como nódulos de formas múltiplas do mesmo ou de diferentes tipos, em uma ou mais glândulas deve-se à existência de conexões linfáticas variáveis entre as glândulas adjacentes lateral, cranial ou caudal (MORRISON, 1998).

A formação vascular da região mamária é de extrema importância no estudo dos tumores mamários, pela relação direta entre seus componentes e o prognóstico da lesão (BANKS, 1992; ZUCCARI et al. 2001b). No entanto, os tumores mamários malignos apresentam maior vascularização em relação aos tumores benignos, apresentando uma proliferação vascular maior em animais com média de 9 anos, em relação aos animais mais jovens (CASSALI, 2000).

Os tumores correspondem a um grande agregado de células cancerosas descendentes de uma única célula ou clone “fundador”. O ancestral é uma célula de funcionamento normal, que por alguma circunstância desencadeou alterações fundamentais, iniciando divisão e proliferação autonomamente, sem haver resposta aos estímulos externos fundamentais para a ocorrência do crescimento celular. Estes mutantes dividem-se rapidamente, gerando bilhões de células alteradas, constituintes da massa tumoral, extremamente agressivas invadindo tecidos e órgãos, podendo espalhar-se por metástase para todo o organismo (RICHARDSON et al., 1997; PERERA e WEINSTEIN, 2000).

Além dos agentes carcinogênicos, o surgimento de tumores pode ocorrer como consequência do acúmulo de alterações genéticas que interferem no controle normal do crescimento e diferenciação celular; pela transformação de uma célula maligna através de múltiplas etapas, chamada de progressão tumoral, que envolve a ocorrência de mutações, em diferentes fases do ciclo celular (DOBSON, 2001); ou ativação anormal dos genes que controlam o crescimento celular (LOURO, 2000), resultando em modificações progressivas da biologia celular caracterizadas por alterações na proliferação, diferenciação e na interação das células com o meio extracelular (COTRAN et al., 2000).

### **2.3 O ciclo celular**

O DNA é constituído de duas cadeias de nucleotídeos que se enrolam originando a dupla hélice e se dispõem de modo antiparalelo, ou seja, direção 5’ para 3’ e a complementar no sentido 3’ para 5’. Ambas as cadeias são mantidas juntas através de fracas ligações químicas, as ligações de hidrogênio, que ocorrem entre as bases nitrogenadas de cadeias diferentes, adenina (A) sempre se liga a uma timina (T),

enquanto uma citosina (C) sempre aparece ligada a uma guanina (G) (Fig.2) (FARAH, 2000).

Para compor o uma proteína, todos os aminoácidos são codificados por uma combinação de três bases do DNA, formando um tríplex chamado códon, podendo um aminoácido ser definido por mais de um códon. Um gene é um segmento de DNA que contém a informação completa da seqüência de aminoácidos para sintetizar uma cadeia polipeptídica específica. Uma seqüência do DNA com a mensagem para a síntese de uma cadeia polipeptídica é, geralmente, interrompida por porções que não têm função codificante e, portanto, não aparecem representadas na proteína. Tais porções são os íntrons que são removidas quando o transcrito primário é processado, para dar origem ao RNA maduro. As regiões com informações codificadas são os exons, cujas seqüências estão representadas no RNA maduro e, portanto, um gene começa e termina com exons (FARAH, 2000; LEWIN, 2001).

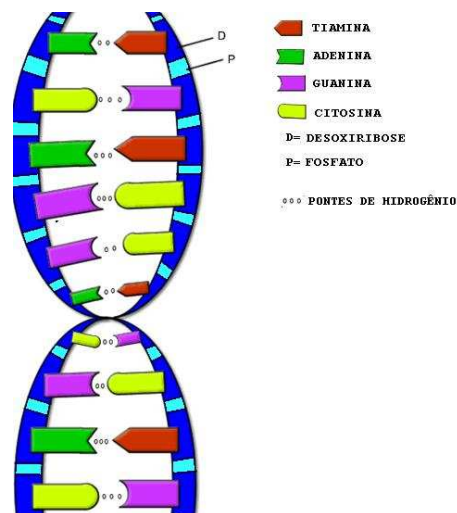


Figura 2 – Representação esquemática da dupla hélice do DNA e suas bases nucleotídeas. Fonte: [www.biologycorner.com](http://www.biologycorner.com)

A progressão tumoral parece envolver a ativação de vários oncogenes, que codificam proteínas promovendo a perda do controle sobre o ciclo mitótico e levando as células a se tornarem cancerosas, e a inativação de genes supressores de tumor, que são recessivos, isto é, o efeito cancerígeno só aparece quando eles estão ausentes ou são defeituosos nos dois cromossomos do genoma. Cada uma dessas alterações representa um passo adicional em direção à plena malignidade, ocorrendo frequentemente por muitos anos antes que se inicie uma transformação neoplásica (DAL BELLO et al. 2002; DOBSON, 2001; LERA et al. 2006; LEE e KWEON, 2002).

O ciclo celular compreende a alternância da mitose e interfase. A mitose é o processo pelo qual as células eucarióticas dividem seus cromossomos entre duas células filhas, que dura, em média, 90 a 120 minutos e é dividido em quatro etapas; prófase, metáfase, anáfase e telófase (ALBERTS et al., 1997).

Na prófase, os cromossomos, que foram duplicados durante a fase S da interfase, se condensam. Os microtúbulos citoplasmáticos são desarranjados e a célula se prepara para a reorganização destes microtúbulos formando o fuso mitótico. O cromossomo mitótico consiste em duas cromátides que estão conectadas por uma região denominada de centrômero, na superfície deste centrômero existem dois cinetócoros, um deles está associado à cromátide e o outro ao fuso mitótico, resultando na movimentação cromossomal, seguindo para a metáfase (THOMPSON, 1993; ALBERTS et al., 1997; FARAH, 2000; LEWIN, 2001).

Durante a metáfase alguns dos microtúbulos que formam os aparatos do fuso se prendem aos cinetócoros formando o fuso mitótico. A partir daí os cromossomos iniciam uma série de movimentos que resultam num alinhamento de todos os cromossomos na região equatorial do fuso, dando início à preparação da anáfase (THOMPSON, 1993; ALBERTS et al. 1997; FARAH, 2000; LEWIN, 2001).

A anáfase caracteriza-se pelo momento onde as cromátides iniciam a migração para cada pólo da célula, em direção aos centríolos, provocando a separação das cromátides irmãs. Acredita-se que a força que movimenta as cromátides tem origem através da polimerização de proteínas dos microtúbulos, actina, miosina e tubulina (THOMPSON, 1993; ALBERTS et al. 1997; FARAH, 2000; LEWIN, 2001).

Durante a telófase, ocorre a separação completa das cromátides irmãs para cada pólo da célula, havendo com isto a reconstituição do envelope nuclear ao redor dos cromossomos, descondensação dos cromossomos, dissolução do aparato mitótico, formação de uma constrição ao nível da zona equatorial da célula-mãe, que vai progredindo e termina por dividir o citoplasma e suas organelas em duas partes iguais. Neste ponto a célula termina a fase de divisão celular (mitose) e entra na fase de replicação do DNA (interfase) iniciando um novo ciclo (THOMPSON, 1993; ALBERTS et al. 1997; FARAH, 2000; LEWIN, 2001).

Na interfase, não são visualizadas modificações tanto no citoplasma quanto no núcleo. As células, porém, encontram-se em plena atividade, sintetizando os componentes que irão constituir as células filhas. Esta fase é composta pela sucessão de três fases;  $G_1$  que corresponde ao intervalo de tempo entre o final da mitose, durante o qual RNAs e proteínas são sintetizadas, sem que haja replicação de DNA; fase S de síntese de DNA, onde o conteúdo total de DNA aumenta de um valor diplóide de  $2n$ , para o valor completo de replicação  $4n$ ; e fase  $G_2$  que correlaciona-se com o intervalo de tempo entre o final da fase S e o início da mitose (THOMPSON, 1993; ALBERTS, 1997; FARAH, 2000; LEWIN, 2001).

## 2.4 A proteína p53

O gene *p53*, considerado como o “guardião do genoma”, dentre todos aqueles reconhecidamente envolvidos nos processos de carcinogênese, é o de maior importância. Conhecer seus mecanismos de ação representa uma etapa fundamental para compreender os aspectos da biologia molecular relacionados ao câncer. O gene é ativado em resposta a sinais de dano celular, tornando-se mais presente nas células (FETT-CONTE E SALLES, 2002).

Este gene codifica uma fosfoproteína de 53kDa, tetramérica, ou seja, com quatro subunidades básicas idênticas que se juntam, constituindo a forma funcionalmente ativa da molécula que se liga especificamente ao DNA e age como fator de transcrição (HUNTER, 1993; MIYASHITA et al., 1994). Cada unidade básica da proteína p53 é formada por quatro domínios que representam unidades funcionais distintas, o primeiro segmento (região amino terminal) é composto por 80 aminoácidos, estando relacionado com a capacidade de transativação de outros genes; o segundo domínio (localizado entre os aminoácidos 100 e 300) representa a parte central, sendo responsável pela capacidade de ligação com a molécula de DNA (Fig. 3) e na porção carboxi-terminal, localizam-se os sítios de dimerização e a região de tetramerização das quatro unidades básicas da molécula p53 (CAVALCANTI JÚNIOR et al., 2002).

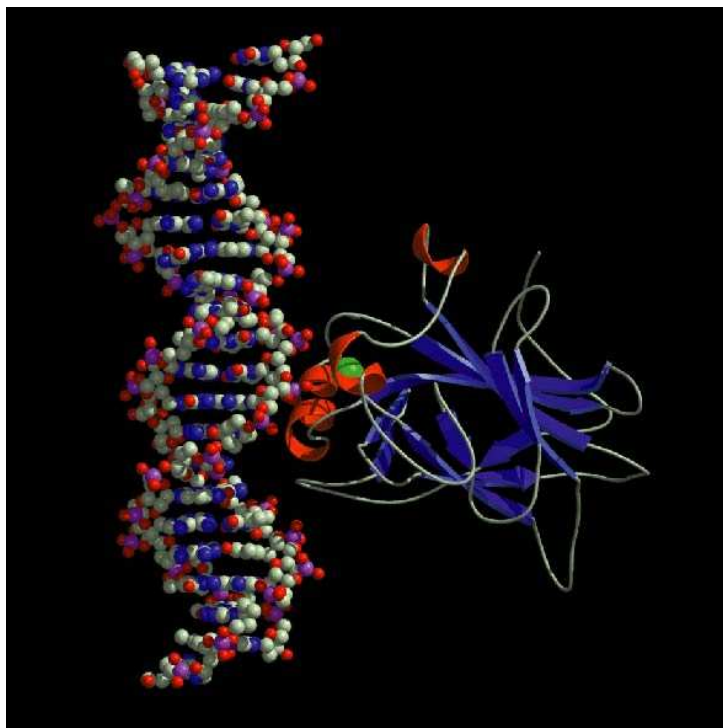


FIGURA 3- Moléculas de DNA e da proteína p53 demonstrando os pontos de ligação entre os amino-ácidos e a cadeia de DNA.

Fonte: [ads.u-strasbg.fr/forum2005/img/p53.jpg](http://ads.u-strasbg.fr/forum2005/img/p53.jpg)

### **2.5 Atividade da proteína p53**

Dois tipos de eventos podem ser desencadeados pela atividade de p53; a interrupção da multiplicação ou apoptose, os quais dependem, em parte, do estágio do ciclo celular que foi atingido. Em células no início de G1, a proteína p53 desencadeia um ponto de checagem que bloqueia a progressão do ciclo celular, isto permite que o DNA danificado seja reparado antes que a célula tente entrar na fase S. Porém, se uma célula já está comprometida com a divisão, esta proteína p53 desencadeia um programa de morte celular. Os resultados típicos desta apoptose são o colapso de célula em uma pequena massa heteropicnótica e a fragmentação do DNA nuclear (LEWIN, 2001; MUTO et al., 2000; LEE e KWEON, 2002; FARIAS et al., 2005).

O crescimento tumoral está relacionado a um balanço entre proliferação e morte celular. A medida combinada de morte celular e proliferação é uma importante arma na predição mais realista do comportamento tumoral. Estudos recentes demonstram a



relevância da morte celular programada na homeostase tecidual, na organogênese e na patogênese dos tumores. A apoptose depende de processos bioquimicamente regulados, contingenciados por eventos de estimulação do meio ambiente tecidual. Do ponto de vista morfológico, podemos observar, a partir da clivagem do DNA pelas endonucleases, alterações como picnose, fragmentação nuclear e proteólise do citoesqueleto. Os detalhes da regulação da apoptose por oncogenes e genes supressores ainda não são totalmente entendidos, embora saiba-se da participação do gene *p53* (FARIAS et al., 2005). Um grande aumento da quantidade desta proteína foi observado em muitas células transformadas ou em linhagens derivadas de tumores.

## **2.6 Mutações no gene p53**

O gene pode ser considerado um alvo das mutações e alterações em qualquer parte dele podem abolir a sua função, entretanto, alguns sítios sofrerão um número maior de mutações, chamadas “sítios quentes”, sendo, portanto alvo de estudo para a cancerologia (LEWIN, 2001).

Dentre os genes envolvidos nas etapas de desenvolvimento do câncer de mama, o *p53* é o gene que se apresenta mais mutado nesta doença (LERA et al., 2006; MOURA-GALLO et al., 2004).

As mutações no gene *p53* ocorrem principalmente nos exons 3 a 8 (KRAEGEL, et al. 1995), entre os exons 4 e 7 (CHU et al., 1998) e 5 e 8 (HAGA, 2001), determinando a perda do controle do ciclo celular e, como consequência, a sobrevivência das células com alto grau de mutações (YORIKO et al., 2000). No desenvolvimento de tumores na espécie canina, a inativação da forma não mutante do gene *p53* ocorre por uma série de mecanismos, incluindo as aberrações cromossômicas

estruturais como deleção e translocação (KRAEGEL, et al. 1995; SETOYUCHI, et al. 2001).

As mutações em p53 acumulam-se em muitos tipos de cânceres, provavelmente porque a perda de p53 confere uma vantagem multiplicativa às células (MUTO et al., 2000; LEWIN, 2001). A diversidade dos cânceres sugere que p53 não está envolvida em um evento tecido-específico, mas sim em algum controle geral e bastante comum da proliferação celular; e a perda deste controle pode ser um evento secundário que ocorre para contribuir com a multiplicação celular em muitos tumores. As células com p53 mutante também possuem uma maior propensão a amplificar DNA, o que provavelmente reflete a função p53 na instabilidade característica do genoma que é encontrada em células cancerosas (LEWIN, 2001).

Outra classe de genes que fazem parte do material genético, envolvidos na indução e regulação do crescimento e da divisão celular são os pro-oncogene, as formas mutantes são os oncogenes. As mutações em oncogenes que levam ao câncer são diferentes das mutações em genes supressores de tumor, pois nos oncogenes, as mutações precisam ativar a proteína para promover o crescimento inadequado. Para os genes supressores de tumor, entretanto, é necessária a perda da função da proteína para promover o desenvolvimento do câncer. Nas pesquisas com cânceres humanos, observou-se que mutações do p53 estão presentes em mais formas diferentes de câncer que qualquer outra alteração genética, aproximadamente 50% de todos os cânceres (YORIKO et al., 2000; KREUZER e MASSEY, 2002).

Assim, a pesquisa das alterações genéticas e sua associação com vários fatores podem levar à compreensão dos mecanismos envolvidos na etiologia desta doença, assim como auxiliar no diagnóstico e tratamento. Mutações no gene p53, localizado no cromossomo 17, estão presentes nos cânceres humanos e caninos, tornando este gene o

alvo mais comum de alterações genéticas no processo neoplásico. Além disso, a homologia entre o gene p53 humano e canino é de 81% (CHU et al.,1998; VELDHOEN e MILNER, 1998)

As mutações podem ser silenciosas, não apresentando efeito discernível na célula ou organismo, ou resultarem em alterações estruturais e/ou funcionais no gene e/ou seu produto protéico (WALKER e RAPLEY, 1999; FARAH, 2000). Todos os tipos de mutações, especialmente aquelas ocorrendo nas extensas seqüências intrônicas não codificantes ou extragênicas de DNA, podem ser silenciosas. Algumas mutações pontuais no interior de regiões codificantes podem ser também silenciosas, devido à degeneração do código genético. Este é especialmente o caso para aquelas que afetam a terceira base de um códon, pois isto não produz, frequentemente, uma alteração na ordem de aminoácidos codificada pelo gene. Portanto, tais mutações são evidenciadas no nível dos nucleotídeos mas, indetectáveis no nível da proteína, pois muitos aminoácidos são codificados por mais de um códon (WALKER e RAPLEY, 1999; KREUZER e MASSEY, 2002).

Todos os tipos de mutações ocorrendo tanto em seqüências codificantes como não-codificantes de DNA, podem afetar o funcionamento de um gene e sua proteína codificada. Mutações pontuais na porção codificante de um gene podem criar um códon prematuro de parada, resultando na expressão de um polipeptídeo truncado e em um fenótipo mutante e neste caso a mutação é denominada *nonsense*. Por outro lado, mutações em regiões não-codificantes podem alterar uma seqüência regulatória funcional, como um promotor ou sinal de iniciação, levando a um aumento ou diminuição da expressão gênica. Inserções e deleções em regiões codificantes e envolvendo múltiplos de três nucleotídeos, podem também resultar na produção de polipeptídeos com comprimentos incorretos. Entretanto, deleções ou inserções não

envolvendo múltiplos de três nucleotídeos, resultarão em uma mutação com deslocamento do quadro de leitura. Isto altera efetivamente o código, impedindo a expressão de uma proteína funcional. Tanto inserções como deleções podem também afetar a expressão de determinado gene, se alterarem seqüências regulatórias associadas ao gene (WALKER e RAPLEY, 1999; KREUZER e MASSEY, 2002).

Em células normais, a proteína p53 é sintetizada continuamente, mas não se acumula em níveis significativos, sendo degradada pela célula em 2-15 minutos (HUNTER, 1993; MIYASHITA et al., 1994). No entanto, quando as células são expostas a agentes que danificam o DNA, a proteína se torna estável e passa a controlar diversos genes que são seus alvos, impedindo a progressão do ciclo, o que permite reparar os danos nas células ou disparar o processo de morte destas por apoptose (FARIAS et al., 2005). A inativação do p53 pode ocorrer por vários mecanismos, incluindo as deleções, translocações e mutações (KRAEGEL et al., 1995). As mutações em p53 encontradas nos mais diversos tumores malignos analisados, são pontuais e estão majoritariamente localizadas na região da molécula altamente conservada, que corresponde ao domínio de ligação da proteína com o DNA (HAINAUT e HOLLSTEIN, 2000). Anormalidades no gene p53 são as alterações moleculares mais freqüentes encontradas nos diversos tipos de neoplasias. Tem-se demonstrado que a maioria das mutações missenses do gene p53 causa alterações na conformação da sua proteína, prolongando a sua meia-vida e podendo acumular-se no núcleo das células neoplásicas (BEGNAMI et al., 2005).

