

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E**  
**BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MUTAÇÕES DO GENE *TP53* EM TUMORES CANINOS E SUA  
RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À  
APOPTOSE, CONTROLE DE CICLO CELULAR E  
ANGIOGÊNESE.**

**Guilherme Thomazi**

**Caxias do Sul**

**2010**

**GUILHERME THOMAZI**

**MUTAÇÕES DO GENE *TP53* EM TUMORES CANINOS E SUA RELAÇÃO  
COM A EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À APOPTOSE,  
CONTROLE DE CICLO CELULAR E ANGIOGÊNESE.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia da Universidade  
de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau  
de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientador: Dra. Adriana Costa da Motta

Caxias do Sul

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

T465m Thomazi, Guilherme

Mutações do gene TP53 em tumores caninos e sua relação com a expressão de genes associados à apoptose, controle de ciclo celular e angiogênese / Guilherme Thomazi. - 2010.

xiv, 61 f. : il. ; 30 cm.

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2010.

“Orientação: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray, Co-orientação Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Costa da Motta.”

1. Genes supressores de tumor. 2. Genes. 3. Câncer – Aspectos genéticos. 4. Cão – Câncer. I. Título.

CDU: 575.113:616-006

Índice para o catálogo sistemático:

1. Genes supressores de tumor	575.113:616-006
2. Genes	575.113
3. Câncer – Aspectos genéticos	616-006:575
4. Cão – Câncer	636.7:616-006

Catalogação na fonte elaborada pelo bibliotecário  
Marcelo Votto Teixeira – CRB 10/1974

GUILHERME THOMAZI

MUTAÇÕES DO GENE *TP53* EM TUMORES CANINOS E SUA RELAÇÃO COM  
A EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À APOPTOSE, CONTROLE DE CICLO  
CELULAR E ANGIOGÊNESE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em  
Biotecnologia.



---

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

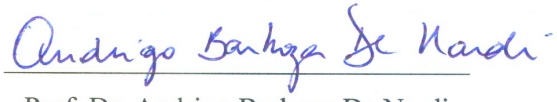


---

Co-orientadora: Prof. Dra. Adriana Costa da Motta

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29 DE NOVEMBRO DE 2010.

Comissão examinadora:



---

Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi



---

Prof. Dra. Claudia Cilene Laurino



---

Prof. Dr. Diego Bonatto

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram e acreditaram em mim. Resumo meu trabalho em um provérbio escrito por São Francisco de Assis: [...comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível...].

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me apoiaram e acreditaram no meu trabalho, me ensinando e estimulando em todos os momentos. Amo vocês.

A minha namorada, Lu que me deu forças para seguir em frente principalmente nos momentos difíceis. Neste momento quero comemorar a vitória ao seu lado. Te amo.

Ao meu orientador e amigo, Sergio que aceitou trabalhar numa área extremamente interessante e ao mesmo tempo desafiante. Você me ensinou muito e sempre servirá de exemplo profissional para mim.

A minha co-orientadora, Adriana que aceitou de imediato a missão de orientar seu primeiro mestrando. Foi uma honra.

Aos meus colegas de laboratório, os quais nossos laços de amizade e alegria se acentuaram.

Aos professores do Instituto de Biotecnologia pelos conhecimentos transmitidos.

Por fim, ao Programa de Pós-graduação da UCS o qual me orgulho de ter feito parte e pude dar minha contribuição para ser CAPES 5, ou seja, um dos melhores do Brasil.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b>	viii
<b>Lista de Quadros</b>	x
<b>Lista de Tabelas</b>	xi
<b>Lista de Abreviaturas</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	03
<b>2.1. Ciclo celular e apoptose</b>	03
<b>2.2. O gene <i>TP53</i> e suas alterações</b>	08
<b>2.3. Vias de sinalização do p53e sua relação com o câncer</b>	12
<b>2.4. Dados epidemiológicos em neoplasias caninas e sua relação com alterações no gene <i>TP53</i></b>	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	21
<b>3.1. Coleção de tumores de animais e coleta</b>	21
<b>3.2. Análise histopatológica das amostras</b>	21
<b>3.3. Extração de DNA total</b>	22
<b>3.4. Análise de alterações no gene <i>TP53</i> através de SSCP</b>	22
<b>3.5. Sequenciamento dos exons 5, 6 e 7 e aos introns 5 e 6 do gene <i>TP53</i></b>	24
<b>3.6. Análise da expressão gênica de <i>TP53</i>, <i>Bcl2</i>, <i>Bax</i>, <i>IGF-BP3</i>, <i>VEGF</i>, <i>bFGF</i>, <i>p21</i> e <i>MDM2</i> através de RT-PCR quantitativo</b>	25
3.6.1. Extração de RNA total	25
3.6.2. Desenhos dos primers dos genes específicos e de referência	26
3.6.3. Transcrição reversa para obtenção dos cDNAs	27
3.6.4. Análise de qRT-PCR	27
3.6.5. Análise dos resultados do qRT-PCR	27
<b>3.7. Análise estatística</b>	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	29
<b>4.1. Análises histopatológicas das amostras</b>	29

<b>4.2. Avaliação de alterações no gene <i>TP53</i> de tecidos tumorais e normais em cães.</b>	37
<b>4.3. Avaliação da expressão gênica das amostras</b>	44
<b>5. CONCLUSÕES</b>	52
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	54