A análise de mutações encontradas no gene p53 tem sido muito valorizada em estudos de epidemiologia molecular de câncer (PERERA e WEINSTEIN, 2000). Recentemente, Hill e Sommer (2002) consideraram esta análise como um possível teste mutagênico para o câncer de mama. Mutações deste gene têm sido também associadas

com outros tipos de tumores de baço (KRAEGEL et al., 1995) e tumores ósseos (LOUKOPOULOS et al., 2003), ambos são tumores bastante agressivos, com taxas de sobrevivência muito baixas, tornando interessante a possível utilização da análise de mutações em p53 para auxiliar no prognóstico dos diversos tumores em fases iniciais com maior possibilidade de serem tratados com sucesso (MOURA-GALLO et al., 2004).

Apesar da aparência dos fenótipos mutantes ter sido originalmente utilizada para detectar mutações, a identificação da maioria das formas de mutações, particularmente de mutações silenciosas, requer abordagens alternativas. Técnicas mais sensíveis e sofisticadas são necessárias para a detecção das formas mais comuns de mutações em pequena escala. Incluindo a reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) e o sequenciamento de nucleotídeos (WALKER e RAPLEY, 1999).

A PCR caracteriza-se pela amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, visando a produção de milhões de cópias desta sequência em um tubo de ensaio. Essa técnica foi descrita por Kary Mullis no final dos anos 80 e tem revolucionado a genética molecular, pois possibilita uma nova estratégia na análise de genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de sequências específicas (FARAH, 2000).

A PCR explora a capacidade de duplicação do DNA. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da enzima DNA-polimerase, capaz de adicionar corretamente os nucleotídeos complementares à fita molde adicionados na reação. A DNA-polimerase requer, entretanto, um ponto de iniciação, ligado à fita molde que servirá de apoio para que os nucleotídeos subsequentes sejam adicionados. Esse ponto de início da síntese é fornecido por um oligonucleotídeo iniciador que se hibridiza à fita molde simples. A fita

simples serve de fita molde para a síntese, desde que se forneça oligonucleotídeos iniciadores específicos a cada fita molde diferente. Dessa forma, a região do DNA a ser sintetizada é definida pelo desenho do oligonucleotídeo iniciador, que se anela especificamente às suas seqüências complementares na fita molde, delimitando o fragmento de DNA que se deseja amplificar (FARAH, 2000).

A biologia molecular, em particular, tornou-se integrada a muitos aspectos da oncologia e este reconhecimento está conduzindo aos avanços no diagnóstico e tratamento do câncer nos mamíferos (BHARAJ, et al., 1998; CAIRNS, 2000). A caracterização molecular permite estimar parâmetros de grande importância para compreender a estrutura genética e com isso direcionar estratégias de novos métodos de diagnóstico e terapêutico através do uso de marcadores moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridização do DNA e a produção de anticorpos monoclonais.

As novas técnicas de imuno-histoquímica e biologia molecular possibilitarão a identificação de marcadores tumorais, aumentando assim, a capacidade de se detectar células neoplásicas em uma etapa mais precoce da doença, conduzindo ao sucesso final de terapias do câncer, muitas das quais tornar-se-ão efetivas ao máximo se instituídas na etapa do desenvolvimento tumoral, como antes da formação de metástase (DOBSON, 2001).

# **Artigo 1**

# **CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS E SUA RELAÇÃO COM FATORES DE RISCO EM CADELAS NA CIDADE DO RECIFE-PE, BRASIL.**

HISTOPATHOLOGIC CHARACTERIZATION OF CANINE MAMMARY TUMORS AND ITS RELATIONSHIP WITH RISK FACTORS IN THE RECIFE- PE- BRAZIL

**Souza, D.M.B.<sup>1</sup>; Silva, J.S.C.<sup>2</sup>; Silva, V. R.<sup>3</sup>; Barros, M.G.O.<sup>2</sup>; Coletto, Z.F<sup>1</sup>.; Pereira, M. F.<sup>4</sup>; Santos, F.L.<sup>4</sup>; Adrião, M.<sup>5</sup> ; Wischral, A.<sup>4</sup>**

## **RESUMO**

Os tumores mamários em cadelas tem alta incidência e malignidade sendo provocados por vários fatores de risco incluindo idade, atividade hormonal, nutrição, vírus, pseudogestação e administração de progestágenos exógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência dos tipos de tumores mamários em cadelas e sua relação com idade, pseudogestação e o uso de progestágenos. Utilizou-se 50 cadelas com tumor de mama, submetidas à exereses da mama e 11 cadelas normais que foram submetidas a ovariosalpingohisterectomia eletiva no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram colhidas amostras dos tumores e das mamas clinicamente normais para análise histopatológica segundo as técnicas rotineiras. Os animais foram de raças variadas tendo idade entre 4 e 19 anos para as cadelas com tumor e entre 7 meses e 6 anos para as cadelas normais, sendo que a faixa etária entre 9 e 13 anos foi a que apresentou a maior frequência de neoplasias (48%). Das 50 alterações mamárias, 68% foram carcinosarcomas, 24% foram carcinomas, 2% tumor misto benigno, 2% hemorrágicas, 2% fibroses e 2% foram processos inflamatórios inespecíficos. Não houve diferença na relação entre os fatores de risco e a ocorrência de tumores nas cadelas. Das mamas laterais aos tumores, apenas 36% foram normais, 48% apresentavam carcinoma, 6% carcinosarcomas, 2% hiperplasia, 2% fibrose e em 6% o material não foi suficiente para garantir o diagnóstico. Conclui-se que nos animais estudados não houve interferência dos fatores pseudogestação e uso de anticoncepcionais no surgimento dos tumores, mas que a idade é um fator relevante,

---

<sup>1</sup> Médica Veterinária, MSc, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária – Universidade Federal Rural de Pernambuco/ UFRPE. E-mail: daniela.bastos@oi.com.br

<sup>2</sup> Graduando em Medicina Veterinária, Bolsista Pibic/CNPq

<sup>3</sup> Médico Veterinário, UFRPE

<sup>4</sup> Professor, Depto de Medicina Veterinária da UFRPE

<sup>5</sup> Professor, Depto de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Apoio financeiro: CNPq, FACEPE



sendo, entretanto, a idade avançada considerada um fator de risco elevado. Considerando a alta frequência de tumores nas mamas laterais às neoplásicas, sugere-se a retirada de toda a cadeia mamária do lado acometido.

Palavras chave: cadela, câncer, mama, patologia

## **ABSTRACT**

The canine mammary tumors has high incidence and malignancy being provoked by several risk factors including age, hormonal activity, nutrition, virus, pseudopregnancy and exogenous progestagen. In this work the goal was to characterize the canine mammary tumors, evaluate the implication of the adjacent mamma and the risk factors involvement on the occurrence of the tumors. They were used 50 bitches with mamma tumor diagnosis and submitted to mastectomy of the mamma and 11 normal bitches that were submitted for elective ovariosalpingohysterectomy in Hospital Veterinary of UFRPE. They were picked biopsies of the tumors and of the normal mammas for histopathologic analysis according to the routine techniques. The animals went of varied races having age comprehended between 4 and 19 years for the bitches with tumor and between 7 months and 6 years for the normal bitches, and the ages between 9 and 13 years were to what it presented the biggest neoplastic frequency (48%). Of the 50 tumors, 68% were carcinosarcoms, 24% were carcinomas, 2% benign mixed tumor, 2% hemorrhagic, 2% fibrosises and 2% were inflammatory processes. The relation of the tumors with the risk factors did not are demonstrate when compared between the malignant tumors and between the normal bitches and the tumor carriers. Of the adjacent mammas, just 36% were normal, 48% presented carcinoma, 6% carcinosarcoms, 2% hiperplasy, 2% fibrosis and in 6% the material was not enough to guarantee the diagnosis. It concludes that in these animals there was no interference of the factors pseudopregnancy and contraceptives use in the appearance of the tumors, but that the age is an important factor, being the more seniorest susceptible. Considering the tumors high frequency in the adjacent mammas to tumour mammas, it suggests the withdrawal of all the mammary chain of the attacked side.

Key words: bitch, cancer, breast, pathology

## INTRODUÇÃO

O câncer, principal problema mundial de saúde, é uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade em humanos, e deriva de proliferação descontrolada e propagada de clones de células transformadas. O crescimento de um tumor maligno é determinado em grande parte pela capacidade proliferativa das células tumorais e pela capacidade de invadirem os tecidos do hospedeiro e por produzir metástase em sítios distantes. Além disso, admite-se que os tumores malignos são capazes de superar os mecanismos de defesa do hospedeiro (ABBAS et al., 2002).

O surgimento de tumores pode ocorrer como consequência do acúmulo de alterações genéticas que interferem no controle normal do crescimento e diferenciação celular, pela transformação de uma célula normal em célula tumoral através de múltiplas etapas, chamada de progressão tumoral, que envolve a ocorrência de mutações, em diferentes fases do ciclo celular (DOBSON, 2001) e, dentre os genes envolvidos nas etapas de desenvolvimento do câncer de mama, o p53 é o gene que se apresenta mais mutado nesta doença (MOURA-GALLO et al., 2004).

Os estudos relativos a esta lesão vêm se intensificando devido a vários fatores, dentre os quais: a alta incidência em cães e sua malignidade, com cerca de 50% dos tumores considerados malignos, diminuindo a qualidade e tempo de vida (HELLMÉN, 2005), e a possibilidade de representar um modelo experimental de grande valor e viabilidade técnica nas pesquisa de câncer humano. A similaridade histológica entre os tumores em caninos e humanos e a facilidade na realização das mastectomias parciais ou totais dos segmentos mamários (LUIZ et al., 2002), facilitando a retirada de glândulas macroscopicamente normais, fundamental para um estudo mais aprofundado, justificam estas tentativas de comparação.

Todo aumento de tecido mamário deve ser avaliado considerando uma possível ocorrência de neoplasia. Aumentos de volume generalizados que não estejam relacionados a pseudociese, lactação ou mastite devem receber atenção especial (ZUCCARI et al., 2001b).

Dentre as principais neoplasias observadas em cadelas, os tumores mamários são os mais frequentes, representando mais de 50% de todos os tumores das fêmeas da espécie canina (ITOH et al., 2005; KARAYANNOPOULOU et al., 2005; QUEIROGA et al., 2005), sendo a incidência três vezes maior do que na mulher.

Os cânceres são classificados de acordo com o tecido e tipo de célula de origem, podem se originar das células de revestimento epitelial, ductal ou alveolar, das células mioepiteliais periféricas ou do tecido conectivo intersticial (SOUZA, et al., 2001; CARRUIDO et al., 2003). Os malignos de origem epiteliais são denominados de carcinomas, e aqueles com origem no tecido conjuntivo ou muscular são denominados sarcomas (ALBERTS et al., 1997).

Estudos realizados, para caracterizar os tipos e frequência dos tumores de mama em cadelas, têm demonstrado que há alta incidência de tumores malignos, cerca de 50% e destes a maioria são de tumores mistos (36,25%), seguidos por carcinomas (25%) (CASSALI, 2000).

O desenvolvimento tumoral está intimamente relacionado com diversos fatores predisponentes como: idade, obesidade, dieta rica em gordura e, principalmente, problemas hormonais (SONNENSCHHEIN et al., 1991; PÉREZ ALENZA et al., 1998; CASSALI, 2000). Zuccari et al. (2001a) ressaltam que as hipóteses mais citadas sobre a etiologia das neoplasias mamárias são: origem viral, dieta, principalmente no que se refere ao consumo de gorduras, e a atividade hormonal, que tem maior repercussão.

Em relação à dieta, os pesquisadores concluíram que o risco de aparecimento do tumor mamário pode estar ligado a fatores nutricionais interagindo já nos primeiros meses da vida do animal (SONNENSCHNEIN et al., 1991; PÉREZ ALENZA et al., 1998). Um estudo retrospectivo de tumores mamários em cadelas demonstrou que filhotes de até um ano de idade, obesos, apresentaram maior risco de desenvolver tumores no decorrer de suas vidas (PÉREZ ALENZA et al., 1998). De acordo com Yoo et al. (2001), citado por Silva et al. (2004) na espécie humana, a relação entre obesidade e incidência de tumor mamário é explicada através das elevadas concentrações de estrógeno proveniente da transformação da androstenediona em estrona e, posteriormente, em estrógeno no tecido adiposo.

O envolvimento de um componente etiológico de natureza hormonal tem sido mais aceito, devido às diferenças, na incidência de tumores mamários entre cadelas castradas e não castradas (MIALOT, 1988; SOARES e SILVA, 1998; ZUCCARI et al., 2001b; FOSSUM et al., 2002) pois, quando a ovariectomia foi realizada antes do primeiro ciclo estral, resultou em aproximadamente 0,5% de risco de ocorrer neoplasia mamária; naquelas em que a castração foi realizada após o primeiro ciclo estral têm 8%, e após dois ou mais ciclos estrais o risco aumentou para 26%. Em animais com mais de 2,5 anos de idade, a castração produziu um escasso efeito profilático para o câncer mamário, tendo em vista que nesta idade as glândulas mamárias já se desenvolveram plenamente (MIALOT, 1988; SOARES e SILVA, 1998; ZUCCARI et al., 2001b; FOSSUM et al., 2002; QUEIROGA et al., 2005).

Os estudos sobre a carcinogênese propõem que os cânceres necessitam de um período de latência dividido em dois principais estágios: iniciação, no qual o agente cancerígeno induz mutações e altera a velocidade da divisão celular, e promoção, estágio sucessivo em que o processo evolui até constituir-se num tumor observável.

Neste processo, a célula se modifica e, torna-se cancerosa, expande-se com desenvolvimento anômalo formando uma colônia de descendentes denominada clone (WÜNSCH FILHO e GATTÁS, 2001)

O rápido desenvolvimento das glândulas mamárias durante a puberdade, período em que a ação estrogênica é acentuada, pode contribuir para a formação de clones de células alteradas que se tornam nódulos hiperplásicos. Tais nódulos, que têm entre 1 e 4 mm de diâmetro e não são detectáveis clinicamente podem, sob ação de fatores carcinogênicos, sofrer transformação neoplásica. Assim, o papel do estrógeno no desenvolvimento tumoral é indireto, induzindo à proliferação do epitélio ductal das glândulas mamárias e, desta forma, propiciando as condições necessárias para que mutações genéticas ocorram. O estrógeno também pode estar envolvido na transformação maligna pela regulação de muitos protooncogenes nucleares (NETO, 1992; NETO, 1997; O'KEEFE, 1997; PEREZ et al., 2001; ZUCCARI et al., 2001a).

A progesterona atua significativamente sobre as glândulas mamárias das cadelas, e o ciclo estral destes animais promove uma ação prolongada desse hormônio durante o diestro, que retorna ao nível basal cerca de 80 a 100 dias após o início do estro (GOBELLO et al., 2001; JOHNSTON et al., 2001; ZUCCARI et al. 2001a; CASSALI, 2003). Em um estudo realizado por Queiroga et al. (2005) foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de estrógeno e progesterona comparados entre cadelas sem alteração mamária e cadelas com tumores benignos e malignos, observado-se que os níveis destes hormônios eram maiores quando havia lesões mamárias.

A prolactina e somatotrina têm efeito sobre o crescimento das glândulas mamárias, sendo também estudada sua influência sobre as neoplasias mamárias caninas (CASSALI, 2003; QUEIROGA et al., 2005).

As glândulas mamárias diferenciam-se durante os sucessivos estágios de vida do animal. As mamas da fêmea impúbere apresentam um sistema tubular ramificado rudimentar ligado aos ductos lactíferos. Quando sob efeito dos estrógenos, durante a puberdade, o sistema tubular se desenvolve, com discreto aumento de células adiposas. Portanto, o volume externo da glândula aumenta ligeiramente, o que acontece, sobretudo nas mamas abdominais caudais e nas mamas inguinais (CASSALI, 2003). As mamas apresentam dois tipos celulares em sua estrutura, as células epiteliais luminiais que sintetizam e excretam proteínas lácteas e lipídios durante a lactação, e as células epiteliais basais ou mioepiteliais que se contraem sob a influência de ocitocina, expelindo o leite dos ductos. Ambos os tipos celulares são derivados de uma única população celular ou células tronco. Além do tecido epitelial, ainda há a presença de fibroblastos e células adiposas que compõem e fazem a sustentação do tecido mamário. O tecido subcutâneo da parede ventral do abdome contém as mamas abdominais e inguinais e os vasos e nervos que as suprem. Na fêmea canina, os vasos epigástricos craniais superficiais são vistos subcutaneamente, junto à papila mamária abdominal cranial. A artéria epigástrica superficial caudal segue cranialmente à superfície profunda da mama inguinal e fornece os ramos mamários. A artéria prossegue para suprir a mama abdominal caudal e fazer anastomose com ramos da artéria epigástrica superficial cranial (HOWARD e DELAHUNTA, 2001).

Essa formação é de extrema importância no estudo dos tumores mamários, pela relação direta entre seus componentes e o prognóstico da lesão (BANKS, 1992; ZUCCARI et al. 2001a). Na cadela há 5 pares de glândulas mamárias, no entanto aproximadamente 60% de todos os tumores mamários ocorrem nas mamas inguinais. A razão desta ocorrência é desconhecida, podendo estar relacionada com o maior volume destas glândulas e com as correspondentes alterações proliferativas em resposta aos

estrógenos (QUEIROGA e LOPES, 2002), segundo Withrow e Susaneck (1986) os tumores ocorrem, em 50% dos casos, nas mamas abdominais e inguinais.

A pseudogestação consiste em algumas mudanças hormonais similares à gestação, normalmente entre a 6ª e 14ª semana após o estro, resultando em transtornos psicológicos e fisiológicos. Sua etiologia está associada a uma concentração plasmática elevada de prolactina ou uma maior sensibilidade do animal a esse hormônio (SARTORI, 2003). Episódios de pseudogestação podem aumentar o aparecimento de lesões pré-neoplásicas, devido ao acúmulo de secreções lácteas intra-mamárias, responsáveis pela grande distensão alveolar, provocando compressão vascular seguida de hipoxia, com liberação de radicais livres com potencial carcinogênico, além disso, o acúmulo de leite nos ductos mamários durante a pseudogestação é acompanhado de estagnação e degradação dos produtos de secreção (TANAKA, 2003; VERSTEGEN et al., 2005) (Fig 1).



Figura 1 – Cadela em pseudogestação apresentando aumento de volume das glândulas mamárias.

Segundo Tanaka (2003) as fêmeas da espécie canina que apresentaram regularmente falsas gestações foram as mais propensas aos tumores de mama, como consequência do desenvolvimento de estase láctea e formação de focos inflamatórios.

A população de risco, no que se refere aos tumores mamários, não tem predisposição racial específica e é constituída por cadelas entre os seis e 12 anos de idade, sendo a idade de maior susceptibilidade entre os nove e 11 anos (PELETEIRO, 1994; CASSALI, 2003) ou entre 7 e 15 anos (MUTO et al., 2000).