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Visão geral dos pontos de checagem que participam do controle do ciclo celular mediado por ciclinas, CDKs, p21<sup>CIP</sup> e p53 04
- Figura 2.** Diferenças entre apoptose e necrose celular 07
- Figura 3.** Distribuição somática de mutações em *TP53* humana de acordo com a *IARC TP53 Mutation Database*. a) distribuição dos tipos de mutações. b) distribuição das mutações missense no gene *TP53* ao longo dos 393 aminoácidos da sequência de p53. Em destaque, os 6 hotspots mais comuns. 10
- Figura 4.** Sinalização da p53 na apoptose 12
- Figura 5.** Três subfamílias de proteínas Bcl2. Regiões  $\alpha$ -hélice são relatadas, bem como, as quatro regiões altamente conservadas (BH1-4); TM, domínio transmembrana. 14
- Figura 6.** Modelo de integridade mitocondrial de mamíferos. Bcl2 mantém a integridade da membrana mitocondrial até ser neutralizada pelas proteínas BH3, Bax e Bak resultando na liberação do citocromo c, ativando Apaf1 que permite a ligação com a caspase-9. Outras pró-apoptóticas moléculas saem da membrana mitocondrial (Omi e Diablo) que antagonizam as IAPs, proteínas inibidoras da apoptose. 15
- Figura 7.** Regulação de p21 dependente de p53. Estímulos à p53 podem elevar a expressão de *Bax* e diminuir a de *Bcl2*. 16
- Figura 8.** Lâminas HE, 100X: (A) Glândula mamária. Carcinoma túbulo-papilar complexo Grau I; (B) Glândula mamária. Carcinoma túbulo-papilar complexo Grau II; (C) Glândula mamária. Carcinossarcoma Grau I. Componente mesenquimal maligno (setas horizontais). Componente epitelial maligno (setas vertical); (D) Glândula mamária. Carcinossarcoma Grau III. Componente mesenquimal maligno (setas horizontal). Componente epitelial maligno (seta vertical); (E) Pele. Hemangiopericitoma Grau I; (F) Pele. Neurofibrossarcoma (Schwanoma maligno) Grau II. 31
- Figura 9.** Porcentagem de animais acometidos por neoplasias malignas de cães de acordo com a raça. 34

<b>Figura 10.</b> Frequência das neoplasias malignas de cães de acordo com a idade.	36
<b>Figura 11.</b> Padrões de SSCP do gene <i>TP53</i> de cães.	38
<b>Figura 12.</b> Tipos de perfis encontrados por SSCP nos distintos exons de <i>TP53</i> .	39
<b>Figura13.</b> Análise de agrupamento (Neighbor-Joining) de distintos perfis polimórficos dos exons 5 ao 7 do gene <i>TP53</i> de neoplasias caninas.	41
<b>Figura 14.</b> Nível de conservação nos exons 5, 6 e 7 e introns 5 e 6 do gene <i>TP53</i> em tumores caninos.	42
<b>Figura 15.</b> Alinhamento de parte das sequências normais do <i>TP53</i> com o mutante (amostra 094); Eletroferograma representando parte da sequência obtida. Destaque referente ao códon 270 (ARG → HIS).	43
<b>Figura 16.</b> Análise de agrupamentos dos tumores de mama de acordo com o nível de expressão dos genes <i>TP53</i> , <i>Bax</i> , <i>p21</i> , <i>Bcl2</i> , <i>MDM2</i> , <i>bFGF</i> e <i>IGF-BP3</i> determinada por qPCR.	47
<b>Figura 17.</b> Análise de agrupamentos dos tumores de pele de acordo com o nível de expressão dos genes <i>TP53</i> , <i>Bax</i> , <i>p21</i> , <i>Bcl2</i> , <i>MDM2</i> , <i>bFGF</i> e <i>IGF-BP3</i> determinada por qPCR.	50

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Caracterização dos <i>primers</i> do gene <i>TP53</i> para realização do SSCP.	23
<b>Quadro 2.</b> Caracterização dos <i>primers</i> do gene <i>TP53</i> para o seqüenciamento.	24
<b>Quadro 3.</b> Caracterização dos <i>primers</i> do gene específicos e de referência.	26

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características anatomopatológicas e classificação (TNM) das neoplasias malignas de cães.	30
<b>Tabela 2.</b> Classificação do grau histológico de acordo com o tecido afetado.	32
<b>Tabela 3.</b> Número de alterações no perfil do SSCP por exon do gene <i>TP53</i>	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\beta$ -Act	<i>Beta actina</i>
Bax	<i>Gene X associado a Bcl2</i>
Bcl2	<i>Gene da leucemia de células B</i>
bFGF	<i>Fator de crescimento fibroblástico básico</i>
CDK	<i>Cinases dependentes de ciclinas</i>
DBD	<i>Domínio de ligação com DNA</i>
DEPC	<i>Dietilpirocarbonato</i>
gDNA	<i>Ácido desoxiribonucleico genômico</i>
cDNA	<i>Ácido desoxiribonucleico complementar</i>
dNTP	<i>Desoxiribonucleotídeos trifosfato</i>
EDTA	<i>Ácido Etilenodiamino tetraacético</i>
GAPDH	<i>Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase</i>
IGF	<i>Gene do fator de crescimento semelhante a insulina</i>
INK	<i>Inibidor de cinases</i>
KIP	<i>Proteínas inibitoras de cinases</i>
MDM2	<i>Minuto duplo murino</i>
MG	<i>Megaprimers</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	<i>Nanômetro</i>
pb	<i>Pares de Base</i>
PCR	<i>Reação em cadeia da polimerase</i>
PDGF	<i>Fator de crescimento plaquetário</i>
PLGF	<i>Fator de crescimento da placenta</i>
qRT-PCR	<i>Trascriptase reversa – reação em cadeia da polimerase quantitativa</i>
RNA	<i>Ácido Ribonucleico</i>
RPS	<i>Proteína ribossomal</i>
SNP	<i>Polimorfismo de um único nucleotídeo</i>
SRD	<i>Sem raça definida</i>
SSCP	<i>Polimorfismo conformacional de fita simples</i>
TNM	<i>Tumor-linfonodos-metástases</i>
TE	<i>Tris-EDTA</i>