A administração de hormônios esteróides de longa ação, tem sido amplamente utilizada como método de controle do ciclo estral das cadelas (TANAKA, 2003). Estes hormônios entre eles os esteróides naturais, progesterona e testosterona, além de uma variedade de esteróides sintéticos, tais como acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, acetato de melengestrol, proligestona e miborelone, suprimem a atividade ovariana cíclica, através da supressão da secreção de hormônios gonadotróficos. Contudo, segundo Oliveira et al. (2003), a administração prolongada destes progestágenos tende a resultar em hiperplasia endometrial cística e infecção uterina subsequente, além do desenvolvimento de tumores mamários e, segundo Withrow e Susaneck (1986), em experimento desenvolvido com Beagles, 66% apresentaram tumores com 5 a 7 anos de idade após uso prolongado de contraceptivos orais.

Na oncologia, é necessário ir além do diagnóstico e buscar informações sobre todos os aspectos envolvidos, incluindo fatores de risco, conduzindo às soluções mais adequadas, e indicando medidas profiláticas.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a ocorrência dos tipos de tumores mamários em cadelas e sua relação com idade, pseudogestação e o uso de progestágenos.



## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 50 tumores mamários e 50 glândulas macroscopicamente normais adjacentes e ipsolaterais à tumoração de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), no período de 2003 a 2005. Como controle negativo foram utilizadas de 11 cadelas saudáveis, sem presença de tumor, submetidas a ovariectomia eletiva no mesmo Hospital, das quais foram retiradas biópsias de tecido mamário.



Figura 2 – Cadela apresentando tumor na glândula mamária.

As cadelas eram de raças variadas, as com tumoração (Fig. 2) tinham idade entre 4 e 19 anos e as do grupo controle entre 7 meses e 6 anos. Após exame clínico, foi preenchido questionário de histórico reprodutivo, hábitos alimentares, ocorrência de pseudogestação e uso de anticoncepcionais (ANEXO 1).

Para a cirurgia os animais foram submetidos a pré-anestesia com sulfato de atropina (0,044 mg/ Kg) e acepromazina (0,2 mg/Kg), indução com thiopental sódico 2,5% (12,5 mg/kg) e anestesia com ketamina 10% (10 mg/kg) ou halotano.

Os tumores foram mensurados e identificados quanto à localização (Fig. 3), e os fragmentos das mamas coletados (com ou sem tumor) através de biópsia foram fixados em solução de formalina neutra e tamponada a 10%. Posteriormente, os fragmentos foram processados por técnica usual de histologia, incluídos em parafina e cortados em micrótomo a 3µm e as lâminas coradas pelo método de hematoxilina e eosina (PROPHET et al., 1992).

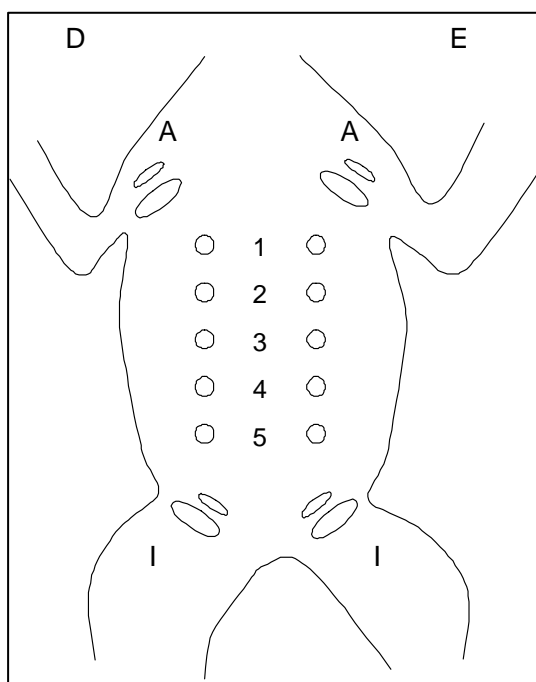


Figura 3 – Esquema utilizado para identificação e localização dos tumores em cadelas. (D) lado direito, (E) lado esquerdo, (A) linfonodos axiais e (I) linfonodos inguinais.

As amostras foram examinadas por dois patologistas, sem conhecimento prévio do resultado para análise histopatológica que identificaram os tumores com base nas

características celulares de acordo com a classificação histológica preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Após esta análise, os resultados foram estratificados de acordo com o tipo de tumor, ocorrência prévia de pseudogestação; glândula mamária afetada; uso de anticoncepcional e ocorrência de neoplasia na mama macroscopicamente normal.

Os dados foram analisados pelo teste de comparação de proporções e pelo teste  $\chi^2$  com significância de  $P < 0,05$  (REIS, 2003).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As mamas dos animais saudáveis apresentaram as características celulares preservadas, sem alterações que sugerissem neoplasia (Fig.4 e 5).

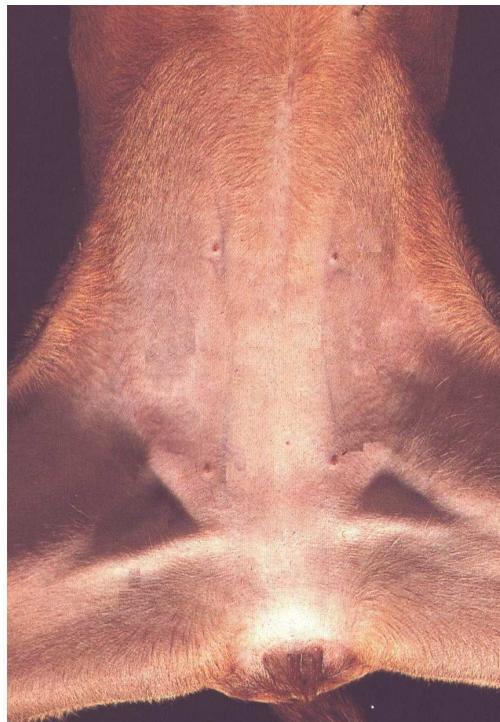


Figura 4 – Aparência externa da cadeia mamária de cadela normal com ausência de nódulos tumorais.

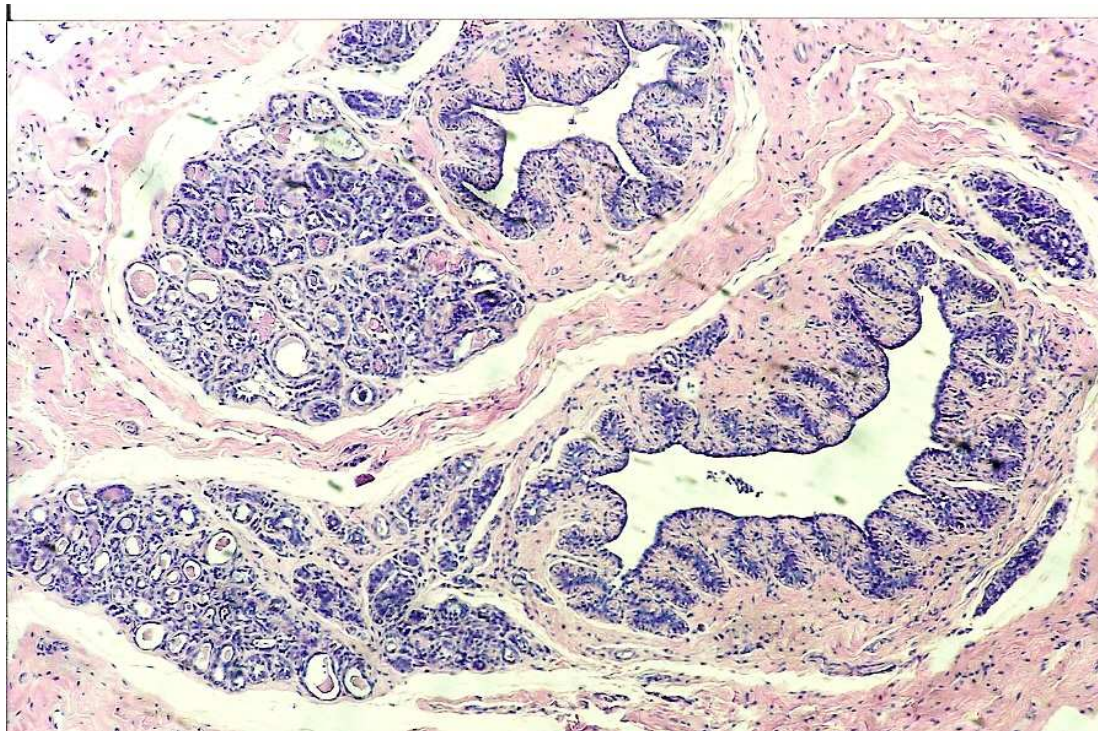


Figura 5 – Fotomicrografia de tecido mamário normal em cadela com ausência de tumoração. H.E. Aumento 63X.

A idade de maior frequência de tumores mamários nas cadelas deste estudo, variou entre 9 a 13 anos (48%) estando de acordo com os achados de Peleteiro (1994) e Cassali (2003), as demais ficaram entre 4 a 8 anos (42%) e 14 a 19 anos (10%), demonstrando a importância do fator idade no aparecimento dos tumores, apesar da amplitude da variação de idade neste estudo, 4 a 19 anos, ter sido maior do que a observada por Peleteiro (1994) e Muto et al. (2000).

A baixa frequência observada na faixa etária de 14 – 19 anos é reflexo da alta malignidade dos tumores, pois não são muitos os animais que atingem esta expectativa de vida, especialmente quando acometidos por tumores mamários.

A maior frequência dos tumores em animais mais velhos pode ser decorrente do fato que já passaram por vários ciclos estrais, sendo submetidos a alterações hormonais

cíclicas fisiológicas e, portanto mais sujeitos à carcinogênese hormonal, conforme sugerido por Silva et al. (2004).

Neste estudo observou-se uma maior frequência dos carcinosarcomas (68%) (Fig. 6) seguidos pelo carcinoma (24%) (Fig. 7; Tab.1) demonstrando a malignidade dos tumores encontrados, conforme os achados de Cavalcante (1977), Santos (1994) e Marques (2000) que identificaram maior frequência de carcinosarcoma mamários, na cidade de Recife-PE. No entanto, os achados de Souza et al. (2001) na cidade de Salvador-BA, Queiroga et al. (2005) na cidade de Madrid – Espanha e Cassali (2003) em Belo Horizonte-MG encontraram maior frequência, de tumores mistos benignos.

Além destes dois tipos de tumores foram encontrados em menor frequência, tumor misto benigno, fibrose, hemangiosarcoma e processo inflamatório (Fig. 8 a 11) .

Tabela 1 - Classificação dos achados histológicos de lesões mamárias de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFRPE, Recife, 2003/2005

Classificação histológica	n	%
Carcinoma	12	24
carcinosarcoma	34	68
Misto benigno	1	2
Hemangiosarcoma	1	2
Fibrose	1	2
Processo inflamatório	1	2
TOTAL	50	100

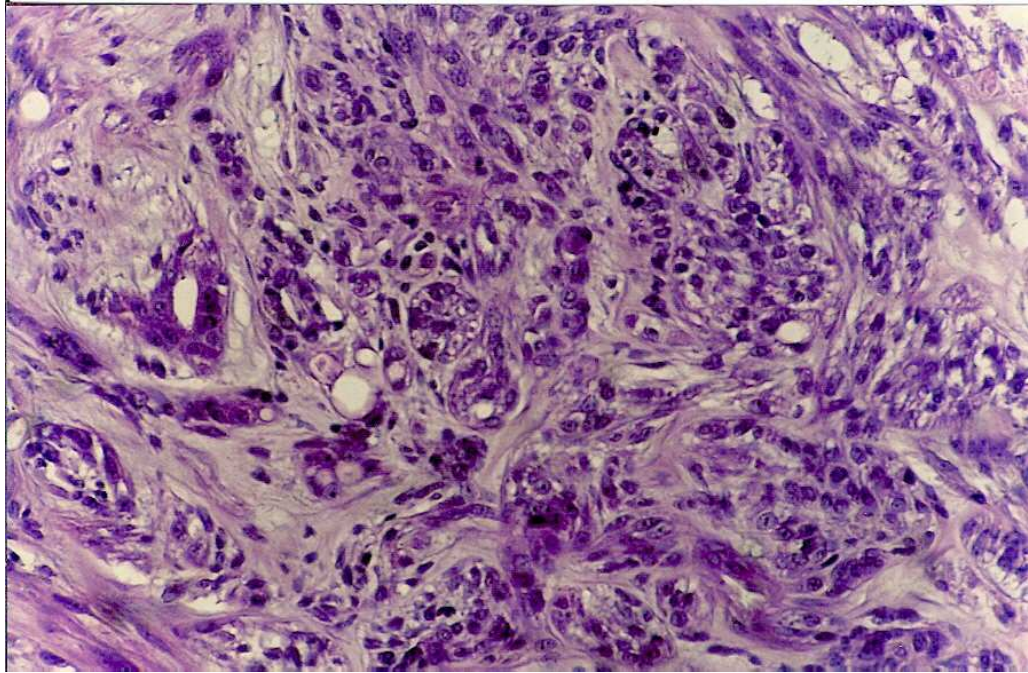


Figura 6- Fotomicrografia de carcinosarcoma mamário em cadela, com formação irregular de ductos e ácinos, constituídos por células epiteliais com elevado grau de anisocitose e anisocariose, associados a áreas de proliferação de células mioepiteliais e células de origem mesenquimal mal diferenciadas. Inúmeras mitoses estão presentes.H.E. Aumento 400X.

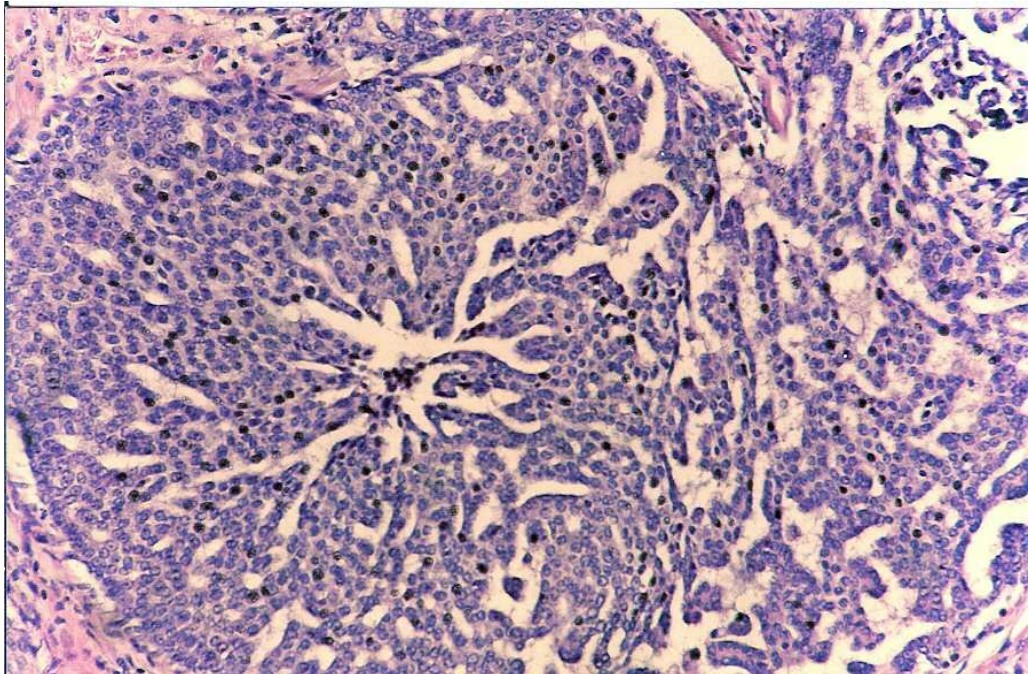


Figura 7- Fotomicrografia de carcinoma papilar em mama de cadela., demonstrando estruturas ductais com proliferação do epitélio em forma de papilas. H.E. Aumento 400X.

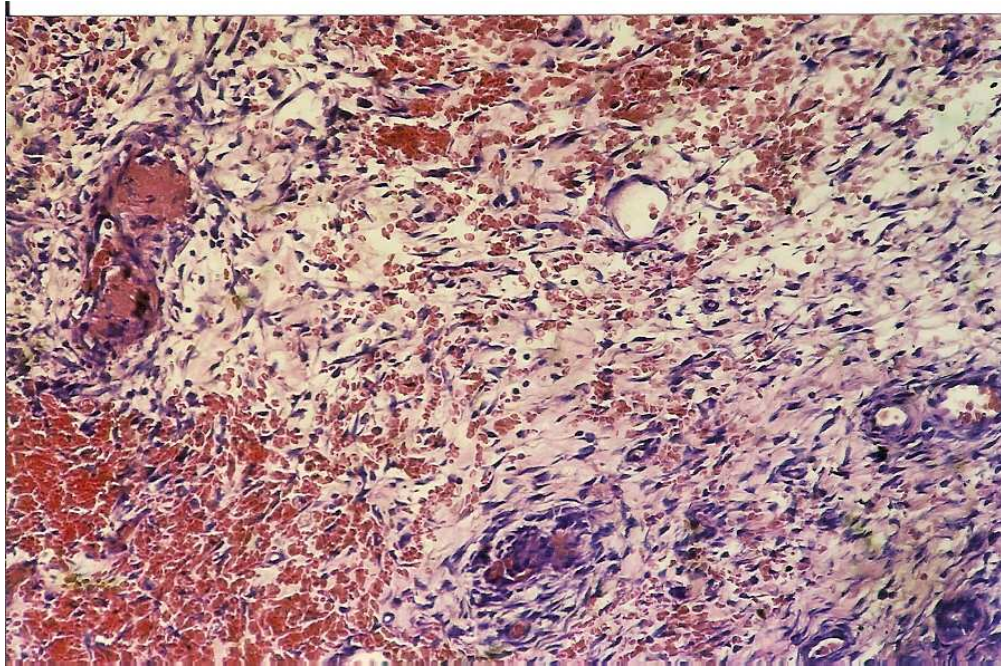


Figura 8- Fotomicrografia de hemangiosarcoma em mama de cadela, com células endoteliais imaturas mostrando anaplasia, formando espaços vasculares. H.E. Aumento 63X.

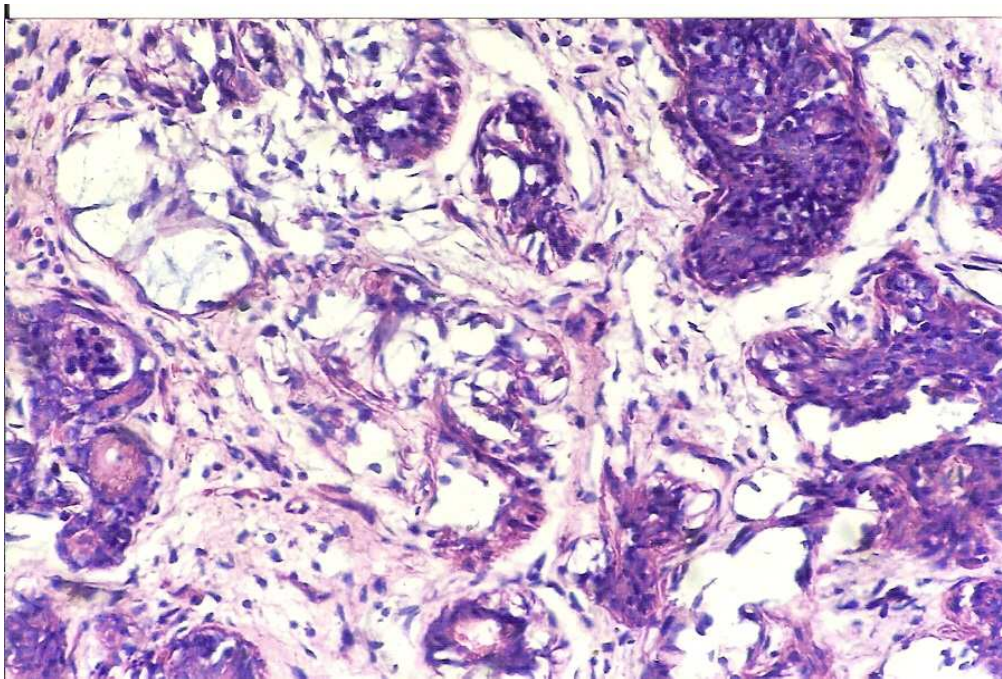


Figura 9- Fotomicrografia de tumor misto benigno em mama de cadela. Arranjo de células epiteliais em ácinos e ninhos, com proliferação de células mioepiteliais.H.E. Aumento 250X.