## RESUMO

A proteína p53 é frequentemente relacionada às neoplasias humanas e animais, estando indiretamente relacionada com o bloqueio do ciclo celular, angiogênese e indução à apoptose. O objetivo deste trabalho foi analisar a presença de alterações no gene *TP53*, assim como a expressão dos genes relacionados ao câncer em neoplasias caninas. Tumores caninos (n=50) foram avaliados através de análise histopatológica, perfis de SSCP dos exons 5, 6 e 7 e sequenciamento da região intron5-exon7. Parte destes tumores (45 amostras) foram analisados quanto à expressão dos genes *TP53*, *p21*, *MDM2*, *Bax*, *Bcl2*, *IGF-BP3*, *VEGF* e *bFGF* através de qRT-PCR. Os resultados mostraram que as neoplasias mamárias, particularmente túbulo-papilares complexas, são as mais comuns em cães. A ocorrência de neoplasias em cães está relacionada com a idade e a raça. Alta prevalência de alterações nos perfis de SSCP foi constatada em tumores caninos. Entretanto, esta técnica, preconizada como eficiente por diversos autores apresenta análise e interpretação complexa e subjetiva, não apresentando relação com os dados de sequenciamento no presente trabalho. Parte dos tumores (42%) apresentaram alterações nos exons 6 e/ou 7 do gene *TP53*, e apesar de se encontrarem em heterozigose, podem comprometer funcionalmente a proteína p53. A única alteração em homozigose foi detectada num osteossarcoma de mama e correspondeu a uma transição G→A no códon 270 (arg→his) conhecido como *hotspot* situado no domínio de ligação da proteína p53 ao DNA. As alterações observadas nas sequências nos introns 5 e 6 do gene *TP53* não se encontram em sítios envolvidos no processamento do RNA. Ampla variação na expressão relativa dos genes *TP53*, *Bax*, *p21*, *MDM2*, *Bcl2*, *IGF-BP3* e *bFGF* foi constatada em tumores mamários e de pele. Entretanto, não foi possível estabelecer relações entre expressão e alterações no gene *TP53*, ou entre a expressão dos genes em estudo entre si. O gene *IGF-BP3* foi hiper ou hipo expresso em 60% dos tumores de pele, mas não apresentou alteração em tumores de mama. Por outro lado, 82,9% dos tumores mamários apresentaram hiper expressão do gene *Bax*, enquanto não foi observada alteração na expressão deste gene em tumores de pele. Apesar de serem considerados indicadores de prognóstico, de um modo geral não foi constatada correlação entre o nível de expressão dos genes *TP53*, *Bax*, *p21*, *MDM2*, *Bcl2*, *IGF-BP3* e *bFGF* e o grau histopatológico.

## ABSTRACT

The p53 protein is frequently associated with human and animal cancer. This protein is involved in the regulation of cell cycle, angiogenesis and apoptosis. The aim of this work was to analyze modification on *TP53* gene sequence, as well as the relative expression of several cancer related genes in dog's tumors. A total of 50 neoplasias were evaluated by classical histopathological analysis, SSCP profiles of exons 5, 6 and 7, and sequencing of intron5-exon7 region of *TP53*. Most of these tumors (n=45) were evaluated for the expression of *TP53*, *p21*, *MDM2*, *Bax*, *Bcl2*, *IGF-BP3*, *VEGF* and *bFGF* genes by qRT-PCR. The results showed that breast cancer, particularly the complex tubular-papillary, are the most common in dogs. The prevalence of cancer in dogs is related with the age and breed. High frequency of SSCP altered patterns were detected in canine tumors. However, this technique, pointed out as efficient by several authors, has complex and subjective interpretation, and it did not show relation with our sequence data. Heterozygotic alterations in exons 6 and/or 7 of *TP53*, which may compromise p53 protein function, were detected in 40% of the tumors. A homozygotic transition G→A at the codon 270 (arg→his), known as a hotspot on the DNA-binding domain of p53, was detected in an osteosarcoma. Alteration detected in the intronic regions 5 and 6 of *TP53* are probably not involved in RNA processing. High variation of the relative expression of *TP53*, *p21*, *MDM2*, *Bax*, *Bcl2*, *IGF-BP3*, *VEGF* and *bFGF* genes were detected in both mammary and skin tumors. However, it was not possible to establish clear relation among genes expression, or between expression and *TP53* alterations. *IGF-BP3* gene was over or under express in 60% of skin tumors, but no alterations were found in mammary tumors. Conversely, 82.9% of mammary tumors exhibited *Bax* over-expression, while skin tumors showed a control-like behavior. Although considered as prognostic markers, it was not detected relation between *TP53*, *p21*, *MDM2*, *Bax*, *Bcl2*, *IGF-BP3*, *VEGF* and *bFGF* genes and histopathological grade.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a relação homem-animal tem evoluído gerando benefícios para ambos. A domesticação, principalmente de cães, pode ser responsável pela expansão do mercado de animais domésticos em diversas instâncias.

Proprietários estão mais preocupados com seus animais e tendem a oferecer um cuidado melhor para eles. Após anos de estudos, novos medicamentos, vacinas e componentes nutricionais são alguns dos fatores que contribuíram para o aumento da sua expectativa de vida. Com isso, diversas doenças começaram a chamar a atenção em medicina veterinária, entre elas o câncer. Mas, nem sempre os melhores tratamentos oferecem um resultado satisfatório quando se trata de câncer.

O câncer é a principal causa de morte dos animais no mundo principalmente os que têm mais de 10 anos. Em um levantamento feito pela *Morris Animal Foundation*, cerca de 47% dos cães morrem de câncer.

O câncer é o resultado de uma falha do controle do ciclo celular que pode ter inúmeras causas como, por exemplo, vírus, bactérias, componentes tóxicos, radiações, fatores imunológicos e principalmente fatores hereditários. A endogamia é utilizada na formação das raças visando fixar caracteres morfológicos e comportamentais, por outro lado, a endogamia também pode fixar genes deletérios como oncogenes, afetando assim o surgimento de neoplasias com predileção racial. Embora o processo oncogênico não seja completamente compreendido, sabe-se que contínuas mutações genéticas contribuem para a replicação celular descontrolada. As células mutantes ficam menos propensas à necrose ou apoptose, o que fisiologicamente não ocorre quando os processos de reparo são plenamente funcionais.



A morte celular programada ou apoptose é um mecanismo de eliminação de células que possuem danos irreversíveis em nível de DNA. Diversos fatores podem interferir na apoptose, entre eles, citocinas (interleucina-1 beta), quimioterápicos antineoplásicos (ativação via CD95) e genes ativadores (*TP53*) ou supressores (*Bcl2*).

A proteína p53 (*p53*) possui diversas funções como o controle do ciclo celular, replicação e reparo do DNA, indução da diferenciação e inicialização da apoptose. A p53 regula outras proteínas como p21(bloqueador do ciclo celular), Bax (indutor de apoptose e inibidor da Bcl2), IGF-BP3(indutor de apoptose), VEGF e bFGF (indutor de angiogênese), MDM2 (inibidor de p53).

Por outro lado, a *Bcl2* (anti-apoptótico) e o *MDM2* (feedback negativo do *p53*) são genes que influenciam negativamente a apoptose e quando são super expressos (comum em células neoplásicas) protegem as células anormais da apoptose e dos efeitos dos quimioterápicos antineoplásicos.