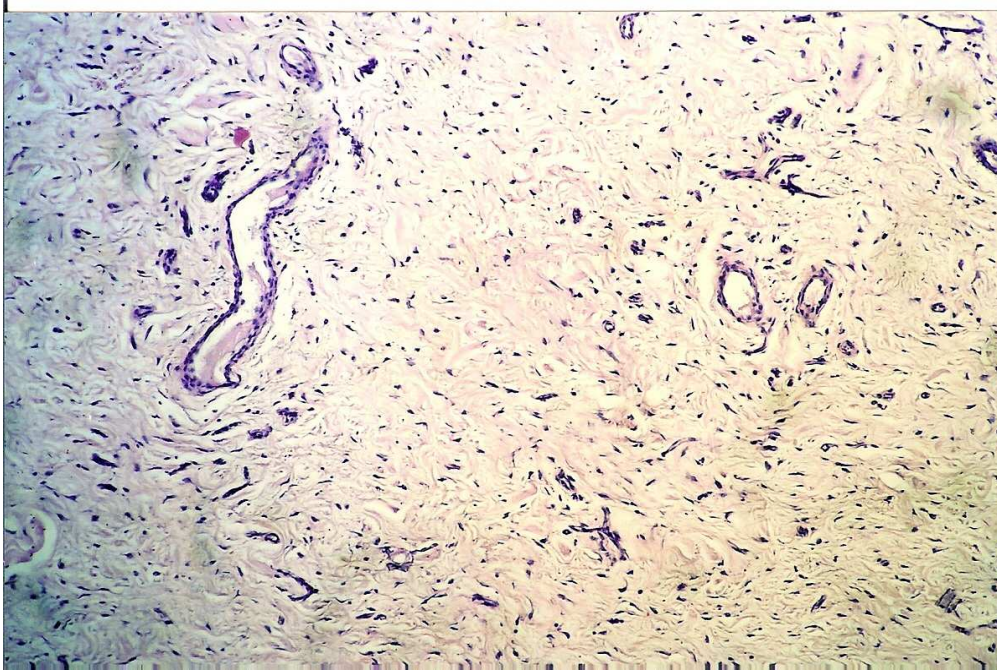


Figura 10- Fotomicrografia de fibrose em mama de cadela. Substituição de tecido glandular por tecido conjuntivo fibroso.H.E. Aumento 63X.

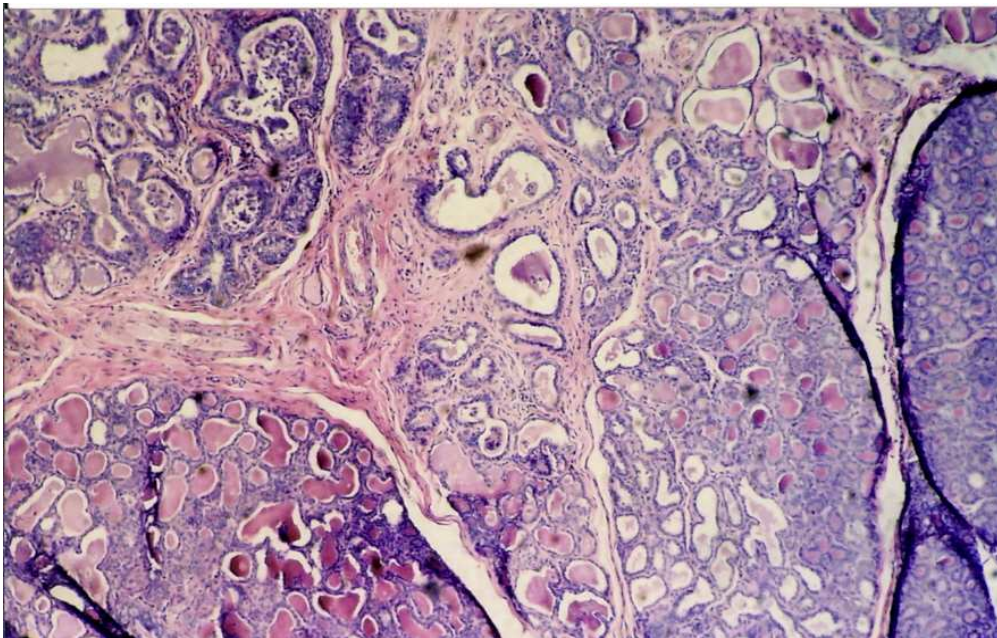


Figura 11- Fotomicrografia de processo inflamatório em mama de cadela. Caracterizado por acúmulo de leucócitos mononucleados no lúmen dos ácinos e no tecido intersticial. H.E. Aumento 63X.



Nas glândulas macroscopicamente normais, laterais aos tumores (Tab. 2), observou-se que 54% delas já apresentavam alterações tumorais com maior frequência de carcinomas (48%), indicando que as alterações iniciaram na porção epitelial (Luiz et al., 2002). Além das alterações já apresentadas nas mamas com processos tumorais, observou-se também um caso de hiperplasia mamária (Fig. 12).

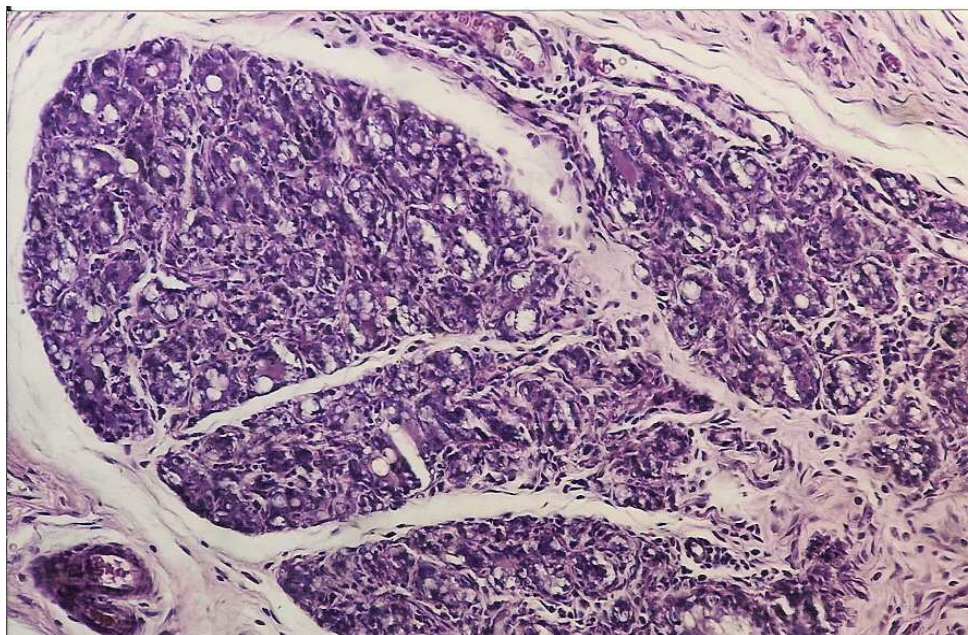


Figura 12- Fotomicrografia de hiperplasia em mama de cadela. Nódulo hiperplásico mostrando múltiplos lóbulos em diferentes estágios de hiperplasia. H.E. Aumento 63X.

Tabela 2 - Avaliação histológica das glândulas mamárias macroscopicamente normais, laterais aos tumores mamários de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFRPE, Recife, 2003/5

Avaliação histológica	n	%
Glândulas normais	18	36
Carcinoma	24	48
Fibrose	1	2
Carcinosarcoma	3	6
Hiperplasia	1	2
Material insuficiente	3	6
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>	<b>100</b>

Não foi observado neste estudo influência da pseudogestação e do uso de anticoncepcionais como fatores de risco, tendo em vista que a maioria das fêmeas afetadas com tumores mamários (78%) não apresentaram pseudogestação prévia e em 68% delas não foi usado anticoncepcional, demonstrando que estes fatores não foram os indutores dos tumores nestes casos estudados, ao contrário do que foi sugerido por Verstegen et al. (2005), Tanaka (2003) e Oliveira et al. (2003) (Tab.3)

Tabela 3 - Ocorrência de tumores de mama com existência de pseudogestação e o uso de anticoncepcionais em cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFRPE, Recife, 2003/2005

Condição	Gestação		Pseudogestação		Anticoncepcional	
	n	%	n	%	n	%
Cadelas com Tumor (n=50)	29	58,0	11	22,0	16	32,0
Cadelas Normais (n=11)	4	36,6	1	0,9	5	45,4

Entre as cadelas que apresentaram tumores malignos (carcinoma ou carcinosarcomas) também não foi observada associação com a gestação, pseudogestação e o uso de anticoncepcionais (Tab. 4)

Tabela 4 – Ocorrência de tumor maligno com a existência de pseudogestação e uso de anticoncepcionais em cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFRPE, Recife, 2003/2005

Tipo de Tumor	Gestação		Pseudogestação		Anticoncepcional	
	n	%	n	%	n	%
Carcinoma (n=12)	9	76,0	3	25,0	6	50,0
Carcinosarcoma (n=34)	16	47,0	8	23,5	10	29,4

Neste experimento, observou-se maior frequência de tumores mamários nas glândulas inguinais (37,63%) e abdominais (35,47%) (Tab. 5). Estando os estudos de

acordo com Queiroga e Lopes (2002) e Withrow e Susaneck (1986) que também obtiveram maior incidência dos tumores mamários nas glândulas inguinais, porém estes autores constataram uma frequência de 60% e 50% respectivamente. A razão desta diferença é desconhecida, podendo estar relacionada com o maior volume de tecido nestas glândulas e com as correspondentes alterações proliferativas em resposta aos estrógenos.

Notou-se também que a maioria dos animais apresentou mais de uma mama afetada na mesma ou na cadeia contralateral. Segundo Fossum (2002) isto é consequência da disseminação das células tumorais tanto por via linfática quanto por via sanguínea e, segundo Luiz et al. (2002), por ocorrer anastomoses de vasos tanto das mamas laterais como das cadeias mamárias. De acordo com Linzell (1959), citado por Luiz et al. (2002), além do aumento da irrigação, ocorre inversão de fluxo venular e há uma propensão no desenvolvimento de processos inflamatórios e hipertróficos glandulares, que em 50% dos casos, levam a malignização e morte do animal pela disseminação tumoral, tanto por via linfática quanto por via sanguínea. Contudo, para afirmar este processo neste trabalho, seria necessária realização de estudos de angiogênese.

Tabela 5 - Frequência de glândulas mamárias afetadas pelo tumor de mama em cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco da UFRPE, Recife, 2003/2005

Glândulas mamárias mais afetadas	n	%
1D	2	2,15
2D	8	8,60
3D	5	5,37
4D	20	21,50
5D	19	20,43
1E	1	1,07
2E	4	4,30
3E	5	5,37
4E	13	13,97
5E	16	17,20
	93	100

1 – 5: seqüência de mamas de uma mesma cadeia em ordem crescente no sentido crâneo –caudal; D: lado direito; E: lado esquerdo.

Conclui-se que, na população estudada, a ocorrência de tumores mamários não foi relacionada aos fatores de risco pseudogestação e uso de contraceptivos hormonais, mas está relacionado com a idade avançada e que, pela malignidade dos tumores observados e a frequência de sinais tumorais nas mamas adjacentes às afetadas, recomenda-se indicar a prática de extirpação completa da cadeia mamária afetada, a fim de evitar as recidivas e invasão nos tecidos adjacentes diminuindo, portanto, a possibilidade de futuras metástases e conseqüentemente aumentando a sobrevivência do animal.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Imunidade aos tumores. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 4<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2002. p. 384-403
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. A mecânica da divisão celular. In: **Biologia molecular da célula**. São Paulo: Artes Médicas Sul, 1997. cap. 18, p. 911 – 946.
- BANKS, W. J. Sistema tegumentar. In: **BANKS Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1992, cap. 20, p. 391-424.
- CARRUIDO, A. C. C.; SALAS, Y.; ORLANDO, E.; MENDEZ, D. COLMENAREZ, V. **Incidencia de las neoplasias de glándula mamaria en caninos diagnosticadas por histopatología en el hospital veterinario "Dr. Humberto Ramírez Daza" desde 1983 hasta 2003**. Disponível em <http://www.monografias.com/trabajos15/tumores-caninos/tumores-caninos.shtml>, 2003. Acesso em: 12/01/2006.
- CASSALI, G. D. **Estudos morfológicos, imuno-histoquímico e citométrico de tumores da cadela – Aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. Belo Horizonte, 2000. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais.
- CASSALI, G. D. **Patologia da glândula mamária**. In: NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologia da reprodução dos animais domésticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 12, p. 119-133.
- CAVALCANTE, M.I. **Oncologia comparativa entre caninos e humanos, na cidade do Recife, Brasil**. Recife, 1977. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- DOBSON, J. M. Princípios da terapia do câncer. In: DUNN, J. K. **Tratado de Medicina de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2001. cap. 50, p. 979-1022.

FOSSUM, T. W.; HEDLUND, C. S.; HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L.; SEIM, H. B.; WILLARD, M. D.; CARROLL, G. L. Cirurgia dos sistemas reprodutivos e genitais In: **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002. cap. 13, p. 571-637

GOBELLO, C.; CONCANNON, P. W.; VERSTEGEN, J. **Pseudopreñez canina: Una revisión** In: Recent Advances in Small Animal Reproduction, Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em [http://www.ivis.org/advances/Concannon/gobello\\_es/ chapter\\_frm.asp?LA=2](http://www.ivis.org/advances/Concannon/gobello_es/ chapter_frm.asp?LA=2). Acesso em 02/01/2006

HELLMÉN, E. Complex mammary tumour in the female dog: a review. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.72, p. 90-97, 2005.

HOWARD, E. E.; DELAHUNTA. Abdome, pelve e membro pélvico. In: **Guia para a dissecação do cão**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001. p. 117-119

ITOH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K. KUSHIMA, K. KUSHIMA, E. TAMADA, H. MORITAKE, T. NAKAO, H.; SHII, H. Clinicopathological surgery of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 67, n. 3, p. 345-347, 2005

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Disorders of the mammary glands of the bitch. In: **Canine and feline theriogenology**, Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. cap. 13, p. 243-274

KARAYANNOPOULOU, M.; KAALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 133, p. 246-252, 2005.

LUIZ, C. R.; MIGLINO, M. A.; SANTOS, T.C. Segmentos anatômico-cirúrgicos arteriais da glandula mamária em cães (canis familiaris, Linnaeus, 1758). **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.1, p. 27-36, 2002.

MARQUES, N. B. **Avaliação dos hormônios tireoideanos de fêmeas da espécie canina com tumores de mama**. Recife, 2000. Dissertação Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MIALOT, J. P. Patologia da mama. In: MIALOT, J. P. **Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos**. Porto Alegre: A Hora Veterinária, 1988. 160 p.

MOURA-GALLO, C. V.; SIMÃO, T. A.; RIBEIRO, F. S.; SERPA, M. J. A.; CARDOSO, L. E. B.; MENDONÇA, G. A. S. Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Rio de Janeiro, v.7, n.2, p.167-175, 2004.

MUTO, T.; WAKUI, S.; TAKAHASHI, H.; MAEKAWA, S.; MASAOKA, T.; USHIGOME, S.; FURUSATO, M. P53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumor of the dog. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 37, p. 248-243, 2000.

NETO, L. N. **Tumores mamários malignos na cadela**. São Paulo: Arte & Ciência, 1997. 144p.

NETO, L. Z. Neoplasias malignas em cães. Sua analogia com alguns processos idênticos na espécie humana. **UNIMAR CIÊNCIAS**, Marília, v. 1, p. 4-9, 1992.

- O'KEEFE, D. A. Tumores do sistema genital e glândulas mamárias. In: ETTINGER, S. A. & FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, p. 2344 – 2351
- OLIVEIRA, E.C.S.; MARQUES JÚNIOR, A.P.; NEVES, M.M. Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela – revisão. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2003.
- PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.89, p. 10-34, 1994.
- PEREZ ALENZA D.; RUTTEMAN, G. R.; PENA, L.; BEYNEN, A. C.; CUESTA, P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 12, n. 3, p. 132-9, 1998.
- PÉREZ, A. M. D.; TABANERA, E.; PEÑA, L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.219, n. 15, p. 1110 – 1114, 2001.
- PROPHET, E.B.; MILLES, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. In: PROPHET, E.B.; MILLES, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: Armed Force Institute of Pathology American Registry of Pathology, 1992, 279p.
- QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.97, n. 543, p. 119-127, 2002.
- QUEIROGA, F. L.; PÉREZ-ALENZA, M. D.; SILVAN, G.; PEÑA, L.; LOPES, C.; ILLERA, J. C. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, n. 94, p. 181-187, 2005.
- REIS, J.C. **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. Olinda: Luci Artes Gráficas, 2003. 651p.
- SANTOS, F.L. **Alguns aspectos de neoplasias, em caninos, na cidade do Recife-Pernambuco-Brasil, no período de 1982 a 1990**. Recife, 1994. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- SARTORI, M. **Pseudociese- gravidez psicológica** 2003. Disponível em [http://www.labrador.com.br/lab\\_news16.htm](http://www.labrador.com.br/lab_news16.htm). Acesso em 10/12/2006
- SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, 625-633, 2004.
- SOARES, J. A. G.; SILVA, P. A. R. Castração precoce em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 13, p. 34-40, 1998.
- SONNENSCHNEIN, E. G.; GLICKMAN L. T.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCKEE, L. J. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 133, n. 7, p. 694-703, 1991.
- SOUZA, V. T. F.; PARAGUASSU, A. A.; MOREIRA, E. L. T. Ocorrência de neoplasias em caninos na cidade de Salvador, Bahia (achados de biopsias). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 2, n. 2, p. 53-58, 2001.

TANAKA, N. Tumor de mama: qual a melhor conduta? **Boletim Informativo**, São Paulo, ano VII, n.29, p.6-7, 2003. Disponível em <http://www.anclivepa-sp.org.br/rev-7-29-01.htm>.

VERSTEGEN, J.; SCALAIS, S.; ONCLIN, K. Cancerologia canina: os tumores mamários e a prolactina. **A Hora veterinária**, Porto Alegre, n. 32, p. 50-54, 2005.

WITHROW, S. J.; SUSANECK, S. J. Tumors of the canine female reproductive tract. In: MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology diagnoses, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animal**, Philadelphia: W.B.Saunders, 1986. p. 521-528

WUNSCH FILHO, V.; GATTAS, G. J. F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v..17, n. 3, p. 467-480, 2001.

ZUCCARI, A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 38, n.1, p. 38-41, 2001a.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, S. N. Fisiologia da neoplasia mamária em cadelas – Revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.32, p.52-54, 2001b.

## **Artigo 2**



**ESTUDO DE MUTAÇÕES NOS EXONS 4 A 8 DO GENE p53 EM TUMORES  
MALIGNOS EM GLANDULAS MAMÁRIAS DE CADELAS**

***Mutations study in exons 4 to 8 of the gene p53 in malignant tumors in  
bitches' mammary glands***

**Souza<sup>6</sup>, D.M.B.; Barros<sup>7</sup>, M.G.O; Silva<sup>2</sup>, J.S.C; Coletto<sup>1</sup>, Z.F.; Adrião<sup>8</sup>, M.;  
Wischral<sup>9</sup>, A.**

**RESUMO**

Os tumores em mamas de cadelas, representam mais de 50% de todos os tumores em fêmeas da espécie canina. Estes tumores apresentam na maioria, comprometimento do DNA, pela influência de fatores carcinogênicos que desencadeiam as mutações. O gene p53, conhecido como um gene supressor de tumor, vem sendo muito estudado pela relação entre as mutações e o aparecimento destes tumores. Para estudar as mutações nos exos 4 a 8 do gene p53, foram utilizadas 50 cadelas com tumores de mamas e 11 normais. O DNA genômico foi extraído pela técnica fenol-clorofórmio e os exons 4 a 8 foram amplificados através da técnica de reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) com oligonucleotídeos específicos. Dos tumores analisados, foram escolhidas amostras de 9 carcinomas e 7 carcinosarcomas com as respectivas mamas normais adjacentes, e de 6 cadelas normais, cujos DNAs foram seqüenciados e avaliados quanto a presença de mutações nos nucleotídeos do p53 canino (GenBank - S77819). Foram encontradas mutações em 86,1% das amostras que após o sequenciamento apresentaram, em média homologia de 86,3% com a proteína p53 canina (GenBank - AAB42022.1). Das mutações observadas, as mais freqüentes foram as missense (74,6 %) e os exons mais acometidos foram o 5 e o 8 com 23,2% e 24,9% das mutações, respectivamente. As alterações de nucleotídeos mais freqüentes foram deleções (C e G) e inserções (A e T), que resultaram na maioria das mutações missense. Os resultados deste trabalho permitiram concluir que a neoplasia mamária em cadelas tem relação com mutações no gene p53 e que as mutações se encontram principalmente na região da proteína que se liga ao DNA no núcleo celular, o que pode alterar a funcionalidade da mesma e propiciar o crescimento tumoral. As mamas adjacentes aos tumores, apesar de

---

<sup>6</sup> Doutoranda – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco - E-mail: daniela.bastos@oi.com.br

<sup>7</sup> Graduando em Medicina Veterinária, Bolsista Pibic/CNPq

<sup>8</sup> Professor, Depto de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

<sup>9</sup> Professor, Depto de Medicina Veterinária da UFRPE

macroscopicamente e microscopicamente normais, apresentam mutações que representam risco de recidivas se não forem retiradas junto com o tumor já existente.

Palavras chave: DNA, neoplasias, PCR, biologia molecular

## **ABSTRACT**

The mammary tumors are the more frequent neoplasm lesions, representing more than 50% of all the tumors of the canine females and the gene p53, known as a tumor suppressor gene, it has been presented mutations related with neoplasias. To study the mutations in exons 4 to 8 of the p53 gene, they were used 50 females with mammary tumor and 11 normal ones. The genomic DNA was extracted by the phenol-chloroform procedure, and amplification of the 4 to 8 exons, was through the polimerase chain reaction (PCR) with specific primers. Among analyzed tumors, they were chosen 9 carcinomas and 7 carcinosarcomas with the ones respective adjacent normal mammas, and 6 of the normal animals that were sequenced in automatic sequencer and analyzed for the presence of mutations in comparison to nucleotides sequence of the p53 canine (GenBank - S77819). Were found mutations in 86,1% of the samples that presented homology (86,3%) with the canine protein p53 (GenBank - AAB42022.1). Of the observed mutations, the most frequent were missense ones (74,6 %) and the most attacked exons were the 5 and the 8 with, respectively, 23,2% and 24,9% of the mutations. The more frequent nucleotides alterations were deletions (C and G) and inserts (A and T), which resulted in majority of the mutations missense. It concludes that mammary tumors in canine female has relation with mutations in the gene p53 and that the mutations meet mostly in the region of the protein that is linked to the DNA in the cellular nucleus, what it can change the functionality of the same and to propitiate the tumor growth. The adjacent mammas to the tumors, despite macroscopically normal, present mutations that can represent reincidence if are not withdrawn with already existing tumor.

Key words: DNA, neoplasm, PCR, molecular biology

## INTRODUÇÃO

O crescimento do corpo é dado pela multiplicação de células e milhões de divisões celulares ocorrem ao longo da vida de um organismo. Cada vez que uma célula se divide, a molécula de DNA duplica-se para continuar controlando a síntese das proteínas nas células filhas e cada cadeia servirá de molde para produção de uma cadeia complementar, resultando em duas moléculas de DNA com exatamente a mesma informação genética (FARAH, 2000).

Nas glândulas mamárias ocorre um rápido desenvolvimento durante a puberdade, período em que a ação estrogênica é acentuada, contribuindo para a formação de clones de células alteradas que se tornam nódulos hiperplásicos que, sob ação de fatores carcinogênicos, sofrem transformações neoplásicas. A prolactina e a somatotrofina têm efeito sobre o crescimento das glândulas mamárias, sendo também estudada sua influência sobre as neoplasias mamárias caninas. Assim, o papel hormonal no desenvolvimento tumoral é indireto, induzindo à proliferação do epitélio ductal das glândulas mamárias e, desta forma, propiciando as condições necessárias para que mutações genéticas ocorram (NETO, 1992; NETO, 1997; O'KEEFE, 1997; PEREZ et al., 2001; ZUCCARI et al., 2001; CASSALI, 2003; QUEIROGA et al., 2005).

O gene é o alvo das mutações e o dano em sua estrutura pode abolir a sua função. O gene p53, conhecido como um gene supressor de tumor, codifica uma fosfoproteína tetramérica, que se liga especificamente ao DNA e age como fator de transcrição. Cada unidade básica da proteína p53 é formada por quatro domínios que representam unidades funcionais distintas, sendo a parte central (localizada entre os

aminoácidos 100 e 300), responsável pela capacidade de ligação com a molécula de DNA (CAVALCANTI JÚNIOR et al., 2002).

Em células normais, esta proteína é sintetizada continuamente mas, não se acumula em níveis significativos, sendo degradada pela célula em 2-15 minutos. No entanto, quando as células são expostas a agentes que modificam o DNA, a proteína se torna estável e passa a controlar diversos genes que são seus alvos, impedindo a progressão do ciclo (MUTO et al., 2000; LEWIN, 2001; LEE e KWEON, 2002; KANAYA et al., 2002; FARIAS et al., 2005). A ação da proteína p53, é de regular a proliferação celular, a estabilidade genômica e morte celular programada (KRAEGEL et al., 1995; CHU et al., 1998; WONG et al., 1999; MUTO et al., 2000; SETOGUCHI et al., 2001) reparando o DNA lesado e conduzindo a novo fator de transcrição (VELDHOEN e MILNER, 1998; LEE e KWEON, 2002). Um grande aumento na quantidade da proteína p53 é observado em muitas células transformadas ou em linhagem derivadas de tumores (LEWIN, 2001).

Alguns estudos têm focado a investigação da função supressora de tumor do gene p53 na tumorigênese dos cânceres caninos, humanos e várias outras espécies. Mutações neste gene, localizado no cromossomo 17, estão presentes em aproximadamente 50% dos cânceres humanos, sendo o alvo mais comum de alterações genéticas no processo neoplásico (MOURA-GALLO et al., 2004).

As mutações em p53 encontradas nos mais diversos tumores malignos analisados são pontuais e estão majoritariamente localizadas na região da molécula altamente conservada, que corresponde ao domínio de ligação da proteína com o DNA (KRAEGEL et al., 1995; CHU et al., 1998; VELDHOEN e MILNER, 1998; WONG et al., 1999; MUTO et al., 2000; SETOGUCHI et al., 2001; LEE e KWEON, 2002).

Ocorre, ainda, modificação da localização da proteína, do núcleo para o citoplasma, e conseqüente impedimento da sua ligação com o DNA (LEWIN, 2001).

Os tumores em mamas são as lesões mais freqüentes nas fêmeas da espécie canina representando mais de 50% de todos os tumores, sendo a incidência três vezes maior quando comparada com os humanos (ITOH et al., 2005; KARAYANNOPOULOU et al., 2005; QUEIROGA et al., 2005).

Além dos agentes carcinogênicos (FETT-CONTE e SALLES, 2002), os tumores podem ocorrer como conseqüência do acúmulo de alterações genéticas que interferem no controle normal do crescimento e diferenciação celular, pela transformação de uma célula maligna através de múltiplas etapas, chamada de progressão tumoral, que envolve a ocorrência de mutações, nas diferentes fases do ciclo celular (DOBSON, 2001). Por outro lado, a ativação anormal dos genes que controlam o crescimento celular (LOURO, 2000), resulta em modificações progressivas da biologia celular caracterizadas por alterações na proliferação, diferenciação e na interação das células com o meio extracelular (COTRAN et al., 2000).

Dentre os genes envolvidos nas etapas de desenvolvimento do câncer de mama, o p53 é o gene que se apresenta mais mutado nesta doença (CHU et al., 1998; MUTO et al., 2000; MOURA-GALLO et al., 2004). As alterações neste gene foram identificadas em vários tipos de tumores tanto em humanos como nos animais, nas glândulas mamárias de mulheres (MOURA-GALLO et al., 2004), nos melanomas (ROELS et al., 2001), no papiloma oral (MAYR et al., 1994), no adenoma da glândula perianal (MAYR et al., 1997), nos osteossarcomas (LOUKOPOULOS et al., 2003), nos linfoma maligno, leucemia e câncer de colon (SETOGUCHI et al., 2001) dos caninos. Nos melanomas felinos (ROELS et al., 2001) e nos carcinomas cutâneos das células escamosas nos eqüinos (PAZZI et al., 1996). A diversidade destes cânceres sugere que o

p53 não está envolvido em um evento tecido-específico, mas sim em algum controle geral e bastante comum da proliferação celular e a perda deste controle pode ser um evento secundário que ocorre para assistir à multiplicação celular de muitos tumores (LEWIN, 2001).

As mutações podem ser silenciosas, não apresentando efeito discernível na célula ou organismo, ou resultarem em alterações estruturais e/ou funcionais no gene e/ou seu produto protéico (WALKER e RAPLEY, 1999; FARAH, 2000).

Todos os tipos de mutações, especialmente aquelas ocorrendo nas extensas seqüências intrônicas não codificantes ou extragênicas de DNA, e as pontuais, no interior de regiões codificantes, podem ser também silenciosas, devido à degeneração do código genético. Este é o caso daquelas que afetam a terceira base de um códon, pois isto não produzirá freqüentemente, uma alteração na ordem de aminoácidos codificada pelo gene. Portanto, tais mutações são indetectáveis no nível da proteína, mas podem ser observadas no nível dos nucleotídeos, pois muitos aminoácidos são codificados por mais de um códon. As mutações com sentido errôneo missense, resultam em alteração na seqüência codificada de aminoácidos, podem afetar a atividade ou expressão da proteína codificada e são detectadas tanto ao nível dos nucleotídeos como da proteína. As mutações missense podem afetar a estrutura e/ou a função da proteína codificada, dependendo do aminoácido envolvido e de sua localização (KRAEGEL et al., 1995; CHU et al., 1998; VELDHOEN e MILNER, 1998; WALKER e RAPLEY, 1999; WONG et al., 1999; MUTO et al., 2000; SETOYUCHI et al., 2001; KREUZER e MASSEY, 2002; LEE e KWEON, 2002).

Outras mutações, que ocorrem tanto em seqüências codificantes como não-codificantes de DNA, podem afetar o funcionamento de um gene e sua proteína codificada. Mutações pontuais na porção codificante de um gene podem criar um códon

premature de parada (nonsense), resultando na expressão de um polipeptídeo truncado e em um fenótipo mutante. Por outro lado, mutações em regiões não-codificantes podem alterar uma sequência regulatória funcional, como um promotor ou sinal de iniciação, levando a um aumento ou diminuição da expressão gênica. Inserções e deleções em regiões codificantes e envolvendo múltiplos de três nucleotídeos, podem também resultar na produção de polipeptídeos com comprimentos incorretos. Entretanto, deleções ou inserções não envolvendo múltiplos de três nucleotídeos, resultarão em uma mutação com deslocamento do quadro de leitura. Isto altera efetivamente o código, impedindo a expressão de uma proteína funcional. Tanto inserções como deleções podem também afetar a expressão de determinado gene, se alterarem sequências regulatórias associadas ao gene (WALKER e RAPLEY, 1999; KREUZER e MASSEY, 2002).

No desenvolvimento de tumores na espécie canina a inativação da forma “wild”, ou não mutante, do gene p53, ocorre por uma série de mecanismos, incluindo as aberrações cromossômicas estruturais como deleção, transições e translocação (KRAEGEL et al., 1995; SETOGUCHI et al., 2001; LEE e KWEON, 2002). As mutações ocorrem principalmente nos exons 3 – 8 (KRAEGEL, et al. 1995), entre os exons 4-7 (CHU et al., 1998), 5 – 8 (HAGA, 2001) e 5 – 9 (ALBARIC et al., 2001) determinando a perda do controle do ciclo celular e, como consequência, a sobrevivência das células com alto grau de mutações (YORIKO et al., 2000).

Considerando a relevância médico-científica dos resultados obtidos a partir dos estudos realizados com o gene p53, este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar a frequência e os tipos de mutações no gene p53 em 22 cadelas com câncer de mama; associar as mutações com os tumores malignos (carcinoma e carcinosarcoma) e identificar alterações nas glândulas mamárias macroscopicamente e

microscopicamente normais, laterais aos tumores, visando ampliar os conhecimentos a cerca do tumor mamário em cadelas e propiciar subsídios para o diagnóstico precoce desta patologia .

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção das amostras**

Foram utilizadas 9 amostras de carcinoma e 7 de tumor misto, com as respectivas mamas normais laterais aos tumores e 6 amostras de cadelas normais, sem nenhum sinal aparente de neoplasia mamária. Os fragmentos das mamas foram submetidos a exame histopatológico de rotina para caracterizar o tipo de alteração tumoral ou sua ausência. As cadelas tinham idades variando de 4 a 15 anos (com neoplasia) e 1,5 a 6 anos (normais) com raças variadas.

Para análise do DNA os fragmentos coletados ( $\pm 1\text{cm}^3$ ) foram acondicionados em tubos de criopreservação e congelados em nitrogênio líquido até a chegada ao laboratório, onde foram armazenados à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  (freezer).

### **Análise das mutações no gene p53**

O DNA genômico foi extraído no laboratório de Fisiologia Animal e Molecular Aplicada, UFRPE. De cada amostra, utilizou-se 0,5g de tecido, que foi macerado com nitrogênio líquido. Após a completa maceração e evaporação do nitrogênio, em um tubo cônico (SSI – Scientific Specialities Inc) de 1,5 ml devidamente identificado, foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de TE (Tris, 10 mM - Invitrogen life technologies e EDTA, 1 mM pH 8,0- Sigma Chemical Co.) e 100  $\mu\text{l}$  de fenol (Merck) equilibrado em pH 8,0. A amostra foi homogeneizada por 1 min em um vortex (Phoenix) e centrifugada (SIGMA 2K15) a 17.968 g por 5 min a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida o sobrenadante foi transferido para



outro tubo ao qual foi adicionado 100 µl de fenol-clorofórmio (1:1) (MANIATIS et al., 1998), a amostra foi homogeneizada por 1 min e centrifugada a 17.958 g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo devidamente identificado onde foram adicionados 100 µl de clorofórmio (Merck), misturado por 1 min e centrifugado a 17.968g por 5 min. Novamente em outro tubo, devidamente identificado, foram adicionados: 10 µl de acetato de amônio 3 M (Cromato Produtos Químico LTDA), 100 µl do sobrenadante do tubo anterior (onde encontra-se o DNA) e 100 µl de isopropanol (Merck). A mistura foi homogeneizada por 1 min e incubada por 30 minutos no freezer a -20 °C, em seguida, centrifugada a 17.968g por 15 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 500 µl de etanol 70% (Merck) por centrifugação a 17.968g durante 5 min a 4 °C. O etanol foi retirado e o sedimento deixado em temperatura ambiente e ressuspensionado em água ultra-pura. O DNA extraído foi analisado em gel de agarose (Invitrogen life Technologies) a 2%, com marcador de peso molecular fago-lambda, corado com brometo de etídeo, para análise em luz ultravioleta e fotografado (ZoomBrowser-Canon – PowerShot S70 – Digital Câmara) para verificação de sua qualidade.

Os oligonucleotídeos para amplificar os exons de 4 a 8 do gene p53 foram desenhados segundo os dados previamente publicados (CHU et al., 1998) (Tab. 1).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 µl contendo 50ng de DNA genômico, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo e 2,5 U *Taq*-polimerase (Invitrogen Life Technologies Ltda). As amplificações foram feitas em termociclador (Eppendorf Mastercycler personal) e consistiram de uma desnaturação inicial do DNA a 94 °C (2 min), seguida de 35 ciclos de 94 °C (1 min), 1 minuto da temperatura de anelamento

dos oligonucleotídeos (55 °, 58 ° ou 60 °C), 72 °C (1min) e um período de extensão final de 3 minutos à 72 °C (CHU et al., 1998; MUTO et al., 2000).

Tabela 1 – Pares de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos exons 4 a 8 do gene p53 canino através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

Exons	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento (°C)
4(S1)	5': CTTGACTCTGGTCTCGCC 3': GGGTAGGTCTTCGGGGAA	58
4(S2)	5': CCCTATCATCCTCTGTCC 3': GCCAGCCCCATGGAAACC	58
5(S1)	5': GACCTGTCCATCTGTCCT 3': ATAGATGGCCATAGCGCGG	58
5(S2)	5':ACCCACCCAATACCTG 3': GCCTTGTCCCATCTGTAG	58
6 (S)	5': TGATTCCTCCCCGATGGC/ 3': AGACCCCTCAGATGCCAA	55
7(S)	5': ACCCTGGGCCTACCTTCTA/ 3': AGGGTGGCAGGCAGGTC	58
8 (S)	5': GCTTCTCTTCTCACCTG/ 3': CTCCTTCACCTCCTCTTGT	58

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforeses em gel de agarose a 2% corado com Brometo de Etídio, visualizados em transluminador de ultravioleta e comparados com o marcador de peso molecular 50bp (DNA Ladder, Invitrogen, USA) e fotodocumentados.