As células neoplásicas têm um índice mitótico mais alto que as células normais, por isso necessitam de maior suporte energético para se replicar, e da mesma forma, precisam de vasos sanguíneos para se metastatizar. Dentre os genes responsáveis pela angiogênese destacam-se *VEGF* e *bFGF*.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo determinar a frequência de alterações presentes numa região (*DNA-binding domain*) do gene *TP53* de células neoplásicas de cães (*Canis familiaris*) e determinar o padrão da expressão gênica de *TP53* e genes responsáveis pelo controle do ciclo celular (*p21*), reguladores da apoptose (*Bax*, *Bcl2*, *IGF-BF3* e *MDM2*) e angiogênicos (*VEGF* e *bFGF*), visando à compreensão da ação integrada de genes relacionados e/ou controlados por p53 no desenvolvimento e evolução de neoplasias caninas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Novos dados sobre as sequências e organizações gênicas derivadas do projeto genoma de diferentes espécies estão expandindo os estudos das alterações genéticas de diversas doenças, inclusive o câncer.

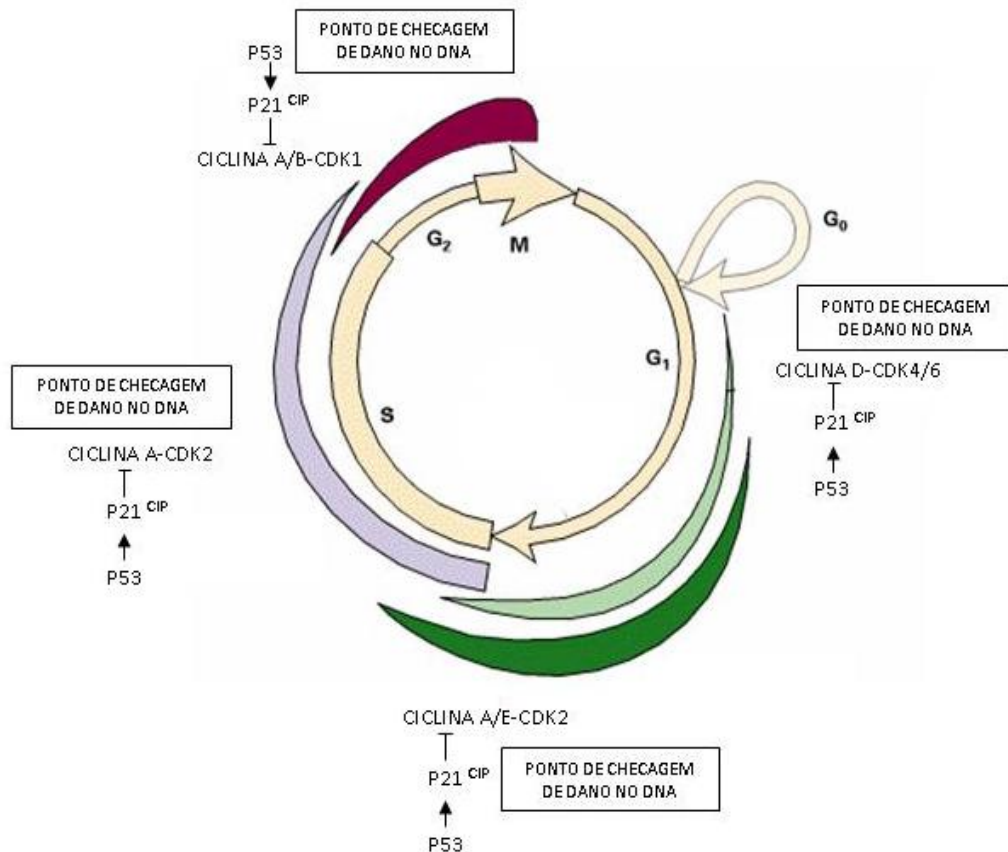
A interação entre as causas de câncer e as mutações genéticas são cada vez mais evidentes. No caso das neoplasias, as mutações podem ativar proto-oncogenes e inativar genes supressores de tumor que desequilibram o ciclo celular e, conseqüentemente ativam o crescimento descontrolado das células. Portanto, é essencial aprofundar o conhecimento do impacto destas alterações em genes que tem um papel fundamental no controle do ciclo celular.

### **2.1. Ciclo celular e apoptose**

O ciclo celular é um conjunto de processos altamente ordenado que compreende o período entre duas divisões celulares (Lewin, 2001). Nos organismos eucariotos, esses processos são regulados de tal maneira que as células, em condições normais, nunca iniciam uma etapa do ciclo sem que a etapa anterior tenha sido completamente finalizada (Nasmyth, 1996).

A Figura 1 representa as quatro fases do ciclo celular: fase M ou mitose (período quando o núcleo e a célula se dividem); fase G1 (intervalo quando traduções, transcrições e outras atividades celulares ocorrem); fase S (quando o genoma é replicado); fase G2 (fase pré-mitótica) (Nasmyth, 1996). A fase G<sub>0</sub> ou fase de quiescência é visto como uma

extensão da fase G1, onde as células não estão em divisão ou preparando-se para dividir (Pardee, 1989).



**Figura 1.** Visão geral dos pontos de checagem que participam do controle do ciclo celular mediado por ciclinas, CDKs, p21<sup>CIP</sup> e p53 (adaptado de Lodish, 2005).

A família das cinases dependentes de ciclinas (CDKs) controlam o ciclo celular e são ativadas por uma classe especial de proteínas denominadas ciclinas. As ciclinas (A-H) são subunidades regulatórias e seus níveis flutuam precisamente durante o ciclo celular (Harwell, 1992). Em células de mamíferos são conhecidas várias cinases, como CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6. A CDK 1 se associa as ciclinas A ou B e participam na transição G<sub>2</sub>-M (Figura 1). Enquanto, as CDK4 e CDK6 formam complexos com as ciclinas D e atuam em etapas iniciais do ciclo celular, provavelmente em resposta a fatores de crescimento. Já a CDK2 liga-se as ciclinas A e E sendo essencial para a duplicação do

DNA (Pardee, 1989). A ciclina C associa-se a CDK8 e parece regular a transcrição do RNA através de sua ligação durante o ciclo celular (Hirama e Koeffler, 1995), mas mostra uma expressão aumentada em resposta a danos pela indução da proteína p53 (Bates *et al.* 1996).

Com o estudo de genes supressores de tumor, como por exemplo, do gene *Rb*, pode-se entender melhor a interação entre estes e os complexos CDK/ciclina. O produto do gene *Rb*, que está ausente ou inativo em retinoblastomas e outros tipos de câncer, é um substrato para os complexos CDK/Ciclina D (Lewin, 2001).

Já os complexos CDK/ciclina A têm como substrato proteínas relacionadas com a duplicação do DNA e alguns já foram observados em áreas nucleares ligadas a esse processo. Além disso, estudos sugerem que as cinases da fase S disparam o início da duplicação do DNA, que é dependente da ativação de complexos protéicos ligados ao DNA, nos pontos de origem e duplicação. Esses complexos protéicos são chamados de pré-Rec (complexo de pré-duplicação). As cinases da fase S provavelmente participam dessa ativação dada sua associação física com o complexo pré-Rec e a presença de múltiplos sítios de fosforilação no complexo de origem (Nasmyth, 1996).

A ativação da cinase da fase M é um evento que dispara o início da mitose e requer a fosforilação da subunidade catalítica CDK1 e sua ligação com a ciclina B. Sua inativação, ao contrário, é necessária para a saída da fase M e depende da destruição da subunidade regulatória por proteólise. Em células que estão em atividade proliferativa, o nível de CDK1 mantém-se constante durante todo o ciclo, mas sua ciclina está presente apenas durante a mitose, o que indica ser regulada por um mecanismo pós-transcricional após sua síntese na fase S (Nasmyth, 1996).

A inativação da cinase após a mitose depende da atuação de um sistema proteolítico mediado por ubiquitina, que induz a destruição de proteínas, incluindo ciclina. A

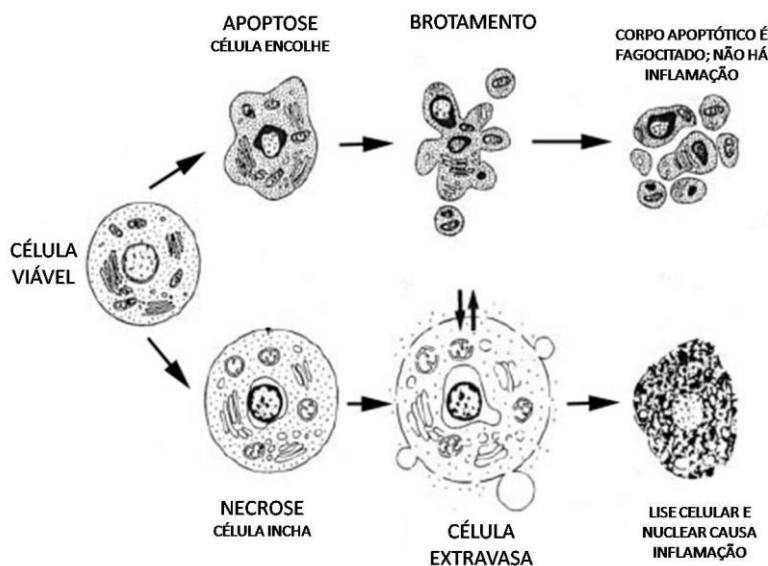
ubiquitina é uma proteína altamente conservada, que pode ligar-se covalentemente aos resíduos de lisina de proteínas instáveis através de ligações isopeptídicas e fornece, assim, alvos para degradação por proteases. Essa proteólise pode ser a essência do mecanismo pelo qual as células dos eucariotos garantem que uma nova duplicação dos cromossomos não aconteça antes da separação das cromátides irmãs sintetizada na fase S anterior (Nasmyth, 1996).

A atividade das CDKs é regulada por duas famílias de proteínas inibidoras de CDKs. As KIP (*Kinase inhibitory proteins*) incluem p21, p27 e p57 e tem a capacidade de ligar e bloquear uma ampla variedade de CDKs. Os inibidores de CDKs estão implicados no bloqueio do ciclo na fase G1 que ocorre em células normais que sofrem senescência ou algum dano no DNA. Também, a proteína p27 pode atuar no ciclo celular, mas está sobre controle da proteína p53. As INK (*Inhibitors of kinases*) compreendem a segunda família de proteínas inibitórias de CDKs e as proteínas do grupo INK4 (p15, p16, p18 e p19) especificamente inibem a CDK D (Sherr, 1995).

Os complexos contendo uma única molécula de p21 são ativos cataliticamente, enquanto aqueles contendo moléculas múltiplas de p21 inibem a sua função. A p21 também se associa ao PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), que é um componente da DNA polimerase e participa da duplicação e reparo do DNA. Neste caso, a p21 bloqueia a síntese do DNA pela inativação de PCNA (Sherr, 2000).

O nível de p21 é controlado diretamente pela proteína supressora de tumor, p53, o que indica um mecanismo pelo qual essa última modula e, possivelmente coordena a progressão do ciclo celular e a duplicação do DNA. As células que apresentam uma mutação no *TP53* apresentam níveis de p21 extremamente reduzidos e/ou ausentes (Hartwell, 1992). A expressão de p21 pode ocorrer de forma independente de p53, através de estímulos de crescimento ou em resposta a sinais de diferenciação (Zhang *et al.*, 1995).

Apoptose, ou morte celular programada, é um componente normal do desenvolvimento dos organismos multicelulares. A célula morre em resposta a vários estímulos, os quais são controlados e regulados de maneira diferenciada. A apoptose ocorre de maneira distinta de outros tipos de morte celular, como por exemplo, a necrose a qual é incontrolável e é causada por lise celular, resposta inflamatória e/ou injúrias (Ziegler & Groscurth, 2004).



**Figura 2.** Diferenças entre apoptose e necrose celular (adaptado de Van Cruchten, 2002).

A apoptose é regulada por estímulos fisiológicos e sua principal característica morfológica é a fragmentação e separação nuclear em vesículas apoptóticas (Figura 2). A fragmentação do DNA nuclear é resultado da atividade de endonucleases; em contraste com a necrose, sem reação inflamatória e intumescimento das organelas; apresenta compactação nuclear precoce e condensação citoplasmática, seguidas de quebra do núcleo em pequenos fragmentos; partes deste envolvidos pela membrana formando corpúsculos apoptóticos que possuem apenas componentes nucleares. Os corpúsculos ou vesículas são capturados por células adjacentes ou desprezados. Ao mesmo tempo ocorre a remoção

destes corpúsculos pelos macrófagos. Este mecanismo ocorre em células individuais e em tempos anacrônicos, o que também diferencia o processo da necrose (Gerschenson & Rotello, 1992).