Os produtos obtidos pela PCR foram purificados usando protocolo comercial (PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen, USA) para remoção de sais e resíduos de oligonucleotídeos e dNTPs.

O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, setor de

sequenciamento de DNA, onde foram processados em seqüenciador automático (MegaBACE 1000) utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). As seqüências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando Base Caller Cimarron 3.12. Cada sequenciamento foi realizado com oligonucleotídeos sense e antisense.

As seqüências obtidas foram analisadas em programas de computação específicos. Os arquivos foram lidos e a geração da fita reversa e complementar foi realizada no CHROMAS (versão 2.01, 2005, cópia livre, [www.technelysium.com.au](http://www.technelysium.com.au)).

Os produtos de PCR foram submetidos ao programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.shtml>) para análise de homologia com as seqüências disponíveis onde foram confirmadas as amostras representativas da proteína expressa pelo p53 da espécie canina.

O alinhamento de nucleotídeos/proteínas foi obtido através de programa Multalin (CORPET, 1988), disponível em: <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>. Escolheu-se de cada amostra a seqüência, sense ou antisense, que apresentou a melhor taxa de homologia com as seqüências da proteína p53 canina depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Inicialmente foram alinhadas as amostras de cadelas normais para identificar a região da proteína mais conservada em cada exon e que seria utilizada para a busca por mutações nas amostras de cadelas com tumor de mama.

Cada uma das amostras foi comparada com a seqüência de nucleotídeos do gene p53 canino (GenBank - S77819) a fim de analisar as diferenças encontradas entre as seqüências, considerando, inserções, deleções e trocas de bases, conforme o códon.

A frequência dos tipos de mutações foi analisada através do teste de comparação de proporções (REIS, 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Das 185 amostras amplificadas (Fig. 1), 174 foram seqüenciadas com os oligonucleotídeos sense, tendo 94,0% de aproveitamento e, dentre elas, 107 amostras (61,5%) apresentaram homologia com a proteína p53 canina (GenBank - AAB42022.1). Das 174 amostras seqüenciadas com o oligonucleotídeo iniciador antisense, 169 (97,1%) foram seqüenciadas e, destas, 71,0% apresentaram homologia com a proteína p53 canina (Tab. 2). A homologia entre as seqüências e a proteína foi, em média, de 86,3%, uma taxa alta que demonstra a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados.

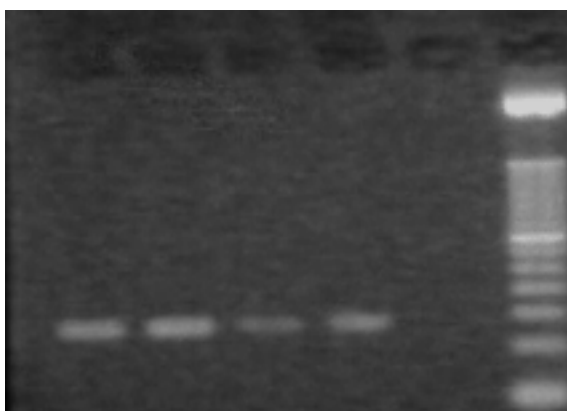


Figura 1 – Foto de gel de agarose a 2% referente às amostras amplificadas com o oligonucleotídeo 4S1.

As seqüências de DNAs das cadelas normais, transcritas em aminoácidos e alinhadas com a proteína p53 canina, permitiram selecionar as áreas mais conservadas em cada exon e definir a posição dos códons na seqüência de nucleotídeos.

A quantidade de amostras seqüenciadas em cada exon variou de acordo com o grupo estudado (Tab.2), sendo observado um resultado inferior com as seqüências

amplificadas com o oligonucleotídeo 6S. Neste caso, apesar da amplificação ter sido obtida pela mudança da temperatura para 55°C, diferente dos 58°C propostos por Chu et al. (1998), a maioria das amostras não teve sequenciamento satisfatório, demonstrando uma possível instabilidade deste exon que de fato tem sido pouco utilizado pelos autores (MAYR et al., 1994; KRAEGEL et al., 1995; MAYR et al., 1997) que estudaram as mutações nos sítios quentes do gene p53 canino, ou seja, entre os exons 5 e 8 (CHU et al. 1998).

Tabela 2 – Número de amostras amplificadas e enviadas para sequenciamento (AS), seqüenciadas (Seq) e com homologia para a proteína p53 canina (p53) e respectivos percentuais (%) conforme os grupos e os exons estudados

EXON	CA					MNCA					CS					MNCS					CN				
	AS	Seq	%	p53	%	AS	Seq	%	p53	%	AS	Seq	%	p53	%	AS	Seq	%	p53	%	AS	Seq	%	p53	%
4S1	9	9	100,0	9	100,0	8	8	100,0	7	87,5	7	7	100,0	6	85,7	7	7	100,0	7	100,0	6	6	100,0	4	66,7
4S2	8	8	100,0	1	12,5	7	7	100,0	6	85,7	5	5	100,0	0	0	7	7	100,0	5	71,40	5	4	80,0	4	80,0
5S1	5	5	100,0	5	100,0	7	7	100,0	6	85,7	3	3	100,0	3	100,0	2	2	100,0	2	100,0	0	0	0	0	0
5S2	0	0	0	0	0	9	9	100,0	5	55,5	0	0	0	0	0	7	7	100,0	3	42,8	5	5	100,0	5	100,0
6S	1	1	100,0	1	100,0	9	2	22,2	0	0	1	1	100,0	1	100,0	7	4	57,1	1	14,3	6	6	100,0	6	100,0
7S	5	4	80,0	4	80,0	5	5	100,0	5	100,0	3	3	100,0	3	100,0	3	3	100,0	3	100,0	1	1	100,0	0	0
8S	9	9	100,0	9	100,0	8	8	100,0	7	87,5	7	7	100,0	4	57,1	6	6	100,0	6	100,0	6	6	100,0	6	100,0
Total	37	36	97,3	29	80,5	53	46	86,8	36	78,3	26	26	100,0	17	65,4	39	36	93,9	27	75,0	29	28	96,5	25	89,3

CA-carcinoma; MNCA- mama normal lateral ao carcinoma; CS – carcinosarcoma; MNCS-mama normal lateral ao carcinosarcoma; CN – cadelas normais

A análise comparada de 214 seqüências de nucleotídeos, de todas as amostras para cada grupo e exons, com o gene p53, revelou que 32 (14,9%) delas não apresentavam alterações na região conservada de cada exon.

Dentre as mutações observadas, as mais freqüentes, em todos os exons, foram as missense (Tab. 3) para todos os grupos, inclusive com observação de mais de uma mutação por exon na mesma amostra. Estas mutações também foram as mais freqüentes nos tumores estudados por Wong et al. (1999) e Muto et al. (2000). Por outro lado, Muto et al. (2000) identificaram freqüência de 20% nas mutações missenses, mais baixa do que as observadas neste trabalho, porém deve ser considerado que estes autores utilizaram apenas as seqüências de três exons (5, 7 e 8). Enquanto Kanaya et al. (2002) não encontraram mutações no p53 de tumores mamários em humanos, Chu et al. (1998) identificou 15% de mutações no p53 dos carcinomas.

A alta freqüência de amostras com mutações (85%) nas cadelas com tumores, tanto nas mamas afetadas como nas aparentemente normais, comparada aos resultados obtidos por outros autores pode ser devido ao estágio de desenvolvimento dos tumores que se encontravam bastante adiantados, até 20 cm de diâmetro, sem o risco de contaminações por células não neoplásicas conforme foi salientado por Chu et al. (1998). Os outros autores não fizeram menção sobre as características macroscópicas dos tumores (MAYR et al., 1994; KRAEGEL et al., 1995; MAYR et al., 1997; CHU et al., 1998; WONG et al., 1999; MUTO et al., 2000).

As mamas normais laterais aos tumores apresentaram mutações missense similares às encontradas nos tumores estudados (Tab. 3), demonstrando que as alterações podem estar presentes precocemente nos tecidos, antes mesmo que possam ser detectadas no exame citológico ou histopatológico.

Com relação às mutações nonsense, apesar de terem ocorrido em pequeno número, observou-se que todos os casos foram referentes às amostras de mama normal das cadelas que já apresentavam carcinomas ou carcinosarcomas. A presença destas mutações pode representar um

alto risco de aparecimento do tumor nestas mamas, pois as mutações nonsense inserem um código de parada na tradução do RNA e, portanto, o peptídeo completo não se forma.

Tabela 3 – Número (n) e porcentagem dos tipos de mutações encontradas nas seqüências amplificadas para 7 exons do gene p53 canino, conforme o grupo de tumor de mama canino

Tipos de mutações	CA		MNCA		CS		MNCS		Total %	
	n	%	N	%	N	%	n	%	n	
Missence	31	70,4	46	73,0	38	86,4	44	73,3	159	74,6
Nonsense	0	0	5	7,9	0	0	4	6,7	9	4,2
Silenciosa	1	2,3	2	3,2	5	6,8	5	8,4	13	6,1
Sem alteração	12	27,3	10	15,9	3	6,8	7	11,6	32	15,1
<b>Total</b>	<b>44</b>	<b>100,0</b>	<b>63</b>	<b>100,0</b>	<b>44</b>	<b>100,0</b>	<b>60</b>	<b>100,0</b>	<b>213</b>	<b>100,0</b>

CA-carcinoma; MNCA- mama normal lateral ao carcinoma; CS – carcinosarcoma; MNCS-mama normal lateral ao carcinosarcoma

Considerando as mutações identificadas neste estudo (Tab. 4), os exons 5S1 e 8S foram os mais alterados com 23,2% e 24,9% das mutações, respectivamente, estando de acordo com os resultados obtidos por Chu et al. (1998), Muto et al. (2000) e Lee e Kweon (2002), que afirmaram ser os exons 5, 7 e 8, regiões de sítio quente para as mutações. Por outro lado, Mayr et al. (2000) estudaram o exon 1 e não detectaram mutações neste trecho do gene, o que corrobora as afirmações dos outros autores sobre os sítios quentes. Apesar dos exons 5 e 8 terem apresentado a maior ocorrência de mutações, os resultados deste trabalho demonstraram que há uma taxa de mutação relevante no exon 4 (8,8% - 4S1 e 16,6% - 4S2). No estudo realizado por Setoguchi et al. (2001), com vários tipos de tumores caninos, foram identificados 49 mutações e destas 37 (75,5%), estavam localizadas na área de domínio central do gene p53 canino, que corresponde aos exons 4 a 8 do gene p53 humano, os mesmos utilizados neste estudo e que apresentaram 85% de mutações.



Tabela 4 – Número e percentual de mutações encontradas em cada exon do gene p53 de mamas caninas com tumores

Exon	Classificação da mutação				Total	%
	Missence	Nonsense	Silenciosa			
4S1	16	0	0		16	8,8
4S2	23	3	4		30	16,6
5S1	38	0	4		42	23,2
5S2	9	3	1		13	7,2
6S	4	0	0		4	2,2
7S	27	0	4		31	17,1
8S	42	3	0		45	24,9
<b>TOTAL</b>	<b>159</b>	<b>9</b>	<b>13</b>		<b>181</b>	<b>100,0</b>

Considerando as mutações missenses e nonsense, as alterações de nucleotídeos mais freqüentes foram as deleções de G (13,9%) e C (12,8%) e as inserções de A (10,7%) e T (13,3%). A partir destes resultados foi possível identificar as mudanças nas bases e conseqüentemente nos aminoácidos.

Quando a inserção ou deleção ocorreu na terceira base e não alterou o aminoácido, foi considerada silenciosa (7,18%), por outro lado quando estas mutações alteraram a leitura dos códons subseqüentes, foram consideradas missenses. Setoguchi et al. (2001) observaram que a deleção de uma base (G) resultou na alteração dos 29 aminoácidos da seqüência da proteína.

Nas trocas das bases, detectou-se, na maioria, transversões (22,1%) e menor número de transições (12,7%), discordando dos achados de Lee e Kweon (2002) que encontraram maior porcentagem (16,66%) de transição. Comparando os grupos estudados, observou-se que esta proporção se manteve exceto para as mamas acometidas por carcinoma, onde as transições foram em maior número.

Na Tabela 5 estão apresentadas as trocas de aminoácidos que ocorreram em função das mutações observadas nos diferentes exons e grupos. A repetição da mutação nos mesmos códons de

um exon se identifica com os pontos quentes sujeitos às alterações gênicas, sugerindo que ocorreram alterações na função da proteína p53.

Foram consideradas as mutações nos pontos quentes do gene p53 canino, aquelas que apresentavam mais de uma alteração no mesmo códon. Nos carcinomas os códons que apresentaram mais de uma mutação e suas respectivas mudanças de aminoácidos foram o 109 (Val→Ser ou Val→Gly), 230 (Gly→Val ou Gly→Asp), nas mamas normais laterais ao carcinoma as alterações ocorreram nos códons 77 (Leu→Cys ou Leu→Thr), 96 (Phe→Val ou Phe→Leu), 134 (Glu→Stop ou Glu→Ala), 138 (Arg→Ser ou Arg→Cys), 232 (Asn→Thr) e 244 (Arg→Glu ou Arg→Stop). Nos carcinosarcomas os códons mais acometidos de mutações foram o 35 (Asp→Met), 93 (Asn→Ser), 109 (Val→Ser ou Val→Gly), 212 (Arg→Pro) e 251 (Glu→Val ou Glu→Asn). Nas mamas normais laterais aos carcinosarcomas os códons que sofreram mais alterações foram o 35 (Asp→Met), 73 (Arg→Val), 77 (Leu→Thr ou Leu→Cys), o 87 (Trp→Stop ou Trp→Cys), 135 (Val→Asp), 230 (Glu→Asp ou Glu→Val), 231 (Arg→Leu ou Arg→Leu) e o 252 (Asn→Ile ou Asn→Lys), conforme tabela 5.

Apesar da existência de repetições de mutações no mesmo códon, foi demonstrado que há uma variação entre os códons mutados, pois, conforme Hainaut e Hollstein (2000), as mutações podem estar distribuídas em mais de 250 códons da p53.

Tabela 5 – Descrição das mutações com as respectivas alterações nos aminoácidos e códons de cada exon e grupo de tumores de mama em cadelas

Exons	Grupos							
	CA		MNCA		CS		MNCS	
	AA	Códon	AA	Códon	AA	Códon	AA	Códon
4S1	GAT→ATG Asp→Met	35	-	-	CCA→ACCA	14	CTA→TAG	29
					Pro→Thr		Leu→Thr	
					GTG→AGTG	16	GAT→ATG	35
					Val→Ser		Asp→Met	
					CCA→CACA	22	GAT→ATG	35
					Pro→His		Asp→Met	
					GAG→AGAAG	23	GCT→TCT	36
					Glu→Arg		Ala→Ser	
					GAT→ATG	35	AGG→ACG	38
					Asp→Met		Arg→Thr	
4S2	TTC→GTTC Phe→Val	76	CGT→GTT	73	-		TTC→TCC	72
			Arg→Val				Phe→Ser	
			CTG→TGC	77			CGT→GTT	73
			Leu→Cys				Arg→Val	
			CTG→ACTG	77			CGT→GTT	73
			Leu→Thr				Arg→Val	
			GCC→AGCC	82			CTG→ACTG	77
			Ala→Ser				Leu→Thr	
			GTT→GCTT	85			CTG→TGC	77
			Val→Ala				Leu→Cys	
			TGG→TGA	87			ACT→CCT	86
			trp→Stop				Thr→Pro	
							TGG→TGA	87
		Trp→Stop						
		TGG→TGA	87					
		Trp→Stop						
		TGG→TGC	87					
		Trp→Cys						
5S1	CCT→CTC	90	AAG→AGA	94	TCC→GCC	89	GTC→TCA	109
	Pro→Leu		Lys→Arg		Ser→Ala		Val→Ser	
	CTC→ATC	91	TTG→ATT	95	TCC→GCC	90	AAT→AAGT	116
	Pro→Ile		Leu→Ile		Ser→Ala		Asn→Lys	
	CTC→CATC	92	TTT→GTG	96	AAC→AGC	93		
	Leu→His		Phe→Val		Asn→Ser			
	AAG→AGA	94	TTT→TTA	96	AAG→AGT	94		
	Lys→Arg		Phe→Leu		Lys→Ser			
	GTC→TCA	109	TGC→TTG	97	CAG→AGC	98		
	Val→Ser		Cys→Leu		Gln→Ser			
	GTC→TCA	109	GTC→TCA	109	TGC→GCC	103		
	Val→Ser		Val→Ser		Cys→Ala			
	GTC→TCA	109	AGC→ATC	110	TGG→TGT	108		
	Val→Ser		Ser→Ile		Trp→Cys			
	GTC→TCA	109	AAT→AAGT	116	GTC→TCA	109		
Val→Ser		Asp→Lys		Val→Ser				
GTG→GGG	109			GTC→GGT	109			
Val→Gly				Val→Gly				
				AAT→AAGT	116			
				Asn→Lys				
5S2	-		GTG→TGTG	132	-		AAG→TAA	127
			Val→Cys				Lys→Stop	
			GAG→TGAG	134			GTT→GATT	135
			Glu→Stop				Val→Asp	
			GAG→TGAG	134			GTT→GATT	135
			Glu→Stop				Val→Asp	
			GAG→GCAG	134				
			Glu→Ala					
			GAG→GCAG	134				
			Glu→Ala					
			CGC→TCGC	138				
Arg→Ser								
CGC→TGC	138							
Arg→Cys								
CAC→ACC	141							
His→Thr								
6	CTG→TGG Leu→Trp	170	-	-	CTG→TGG Leu→Trp	170	GTG→GGTG Val→Gly	181
7	ACC→CAT	195	TCT→TTG	191	CCA→CTA	186		
	Thr→His AAC→CAAC	199	Se→Leu ACC→AAC	194	Pro→Leu GAG→CAG	188	-	-

	Asn→Gln ATG→ATTG Met→Ile GGA→GAG Gly→Glu AAC→AAAC Asn→Lys CGG→TCGG Arg→Ser	207 208 211 213	Thr→Asp ACC→CAT Thr→His ATC→TATC Ile→Tyr	195 218	Glu-Gln ACC→CCAT Thr→Pro TGT→TCGT Cys→Ser CGG→CGT Arg→Pro CGG→CGT Arg→Pro ACT→AACT Thr→Asn ACC→AAC Thr→Asn	195 202 212 212 217 220		
8	GGA→GTA Gly→Val GGA→GAC Gly→Asp GAC→AGA Asp→Arg GAG→GTAG Glu→Val GAG→AGG Glu→Arg	230 230 245 251 258	CTG→TCTG Leu→Ser GGA→GAC Gly→Asp AAC→ACA Asn→Thr AAC→ACA Asn→Thr AGC→ATGC Ser→Met CGC→GCGC Arg→Ala GTT→AGCTT Val→Ser CCC→CACC Pro→His AGA→GAAGA Arg→Glu GAG→TGAG Arg→Stop AGA→TAGA Arg→Stop GAC→GAGC Asp→Glu	229 230 232 232 233 237 238 242 244 250 244 245	GGA→GAC Gly→Asp CGC→GCGC Arg→Ala GAC→GAGC Asp→Glu GAG→GTAG Glu→Val GAG→GATG Glu→Asn AAT→ATAT Asn→Ile	230 231 245 251 251 252	GGA→GAC Gly→Asp GGA→GTA Gly→Val CGC→GCGC Arg→Ala CGC→CTGG Arg→Leu AAC→ACA Asn→Thr AGC→ATGC Ser→Met GTT→AGCTT Val→Ser CGC→CGTC Arg→Val CGG→CCGG Arg→Pro AAT→AT Asn→Ile AAT→AAGT Asn→Lys AAG→AATG Lys→Asn AAG→TAAG Lys→Sotp GAG→AGC Glu→Ser	230 230 231 231 231 232 233 238 246 247 252 252 255 256 258

As mutações missense e nonsense nas seqüências do material proveniente de tumores mamários podem resultar em alterações na estrutura tridimensional da proteína p53. Wong et al. (1999) demonstraram que proteínas p53 mutantes na espécie humana, apresentam alterações no domínio central de ligação ao DNA que comprometem sua conformação e conseqüentemente a atividade da proteína. Estas mutações estão relacionadas especialmente com os códons 248 e 273, que codificam o aminoácido arginina, responsável pela ligação da proteína ao DNA (Fig. 2) e os códons 143 e 175 que garantem a conformação adequada para esta ligação (LEVINE, 1997).