A família Bcl2 é conhecida como de proteína indutora e repressora de morte por apoptose que participam ativamente da regulação desse processo (Broner, 2003). Os membros da família Bcl2, como Bcl2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo *c* e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Quando Bcl2 e Bcl-XL estão super expressos, essas células ficam protegidas da apoptose e tornam-se resistentes a quimioterapia antineoplásica (Withrow & MacEwen, 2001). Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (Hengartner, 2000).

Embora o câncer exiba características muito heterogêneas, todos os tumores malignos adquirem a propriedade de crescer além dos limites impostos às células normais. A expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. Portanto, apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (Okada & Mak, 2004).

## **2.2. O gene *TP53* e suas alterações**

O gene de supressão tumoral conhecido como *TP53* é, sem dúvida, o mais relevante no estudo da biologia tumoral (Levine & Oren, 2009). Desde 1978, que os cães são usados como modelos animais e são propostos para estudos comparativos de câncer humanos (Hewitt, 1978). Nesta espécie, o gene *TP53* está localizado no cromossomo cinco, possui 3756 pares de base e possui dez exons e nove introns. O RNA mensageiro possui 1151

pares de base e formam uma proteína de 381 aminoácidos. No NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) a sequência pode ser encontrada pelo locus NC\_006587.2.

Esse gene tem um papel importante na carcinogênese de vários órgãos através da regulação da proliferação celular, estabilidade genômica e morte celular programada (Hainaut *et al.*, 1997). Outro evento *TP53*-mediado é a senescência que pode ser auxiliado pela autofagia, ou seja, componentes celulares sofrem degradação lisossomal controlada (Meek, 2009).

Sherr (2000) mostrou que os níveis da proteína p53 em células normais é baixo. Danos no DNA e outros sinais de estresse podem induzir a produção da mesma e iniciar o reparo e/ou processo apoptótico. A parada de ciclo é fundamental para que células danificadas não se repliquem.

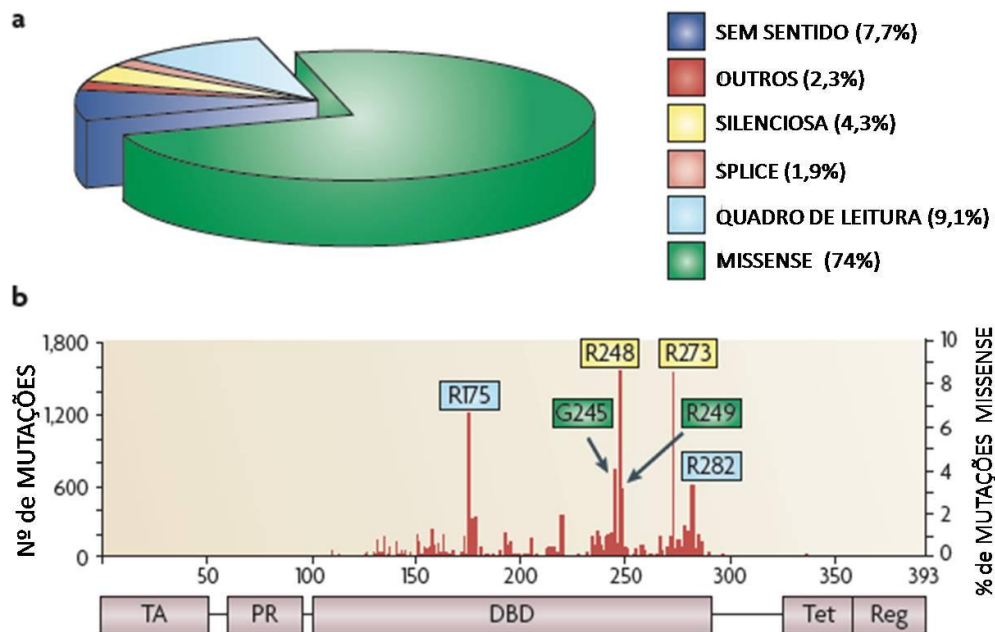
Após o dano do DNA, muitas células aparentam ter uma parada de ciclo celular na fase G2. Bunz *et al.* (1998) demonstrou que essa parada de ciclo pode ocorrer quando a p53 está presente na célula e tem a capacidade de ativar p21. Estudos têm demonstrado que após a destruição de p53 e p21, por radiação  $\gamma$ , houve uma progressão da mitose devido a falhas na citocinese comprovando o papel essencial dessas duas proteínas na manutenção do ciclo celular.

A maioria das mutações associadas ao gene *TP53* são mutações *missense* nas regiões de ligação do DNA (*DNA-binding domain - DBD*). Essas mutações geram proteínas incapazes de ativar genes alvos e bloquear a tumorigenese. Além disso, com a perda da atividade de p53selvagem, muitos mutantes exercem outras funções como de dominância negativa que inativam a expressão dos alelos selvagens restantes. Da mesma forma, alguns mutantes podem dar origem a novas propriedades oncogênicas que são conhecidas com propriedade de ganho de função (Brosh & Rotter, 2009).



Alterações na função da proteína p53 podem desregular a proliferação celular e favorecer o desenvolvimento de tumores. Deleções, translocações ou mutações no gene *TP53* são observados em aproximadamente 60% dos tumores humanos (Levine *et al.*, 1991).

A vasta maioria das mutações é mapeada na região DBD. Além disso, quase um terço de todas as mutações *missense* são encontradas em seis “hotspots” (Figura 3). A alta proporção de mutações *missense* em *TP53*, bem como os resíduos dos “hotspots” é a favor da hipótese de ganho de função (Brosh & Rotter, 2009).



**Figura 3.** Distribuição somática de mutações em *TP53* humana de acordo com a *IARC TP53 Mutation Database*. a) distribuição dos tipos de mutações. b) distribuição das mutações missense no gene *TP53* ao longo dos 393 aminoácidos da seqüência de p53. Em destaque, os 6 “hotspots” mais comuns. Os domínios estão alinhados abaixo (adaptado de Brosh & Rotter, 2009).