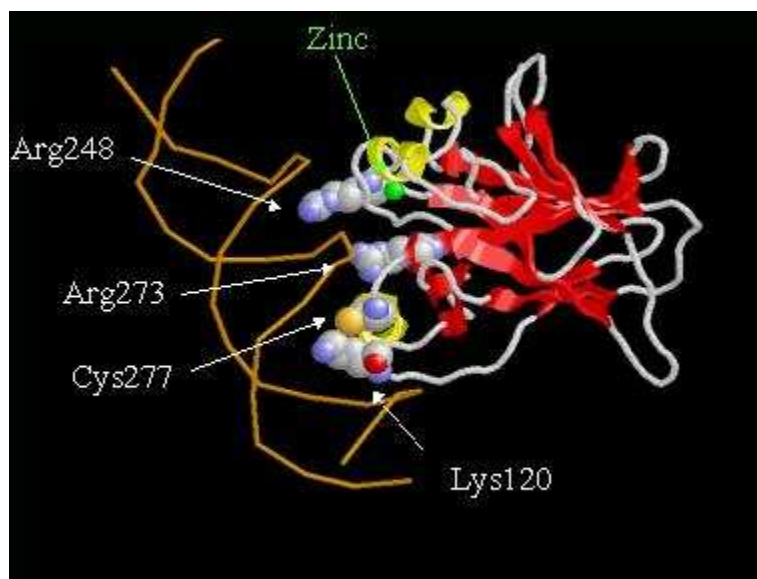


Figura 2 – Esquema ilustrativo da proteína do p53 humano e os aminoácidos da área de domínio central de ligação ao DNA com seus códons 120, 248, 273 e 277, os quais correspondem aos códons 83, 212, 237 e 241, respectivamente, na espécie canina.  
Fonte: [http://www.geocities.com/apinop\\_hospital/esocancer/pic03.html](http://www.geocities.com/apinop_hospital/esocancer/pic03.html)

Considerando a homologia existente entre as seqüências caninas (Tab. 6) e entre diferentes espécies para o gene p53 (Fig. 3), foi realizado o alinhamento das seqüências dos nucleotídeos do gene p53 depositadas no GenBank para as espécies humana, canina, suína, ovina, bovina, eqüina e murina a fim de detectar o percentual de homologia destas com a seqüência de p53 utilizada para as análises deste trabalho. A homologia observada entre as espécies humana e canina foi de 86%, estando acima do relatado por Chu et al. (1998), que identificaram 81% e Setoguchi et al. (2001), 79,7%, porém similar a Veldhoen e Milner (1998) que relataram 86,3% de homologia entre o gene p53 canino e humano. Além da espécie humana observa-se que há alta homologia deste gene canino com o mesmo gene de eqüinos (88%), suínos (86%), ovinos e bovinos (84%) e camundongos e ratos (81%).

As seqüências do gene p53 são compostas de 828 e 883 nucleotídeos, respectivamente para canino e humano, sendo que o trecho com identidade obtida no BLAST, foi de apenas 626 nucleotídeos, Veldhoen e Milner (1998) e Kraegel et al. (1995) justificaram esta diferença de

tamanho nas seqüências como sendo devida à deleções nas regiões ricas em prolina do p53 canino, que ocorreram durante a evolução.

A partir desta homologia com a espécie humana foi possível analisar os códons que na espécie canina estão relacionados com a ligação da proteína ao DNA (Fig.2), ou seja, 212 e 237, bem como os responsáveis pela conformação estrutural que estão nas posições 106 e 138, todos no domínio central da ligação ao DNA. Apesar de apenas algumas amostras terem apresentado mutações nestes códons, a maioria das alterações se localizaram em códons próximos e, além disso, as inserções e deleções de nucleotídeo, predominantes entre as mutações missenses, provavelmente acarretam a leitura incorreta da seqüência e conseqüente comprometimento da estrutura e função do peptídeo (WALKER e RAPLEY, 1999; KREUZER e MASSEY, 2002).

		<b>II</b>	150
	101		
Canino	SSVPSPKTYPGTYGFRLGFLHSGTAKSVTWTYSPLLNKLFQLAKTCPVQ		
Humano	SSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ		
Bovino	SFVPSQKTYPGNYGFRLGFLQSGTAKSVTCTYSPSLNKLFCQLAKTCPVQ		
Ovino	SFVPSQKTYPGNYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPSLNKLFCQLAKTCPVQ		
Suino	SFVPSQKTYPGSYDFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKLFCQLAKTCPVQ		
Rato	SSVPSQKTYQGNYGFLGFLQSGTAKSVMCTYSISLNKLFQLAKTCPVQ		
Camundongo	SFVPSQKTYQGNYGFLGFLQSGTAKSVMCTYSPPLNKLFCQLAKTCPVQ		
Equino	.....CQLAKTCPVQ		
Consenso	s.vpsqkty.g.ygfrlgfl.sgtaksvtctysp.lnklfqCQLAKTCPVQ		
		<b>III</b>	200
	151		
Canino	LWVSSPPPPNTCVRAMAIYKKSEFVTEVVRRCPHHERCSDSSDGLAPPQH		
Humano	LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSD.SDGLAPPQH		
Bovino	LWVDSPPPPGTRVRAMAIYKKLEHMTEVVRRCPHHERSSDYSDGLAPPQH		
Ovino	LWVDSPPPPGTRVRAMAIYKKLEHMTEVVRRCPHHERSSDYSDGLAPPQH		
Suino	LWVSSPPPPGTRVRAMAIYKKSEYMTEVVRRCPHHERSSDYSDGLAPPQH		
Rato	LWVTSTPPPGTRVRAMAIYKKSQHMTEVVRRCPHHERCSD.GDGLAPPQH		
Camundongo	LWVSATPPAGSRVRAMAIYKKSQHMTEVVRRCPHHERCSD.GDGLAPPQH		
Equino	LLVSSPPPPGTRVRAMAIYKKSEFMTEVVRRCPHHERCSDSSDGLAPPQH		
Consenso	LwVsspPppgtrVRAMAIYKks#.mTEVVRRCPHHERcSD.sDGLAPPQH		
		<b>IV</b>	250
	201		
Canino	LIRVEGNLRAKYLLDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDYTTIHYNMCMNSSCM		
HUMANO	LIRVEGNLREYLLDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTTIHYNMCMNSSCM		
Bovino	LIRVEGNLRAEYLLDRNTFRHSVVVPYESPEIDSECTTIHYNMCMNSSCM		
Ovino	LIRVEGNLRAEYFDDRNTFRHSVVVPYESPEIESECTTIHYNMCMNSSCM		
Suino	LIRVEGNLRAEYLLDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTTIHYNMCMNSSCM		
Rato	LIRVEGNPYAEYLLDRQTFRHSVVVPYEPPEVGSDYTTIHKYMCMNSSCM		
Camundongo	LIRVEGNLYPEYLEDQRQTFRHSVVVPYEPPEAGSEYTTIHKYMCMNSSCM		
Equino	LIRVEGNLRAEYLLDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTTIHYNMCMNSSCM		
Consenso	LIRVEGNlraeYL#DR#TFRHSVVVPYEpPEvgS#cTTIHYN%CMNSSCM		
		<b>V</b>	300
	251		
Canino	GGMNRRPILTIITLEDSSGNLGRNSFEVRVCACPRDRRTEEENFRKKG		
Humano	GGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPRDRRTEKENLRKKG		
Bovino	GGMNRRPILTIITLEDSCGNLLGRNSFEVRVCACPRDRRTEEENLRKKG		
Ovino	GGMNRRPILTIITLEDSRGNLLGRSSFEVRVCACPRDRRTEEENFRKKG		
Suino	GGMNRRPILTIITLEDASGNLLGRNSFEVRVCACPRDRRTEEENFLKKG		
Rato	GGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRDSFEVRVCACPRDRRTEEENFRKKE		
Camundongo	GGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRDSFEVRVCACPRDRRTEEENFRKKE		
Equino	GGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPRDRRTEEENFRKKE		
Consenso	GGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGR#SFEVRVCACPRDRRTEeENfrKKG		

Simbolos do Consenso: ! = I ou V; \$ = L ou M; % = F ou Y; # = qualquer NDQEBZ

Figura 3 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína p53 de diferentes espécies, com destaque (barra) aos domínios (II a V) que se mantiveram conservados entre as espécies.

Tabela 6- Relação de tamanho em aminoácidos (aa) e percentual de homologia entre as seqüências de p53 canina depositadas no GenBank

Nome	Tamanho(aa)	Nome	Tamanho(aa)	Homologia (%)
AAB42022.1	276	AAB16961.1	285	94
AAB42022.1	276	AAC37335.1	281	74
AAB42022.1	276	AAD42225	246	79
AAB42022.1	276	AAC16909	381	100
AAB42022.1	276	BAA78379	381	100
AAB16961.1	285	AAC37335.1	281	71
AAB16961.1	285	AAD42225	246	77
AAB16961.1	285	AAC16909	381	92
AAB16961.1	285	BAA78379	381	92
AAC37335.1	281	AAD42225	246	99
AAC37335.1	281	AAC16909	381	100
AAC37335.1	281	BAA78379	381	100
AAD42225	246	AAC16909	381	99
AAD42225	246	BAA78379	381	99
AAC16909	381	BAA78379	381	99

Os resultados deste estudo indicaram que as alterações no gene p53 estão envolvidas na carcinogênese do tumor mamário canino. Além disso, as alterações podem estar presentes precocemente nos tecidos, pelo fato das mutações terem sido detectadas não somente nos tumores, mas também nas mamas macroscópica e histologicamente normais, laterais aos tumores. Isto pode justificar a retirada cirúrgica de toda a cadeia mamária do lado afetado a fim de evitar as recidivas e servir como uma ferramenta de diagnóstico precoce para tumores mamários caninos.

O conhecimento dos eventos moleculares da tumorigênese canina irá proporcionar melhor entendimento do câncer nesta espécie. Considerando que os cães apresentam frequência de tumor mamário maior do que na mulher e que dividem com os humanos o mesmo habitat e, em alguns casos, estão sujeitos aos mesmos fatores de risco (dieta, fatores ambientais, estresse, etc), e que há uma alta homologia da p53 canina com a humana, pode ser indicada a utilização da espécie canina como modelo de estudo para as neoplasias de mama humana.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARIC, O.; BRET, L.; AMARDEIHL, M.; DELVERDIER, M. Immunohistochemical expression of p53 in animal tumors: a methodological study using four anti-human p53 antibodies. **Histology and Histopathology: Cellular and Molecular Biology**, Murcia, v.16, p. 113-121, 2001.
- CASSALI, G. D. Patologia da glândula mamária. In: NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 12, p. 119-133.
- CAVALCANTI JÚNIOR, G.B.; KLUMB, C.E.; MAIA, R.C. p53 e as hemopatias malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v.48, n.3, p. 419-427, 2002.
- CHU, L.L.; RUTTEMAN; G.R., KONG; J.M.C.; GHAREMANI, M.; SCHMEING, M.; MISDORP, W.; VAN GARDEREN, E.; PELLETIER, J. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutation status in canine mammary neoplasia. **Breast Cancer Research Treatment**, Haque, v. 50, p. 11-25, 1998.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, n. 22, p. 10890-10890, 1988.
- COTRAN, R.S.; KUMAR,V.; ROBBINS, S.L. **Patología estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 6 ed. 1400p.
- DOBSON, J. M.; Princípios da terapia do cancer. In: DUNN, J. K. **Tratado de Medicina Veterinária de Pequenos Animais**. São Paulo: Ed. Rocca, 2001. p. 979-1022.
- FARAH, S. B. DNA no diagnóstico de doenças humanas. In: **DNA segredos e mistérios**. São Paulo: Sarvier, cap. 5, p. 103-140, 2000.
- FARIAS, R.E; SOUZA, A. R.; ARESTRUP, F. M. Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 209-218, 2005.
- FETT-CONTE, A.C.; SALLES, A.B.C.F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.24, n.2, 2002. Disponível: [www.sielo.com.br](http://www.sielo.com.br). Acesso em: 09/02/2006.
- HAGA, S.; NAKAYAMA, M.; TATSUMI, K.; MAEDA, M.; IMAI, S.; UMESAKO, S.; YAMAMOTO, H. HILGERS, J.; SARKAR, N. H. Overexpression of the p53 gene product canine mammary tumors. **Oncology reports**, v. 8, p. 1215-1219, 2001.
- HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. p53 and human cancer: the first thousand mutations. **Advances in Cancer Research**, New York, v. 77, p. 81-137, 2000.
- ITOH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K. KUSHIMA, K. KUSHIMA, E. TAMADA, H. MORITAKE, T. NAKAO, H.; SHII, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 67, n. 3, p. 345-347, 2005
- KANAYA, N.; OKUDA, M.; TOYAMA, N.; OIKAWA, T.; INOKUMA, H.; MORIMOTO, M.; HAYASHI, T.; UNE, S.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y.; TSUJIMOTO, H.; ONISHI, T. Detection of anti-p53 antibodies in dog with tumors. **Journal Veterinary Medicine Science**, Tokyo, v.64, n.11, p. 973-979, 2002.
- KARAYANNOPOULOU, M.; KAALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 133, p. 246-252, 2005.

- KRAEGEL, S. A.; PAZZI, K. A.; MADEWELL, B. R. Sequence analysis of canine p53 in the region of exons 3 – 8. **Cancer Letter**, v. 92, p. 181-186, 1995.
- KREUZER, H.; MASSEY, A. A genética molecular do câncer. In: **Engenharia genética e biotecnologia**. 2ª ed. São Paulo: Artmédica, 2002. p.272-276
- LEE, C.; KWEON, O. K. Mutation of canine tumor supresor gene p53 in a mammary gland adenocarcinoma and a malignant mast cell tumor. **Journal Veterinary Clinical**, n. 19, v.2, p. 195-198, 2002.
- LEVINE, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, Cambridge, v. 88, p. 323-331, 1997.
- LEWIN, B. Ciclo celular e regulação do crescimento. In: **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001. cap. 27, p.799 – 829
- LOUKOPOULOS, P.; THORNTON, J.R.; ROBINSON, W.F. Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 40 p. 237-248, 2003.
- LOURO I.D. Oncogenética. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, n.11, p. 36-42, 2000.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., SAMBROOK, J. (Eds.) **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1-3, 1998.
- MAYR, B.; SCHELLANDER, K.; SCHLEGER, W.; REIFINGER, M. Sequence of an exon of the canine p53 gene-mutation in a papiloma. **British Veterinary Journal**, Vienna, v.150, n. 1, p.81-84, 1994.
- MAYR, B.; SCHELLANDER, K; BOTTO, I.; REIFINGER, M.; LOUPAL, G. Canine tumour suppressor gene p53-mutation in a case of adenoma of circumanal glands. **Veterinary Research Communications**, Viena, v.21, n.5, p. 369-373, 1997.
- MAYR, B.; RESCH, S.; HEPERLE, S.; BREM, G.; REIFINGER, M.; SCHAFFNER. Comparative studies in the promoter and exon 1 regions of tumor suppressor p53 in several mammalian species: Absence of in a panel of spontaneous domestic animal tumours. **Journal Veterinary Medicine**. Vienna, v. 47, p. 593-597, 2000.
- MOURA-GALLO, C. V.; SIMÃO, T. A.; RIBEIRO, F. S.; SERPA, M. J. A.; CARDOSO, L. E. B.; MENDONÇA, G. A. S. Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Rio de Janeiro, v.7, n.2, p.167-175 , 2004.
- MUTO, T.; WAKUI, S.; TAKAHASHI, H.; MAEKAWA, S.; MASAOKA, T.; USHIGOME, S.; FURUSATO, M. p53 Gene Mutations Occurring in Spontaneous Benign and Malignant Mammary Tumors of the Dog. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 37, p. 248–253, 2000.
- NETO, L. Z. Neoplasias malignas em cães. Sua analogia com alguns processos idênticos na espécie humana. **UNIMAR CIÊNCIAS**, Marília, v. 1, p. 4-9, 1992.
- NETO, L. N. **Tumores mamários malignos na cadela**. São Paulo: Arte & Ciência, 1997.144p.
- O'KEEFE, D. A. Tumores do sistema genital e glândulas mamárias. In: ETTINGER, S. A.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, p. 2344 – 2351
- PAZZI, A. K; KRAEGEL, S. A.; GRIFFEY, S. M.; THEON, A. P.; MADEWELL, B.R. Analysis of the equine tumor suppressor gene p53 in the normal horse and in eight cutaneous squamous cell carcinomas. **Cancer Letter**, California, v. 107, p. 125-130, 1996.

- PÉREZ, A. M. D.; TABANERA, E.; PEÑA, L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 219, n. 15, p. 1110 – 1114, 2001.
- QUEIROGA, F. L.; PÉREZ-ALENZA, M. D.; SILVAN, G.; PEÑA, L.; LOPES, C.; ILLERA, J. C. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, n. 94, p. 181-187, 2005.
- REIS, J.C. **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. Olinda: Luci Artes Gráficas, 2003. 651p.
- SETOGUCHI, A.; SAKAI, T.; OKUDA, M.; MINIHATA, K.; YAZAWA, M.; ISHIZAKA, T.; WATARI, T.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; HASEGAWA, A.; TSUJIMOTO, H. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, n.3, p. 433-439, 2001.
- VELDHOEN, N.; MILNER, J. Isolation of canine p53 cDNA and detailed chracterization of full length canine p53 protein. **Oncogene**, Basingstoke, v. 16, p. 1077-1084, 1998.
- WALKER, M.R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu, 1999. 334p.
- WONG, K.; DEDECKER, BS.; FREUND, S.M.V.; PROCTOR, M.R.; BYCROFT, M.; FERSHT, A.R. Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. **Proceedings of the National Academy of Science. U.S.A.**, Washington, v.96, n. 15, p.8438-8442, 1999.
- YORIKO, J.; TEIXEIRA, L. C.; GURGEL, M. S. C.; ALVARENG, M.; BRENELLI, H. B. Correlação entre a expressão da proteína p53 e a resposta a quimioterapia primária no carcinoma mamário. **Acta Oncológica Brasileira**, São Paulo, v.20, n.1, p. , 2000.
- ZUCCARI, A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 38, n.1, p. 38-41, 2001a.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta malignidade dos tumores mamários em cadelas, comprovada neste trabalho pela presença de carcinomas e carcinosarcomas em maior frequência, ressalta a importância dos estudos a respeito desta patologia nesta espécie, uma vez que comprometem a qualidade de vida destes animais. É importante considerar que a detecção de células neoplásicas em mamas macroscopicamente normais reflete a importância da retirada precoce das mamas adjacentes, em animais que apresentam nódulos mamários.