LEGENDA: TA, transativação; PR, rico em prolina; DBD, ligação com DNA; Tet, tetramerização e Reg, regulador carboxi-terminal.

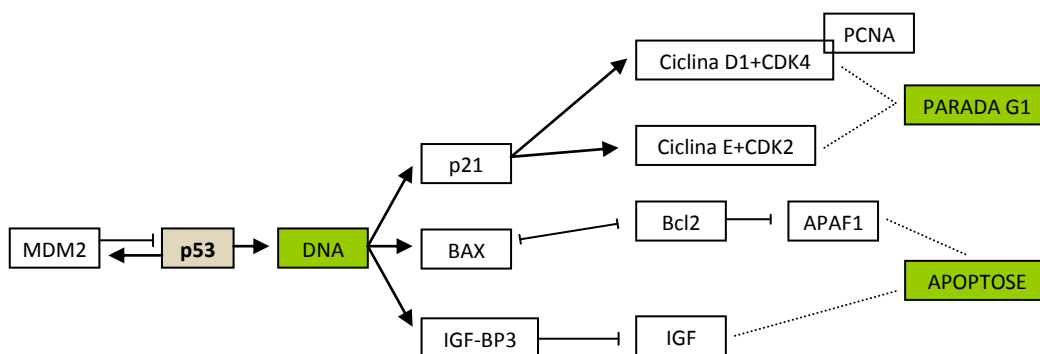
É importante ressaltar que as mutações no *TP53* são afetadas não somente por processos seletivos, mas também por fatores intrínsecos que afetam diferencialmente os nucleotídeos e regiões específicas do gene (Brosh & Rotter, 2009).

Por um longo período, acreditava-se que a proteína p53 era única e que não possuía membros. Isso mudou quando dois membros da família foram descobertos: p63 e p73. Ambos p63 e p73 têm um papel essencial no desenvolvimento da pele, sistema nervoso e órgãos reprodutivos e podem, em certas circunstâncias, funcionar como supressores tumorais. Curiosamente, p53, p63 e p73 têm similar DBD e podem induzir a transcrição de alguns dos mesmos genes, mas também podem induzir a transcrição de diferentes genes em tipos específicos de células (Levine & Oren, 2009).

Além disso, a p53, por si só, não é uma simples proteína. Com o passar dos anos, ficou claro que através dos *splicing* alternativos e das iniciações transcricionais alternativas, a p53 produz mais de 9 diferentes isoformas contendo combinações alternativas de porções amino-terminais e carboxi-terminais das proteínas. Algumas dessas isoformas são observadas em diferentes tecidos e em diferentes estágios de desenvolvimento. O preciso papel das isoformas ainda continua desconhecido (Levine & Oren, 2009).

### **2.3. Vias de sinalização do p53e sua relação com o câncer**

Vários genes-alvos da p53 têm sido identificados mostrando a capacidade de transativação dessa proteína. Muitos desses genes codificam proteínas que estão intimamente envolvidas na apoptose ou no controle da progressão do ciclo celular (Levine & Oren, 2009). Na Figura 4 está representado algumas das interações da p53 durante a apoptose.



**Figura 4.** Sinalização da p53 na apoptose (adaptado do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* – [www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg))

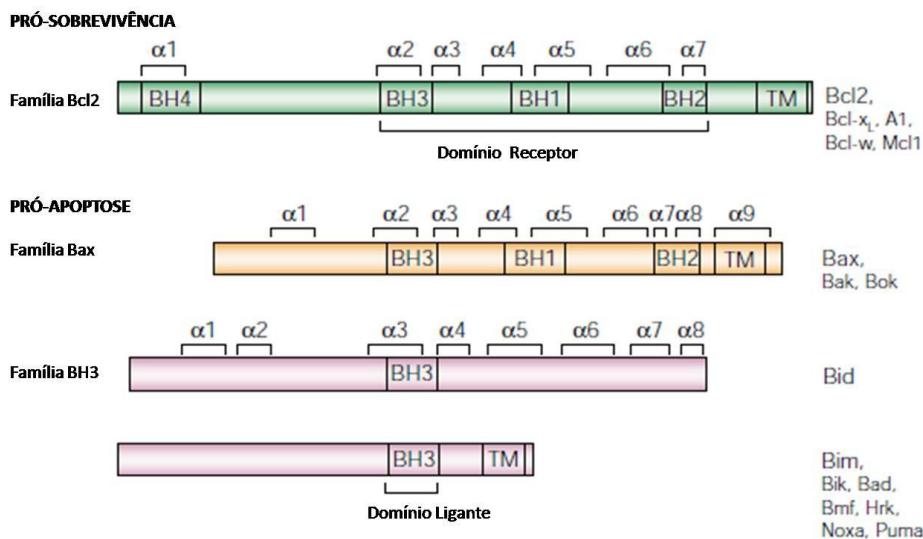
Provavelmente a mais importante interação proteína-proteína da p53 foi descoberta em 1992, quando MDM2 foi relatada ligando-se fortemente a p53 e inibindo sua atividade bioquímica. MDM2 pode bloquear p53 de várias maneiras, como por exemplo, ligando-se e impedindo a transativação dos seus domínios e um complexo específico p53-E3 ubiquitina pode promover a ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal da proteína p53.

Além disso, um feedback negativo ocorre entre p53 e MDM2, na qual p53 induz a expressão de MDM2 a qual volta a promover a degradação da p53. Outro evento que pode ocorrer é a inibição da tradução do mRNA de p53 pela MDM2 (Polager & Ginsberg, 2009).

A relevância clínica da ligação entre MDM2-p53 foi fortalecida com a descoberta de um SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) no gene *MDM2* em humanos. Notavelmente, indivíduos que carregam este alelo específico apresentam uma maior expressão gênica de MDM2 e são predispostos a formas precoces de câncer. Sugere-se que diferenças das atividades basais de p53 podem ser suficientes para afetar o risco de desenvolver câncer (Levine & Oren, 2009).