O envolvimento do gene p53 no controle das neoplasias torna-se notório, especialmente nas mamas afetadas, mas também como indicativo precoce de mutações em mamas que são consideradas histologicamente normais.

Diante dos resultados encontrados podemos considerar a pesquisa com o gene p53 de grande importância para o estudo e conhecimento dos cânceres.

Fundamentalmente a identificação precoce desta doença, carece de respostas rápidas, a fim de controlar seu desenvolvimento e evitar que outras áreas sejam atingidas através das metástases.

O sucesso do tratamento está diretamente relacionado com o diagnóstico tumoral, muito antes que tenham a chance de se transformar em uma ameaça à vida. E o conhecimento da biologia molecular, permite melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese, tornando-se um importante instrumento para aprimorar e padronizar técnicas de detecção das mutações que desencadeiam a progressão tumoral.

A importância médica deste gene é inegável, pela detecção de mutações nos tecidos tumorais estudados indicando ser um alvo perfeito para prevenção, estimulando as abordagens de terapia gênica.

Este trabalho caracteriza o início de uma linha de pesquisa, cujos resultados serão necessários para que o conhecimento e, principalmente, o entendimento perfeito de todas as possibilidades de interação de um determinado gene em seu sistema, possa estabelecer uma

metodologia de reparo genético de um desarranjo funcional, visando o restabelecimento do fenótipo normal fisiológico ou, no caso das células tumorais, seu extermínio, levando-as à apoptose, ao mesmo tempo que se poupa as células normais ao redor delas.

A história da biologia molecular e de sua evolução exuberante nesta última década traz inúmeras possibilidades futuras de entendimento, de controle e de cura, a qual nada mais é do que o restabelecimento da função normal de qualquer célula.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; et al. A mecânica da divisão celular. In: ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; et al. **Biologia molecular da célula**. São Paulo: Artes Médicas Sul, 1997. cap. 18, p. 911 – 946
- ARGYLE, D.J. The mammary gland. In: SIMPSON, G. **Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology**, Cheltenham: BSVA, 1998. cap. 5, p. 53-59
- BANKS, W. J. Sistema tegumentar. In: **BANKS Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1992, cap. 20, p. 391-424.
- BEGNAMI, M. D.; CAMPOS, A. H. J. M.; MONTAGNINI, A.; NASCIMENTO, C. F.; NONOGAKI, S.; SOAREAS, F. Expressão imunohistoquímica de c-erb-B<sub>2</sub> e p53 em carcinomas gástricos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 279-286, 2005.
- BHARAJ, B. S.; ANGELOPOULOU, K. DIAMANDIS, E. P. Rapid sequencing of p53 gene with a new automated DNA sequencer. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 44, n. 7, p. 1397, 1998.
- CAIRNS, J. The interface between molecular biology and cancer research. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 462, p.423-428, 2000.
- CARRUIDO, A. C. C.; SALAS Y.; ORLANDO, E.; MENDEZ, D. **Incidência de las neoplasias de glándula mamaria en caninos diagnosticadas por histopatología**. [www.monografias.com/trabajos15/tumores-caninos/tumores-caninos.html](http://www.monografias.com/trabajos15/tumores-caninos/tumores-caninos.html), 2003.
- CASSALI, G. D. Patologia da glândula mamária. In: NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 12, p. 119-133.
- CASSALI, G.D. **Estudos morfológicos, imunohistoquímicos e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. 2000. 73f. Tese (Doutorado em Ciência Animal – Patologia – Escola de Veterinária – UFMG).
- CAVALCANTI JÚNIOR, G.B.; KLUMB, C.E.; MAIA, R.C. p53 e as hemopatias malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v.48, n.3, p. 419-427, 2002.
- CHU, L.L.; RUTTEMAN; G.R., KONG; J.M.C.; GHAREMANI, M.; SCHMEING, M.; MISDORP, W.; VAN GARDEREN, E.; PELLETIER, J. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutation status in canine mammary neoplasia. **Breast Cancer Research Treatment**, Haque, v. 50, p. 11-25, 1998.
- COTRAN, R.S.; KUMAR,V.; ROBBINS, S.L. **Patología estructural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 6 ed. 1400p.
- CUNNINGHAM, J. G. A glândula mamária. In: **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.cap. 38, p. 417-430
- DAL BELLO, C. P.; SOUZA, G.; LAURENTI, M.; SOUZA, T. V. G. **Aconselhamento genético no cancer**. 2002 [http://www.sitemedico.com.br/artigos/estudantes/Famerp/ acons\\_gen2.asp](http://www.sitemedico.com.br/artigos/estudantes/Famerp/ acons_gen2.asp) Acesso em: 01/10/2002
- DALECK, C. R. Tumor mamário canino. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 2, v. 1, p.12-14, 1996.
- DE NARDI, A.B. ; RODASKI, S. ; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHERI, S.M. ; RIOS, A. ; PIEKARZ, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

- DOBSON, J. M.; Princípios da terapia do cancer. In: DUNN, J. K. **Tratado de Medicina Veterinária de Pequenos Animais**. São Paulo: Ed. Rocca, 2001. p. 979-1022.
- DONNAY, I.; DEVLEESCHOUWER, N.; WOUTERS-BALLMAN, P.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. **Research in Veterinary Science**, London, v. 60, p. 251-254, 1996.
- FARAH, S. B. DNA no diagnóstico de doenças humanas. In: **DNA segredos e mistérios**. São Paulo: Sarvier, cap. 5, p. 103-140, 2000.
- FARIAS, R.E; SOUZA, A. R.; ARESTRUP, F. M. Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 3, p. 209-218, 2005.
- FETT-CONTE , A.C.; SALLES, A. B. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Santos, v. 24, n. 2, p. 85-89, 2002.
- FOSSUM, T. W.; HEDLUND, C. S.; HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L.; SEIM, H. B.; WILLARD, M. D.; CARROLL, G. L. Cirurgia dos sistemas reprodutivos e genitais In: **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002. cap. 13, p. 571-637
- GENESER, F. Glândulas mamárias. In: GENESER, F. **Histologia**, 3ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 538-542
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014p.
- HAGA, S.; NAKAYAMA, M.; TATISUMI, K.; MAEDA, M.; IMAI, S.; UMESAKO, S.; YAMAMOTO, H. HILGERS, J.; SARKAR, N. H. Overexpression of the p53 gene product canine mammary tumors. **Oncology reports**, v. 8, p. 1215-1219, 2001.
- HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. p53 and human cancer: the first thousand mutations. **Advances in Cancer Research**, New York, v. 77, p. 81-137, 2000.
- HENDERSON, B.E.; FEIGELSON, H.S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n.3, p. 427-433, 2000.
- HENSON, K. L. Sistema reprodutor. In: RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Atlas de citologia de cães e gatos**, São Paulo: Roca, 2003. Cap. 11, p.233-250.
- HILL, K.A.; SOMMER, S. p53 as mutagen test in breast cancer. **Environment Molecular Mutagenesis**, New York, v. 39, p.216-217, 2002
- HOWARD, E. E.; DELAHUNTA. Abdome, pelve e membro pélvico. In: **Guia para a dissecação do cão**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001. p. 117-119
- HUNTER, T. Braking the cycle. **Cell**, Cambridge, v. 75, p. 839-841, 1993.
- KOLB, E. Fisiologia da Glândula Mamária. In: KOLB, E. (ed.) **Fisiologia Veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. p. 413-430.
- KRAEGEL, S. A.; PAZZI, K. A.; MADEWELL, B. R. Sequence analysis of canine p53 in the region of exons 3 – 8. **Cancer Letter**, Oxford, v. 92, p. 181-186, 1995.

- KREUZER, H.; MASSEY, A. A genética molecular do câncer. In: **Engenharia genética e biotecnologia**. 2ª ed. São Paulo: Artmed, 2002. p.272-276
- LEE, C.; KWEON, O. K. Mutation of canine tumor supresor gene p53 in a mammary gland adenocarcinoma and a malignant mast cell tumor. **Journal Veterinary Clinical**, n. 19, v.2, p. 195-198, 2002.
- LERA, J.M.; NAPAL, C.; DELGADO, M.G.; GARCÍA, G.L.; ABASCAL, L.; VICENTE, F. **Detección de mutaciones en el gen p53 en el cancer de mama familiar y esporádico en la población Navarra**. <http://www.cfn Navarra.es/salud/anales>. Acesso em: 12/02/2006.
- LEWIN, B. Ciclo celular e regulação do crescimento. In: **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001. cap. 27, p.799 – 829
- LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M.; PRADO, C. B. C. Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista Brasileira de Ciências da Terra**, v. 2, n. 2, 2002.
- LOUKOPOULOS, P.; THORNTON, J.R.; ROBINSON, W.F. Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. **Veterinary Pathology**, Washington, n. 40 p. 237-248, 2003.
- LOURO I.D. Oncogenética. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, n.11, p. 36-42, 2000.
- LUIZ, C. R.; MIGLINO, M. A.; SANTOS, T.C. Segmentos anatômico-cirurgicos arteriais da glandula mamária em cães (canis familiaris, Linnaeus, 1758). **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.7, n.1, p. 27-36, 2002.
- MARQUES, N. B. **Avaliação dos hormônios tireoideanos de fêmeas da espécie canina com tumores de mama**. Recife, 2000. Dissertação Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- MIALOT, J. P. Patologia da mama. In: **Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos**. Porto Alegre: A Hora Veterinária, 1988. 160p.
- MIYASHITA, T.; KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKI, M.; WANG, H. G.; LIN, H. K.; LIBERMANN D. A. et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. **Oncogene**, Basingstoke, v. 9, p.1799-805, 1994.
- MORRISON, W.B. **Cancers in dogs and cats. Medical and surgical management**. Philadelphia: Willians & Wilkins, 1998. 785p.
- MOULTON, J.E. (Ed.) **Tumours in domestic animals**. 3 ed. Berkeley: University of California, 1990. 672p.
- MOURA-GALLO, C. V.; SIMÃO, T. A.; RIBEIRO, F. S.; SERPA, M. J. A.; CARDOSO, L. E. B.; MENDONÇA, G. A. S. Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Rio de Janeiro, v.7, n.2, p.167-175, 2004.
- MUTO, T.; WAKUI, S.; TAKAHASHI, H.; MAEKAWA, S.; MASAOKA, T.; USHIGOME, S.; FURUSATO, M. p53 Gene Mutations Occurring in Spontaneous Benign and Malignant Mammary Tumors of the Dog. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 37, p. 248–253, 2000.
- NETO, L. N. **Tumores mamários malignos na cadela**. São Paulo: Arte & Ciência, 1997.144p.
- NETO, L. Z. Neoplasias malignas em cães. Sua analogia com alguns processos idênticos na espécie humana. **Unimar Ciências**, Marília, v. 1, p. 4-9, 1992.



- O'KEEFE, D. A. Tumores do sistema genital e glândulas mamárias. In: ETTINGER, S. A.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, p. 2344 – 2351
- OLIVEIRA, E. C. S.; MARQUES JÚNIOR, A. P.; NEVES, M. M. A. Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela – revisão. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2003.
- PERERA, F. P.; WEINSTEIN, I.B. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, p. 517-24, 2000.
- PÉREZ, A. M. D.; TABANERA, E.; PEÑA, L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 219, n. 15, p. 1110 – 1114, 2001.
- QUEIROGA, F. L.; PÉREZ-ALENZA, M. D.; SILVAN, G.; PEÑA, L.; LOPES, C.; ILLERA, J. C. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, n. 94, p. 181-187, 2005.
- QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.97, n. 543, p. 119-127, 2002.
- REECE, W. O. Lactação. In: **Fisiologia de animais domésticos**. São Paulo: Ed. Roca, 1996. cap. 13, p. 313-325.
- RICHARDSON, R. C.; HAHN, K. A.; KNAPP, D. W. Biologia dos tumores. In: ETTINGER, S. A.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. v. 1, p. 665-675
- SANTOS, F.L. **Alguns aspectos de neoplasias, em caninos, na cidade do Recife-PE- Brasil, no período de 1982 a 1990**. Recife, 1994. Dissertação Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- SETOGUCHI, A.; SAKAI, T.; OKUDA, M.; MINIHATA, K.; YAZAWA, M.; ISHIZAKA, T.; WATARI, T.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; HASEGAWA, A.; TSUJIMOTO, H. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, n.3, p. 433-439, 2001.
- SOARES, J. A. G.; SILVA, P. A.. R. Castração precoce em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 13, p. 34-40, 1998.
- THOMPSON, M.W. **Genética Médica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 339p.
- VELDHOEN, N.; MILNER, J. Isolation of canine p53 cDNA and detailed characterization of full length canine p53 protein. **Oncogene**, Basingstoke, v. 16, p. 1077-1084, 1998.
- WALKER, M.R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu, 1999. 334p.
- YORIKO, J.; TEIXEIRA, L. C.; GURGEL, M. S. C.; ALVARENG, M.; BRENELLI, H. B. Correlação entre a expressão da proteína p53 e a resposta a quimioterapia primária no carcinoma mamário. **Acta Oncológica Brasileira**, São Paulo, v.20, n.1, p. , 2000.
- ZUCCARI, A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 38, n.1, p. 38-41, 2001a.
- ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, S. N. Fisiologia da neoplasia mamária em cadelas – Revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.32, p.52-54, 2001b.

## 7 ABSTRACT

The mammary tumors in bitches has high incidence and malignancy being provoked by several risk factors including age, hormonal activity, nutrition, virus, exogenous progestagen and pseudopregnancy. The gene p53, known as a suppressor gene of tumor, has been presented mutations related with neoplasias. In this work, the goal was to characterize the mammary tumors in bitches, evaluate the implication of the lateral mamma to the tumor and the risk factors involvement on the occurrence of the tumors; analyze the gene p53, in the region among exons 4 and 8 and to relate the malignant tumors and normal mammas with the occurred mutations in this gene. Were used 50 bitches with mamma tumor and 11 normal ones that were attended in Veterinary Hospital of the University Federal Rural of Pernambuco. They were harvested samples of the tumors and of the adjacent, clinically normal mammas, as well as mammas biopsies of the normal bitches, for histopathologies analysis according to the routine procedures. Other fragments were collected for extraction of the DNA, amplification of the exons by the polimerase chain reaction (PCR) with primers specific. The animals went of varied races having age comprehended between 4 and 19 years for the bitches with tumor and between 7 months and 6 years for the normal bitches, and the of age band between 9 and 13 years was to what it introduced the biggest neoplastic frequency (48%). Of the 50 mammary alterations, 68% were carcinosarcoms, 24% were carcinomas, 2% benign mixed tumor, 2% hemorrhagic, 2% fibrosises and 2% were unspecific inflammatory processes. There was no difference in the relation among risk factors and the tumors occurrence in the bitches. Of the lateral mammas to the tumors, just 36% were normal, 48% presented carcinoma, 6% carcinosarcoms, 2% hiperplasy, 2% fibrosis and in 6% the material was not enough to guarantee the diagnosis. They were chosen samples of 9 carcinomas and 7 carcinosarcoms with the respective adjacent normal mammas, and of 6 normal bitches, which were sequenceted in automatic sequencer and analyzed for the presence of mutations in comparison to nucleotides sequence of the dog p53 (GenBank - S77819). Were found mutations in 85,0% of the samples that after sequencing presented homology with the canine protein p53, of 86,3% on an average (GenBank - AAB42022.1). Of the observed mutations, the most frequent were missense and the most attacked exons were the 5 and the 8 with, respectively, 23,2% and 24,9% of the mutations. nucleotides alterations more frequent were deletions (C and G) and inserts (A and T), which resulted in majority of the mutations missense. It concludes that in the studied animals there was no interference of the contraceptives pseudopregnancy factors and use in the appearance of the tumors, but that the age is an important factor, being, however, the considered advanced age a factor of elevated risk. Considering the tumors high frequency in the lateral mammas to neoplasics and the mutations occurrence in the genes of these samples, it suggests that in extirpation of the tumor be extract the complete lateral chain to avoid reincidence. The mutations high incidence in the segment of the gene that it transcribes the part of the protein that is linked to the DNA, it suggests the possibility of the alteration in the functionality of the protein, what is emphasized by the high malignancy of the studied tumors.

Key words: cancer, pathology, molecular biology, neoplasm, PCR, DNA

# **ANEXO**

## 8 ANEXO

### FICHA DE ACOMPANHAMENTO DO PROJETO NEOPLASIA MAMÁRIA

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

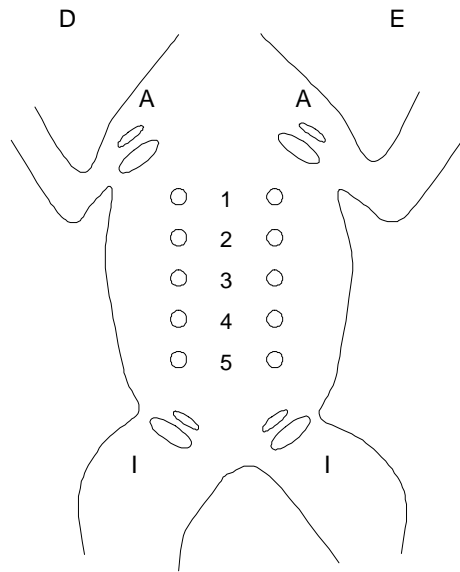
Nº da ficha:

Nº do Prontuário:	
Nome do animal:	Idade:
Raça:	Pelagem:
Proprietário:	
Endereço:	
CEP:	Fone:
E-mail:	

#### Anamnese

Sinais:	
Sintomas:	
Início:	
Alimentação: ( ) Ração - Marca comercial: ( ) Caseira - Qual?	
Perda de peso: ( ) Sim ( ) Não	Intolerância ao exercício: ( ) Sim ( ) Não
OSH anterior: ( ) Sim ( ) Não	
Início da puberdade:	
Nº deaios:	Intervalo entre ciclos:
Nº de gestações:	Intervalo entre gestações:
Período de desmame:	Abortos:
Dificuldade reprodutiva:	
Tempo de ciclo reprodutivo:	
Apresentou pseudogestação:	
Aplicação de anticoncepcional: ( ) SIM ( ) NÃO Qual: Quantas vezes:	
Histórico familiar de tumor mamário:	
Histórico de mastite:	
Fez exames radiográficos:	
Já fez mastectomia:	

### Massa tumoral



### Características do tumor

Mobilidade	s	n
Ulceração	s	n
Eritema	s	n
Aderência da pele	s	n
Infecção	s	n
Envolvimento de fascia ou músculo	s	n
Dor local	s	n