Da mesma forma, a proteína anti-apoptótica, Bcl2 atua na regulação do potencial de membrana mitocondrial e bloqueia a liberação do citocromo *c* impedindo a apoptose dentro do citoplasma (Shimizu *et al.*, 1998). Sob várias circunstâncias, a atividade da proteína Bcl2 pode ser regulada pela clivagem de caspases (Clem *et al.*, 1998). O equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas é um ponto chave que determina a morte celular ou a sobrevivência (Oltvai *et al.*, 1993; Del Puerto *et al.*, 2010).

Em mamíferos, Bcl2 tem aproximadamente 20 componentes, e todos compartilham no mínimo um domínio conservado (BH) homólogo (Figura 5). Este clã inclui outras quatro proteínas anti-apoptóticas: Bcl-xl, Bcl-w, A1 e Mcl1; e dois grupos de proteínas que promovem a morte celular: Bax e BH3. Membros da família Bax têm sequências similares a Bcl2, especialmente nas regiões BH1, BH2 e BH3, mas somente o *motif* BH3 é necessário e suficiente para interagir e iniciar a morte celular (Cory & Adams, 2002).



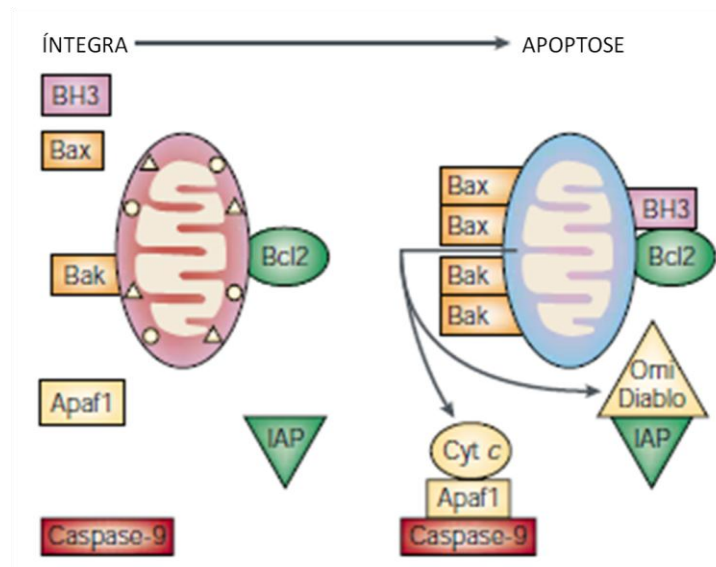
**Figura 5.** Três subfamílias de proteínas Bcl2. Regiões  $\alpha$ -hélice são relatadas, bem como, as quatro regiões altamente conservadas (BH1-4); TM, domínio transmembrana (adaptado de Cory & Adams, 2002).

No programa genético de uma célula há uma ligação muito forte entre a apoptose e o câncer, e fundamentalmente, esse processo passa por Bcl2. Um defeito no sistema de morte celular pode trazer inúmeras vantagens para as células neoplásicas. Essas células podem persistir em locais hostis (por exemplo: onde citocinas e oxigênio são limitados), evitando a morte celular que é freqüentemente imposta como um mecanismo de segurança e por outras mudanças oncogênicas que envolvem formas mais agressivas de neoplasias (Cory & Adams, 2002).

O enfraquecimento do processo apoptótico é, também, um significativo impedimento para a terapia citotóxica. Certas mutações que privilegiam o desenvolvimento tumoral podem reduzir a resposta à quimioterapia antineoplásica e radioterapia (Cory & Adams, 2002).

A presença de Bax ou Bak, além de ser essencial para o processo apoptótico de muitos tipos celulares, é conhecida por terem suas principais funções ligadas à membrana mitocondrial (Cory & Adams, 2002). A deficiência de Bax pode causar eventos que culminam com a supressão de p53 por oncogenes (Oda *et al.*, 2000).

Em células normais, Bax é monomérica e encontra-se no citoplasma ou ligados a membrana mitocondrial. Após o estímulo de morte celular, as proteínas Bax sofrem uma modificação conformacional induzindo sua oligomerização e translocação para a mitocôndria onde se tornam uma proteína de membrana integral (Festjens *et al.*, 2004). Essas modificações (Figura 6) expõem a região N-terminal e o domínio BH3 possibilitando a integração de outras proteínas na cauda carboxi-terminal de Bax (Cory & Adams, 2002).

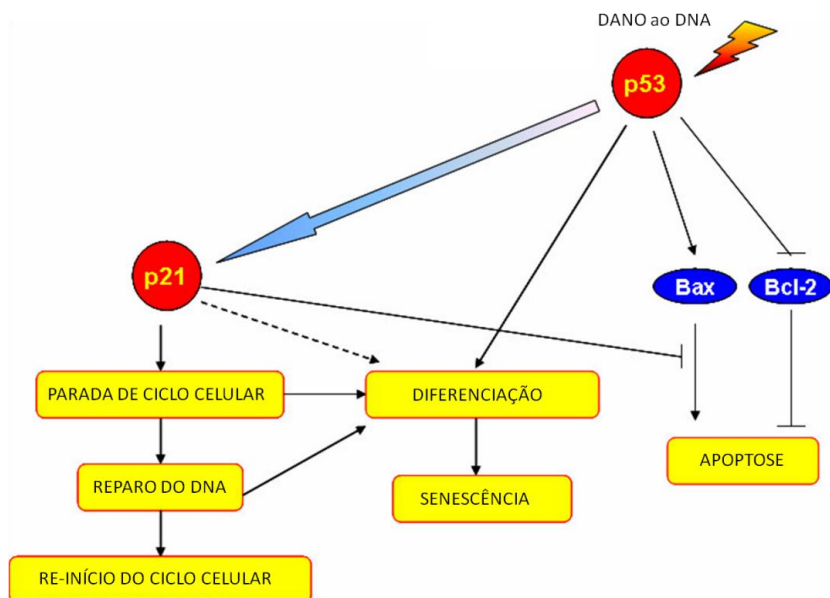


**Figura 6.** Modelo de integridade mitocondrial de mamíferos. Bcl2 mantém a integridade da membrana mitocondrial até ser neutralizada pelas proteínas BH3, Bax e Bak resultando na liberação do citocromo c, ativando Apaf1 que permite a ligação com a caspase-9. Outras pró-apoptóticas moléculas saem da membrana mitocondrial (Omi e Diablo) que antagonizam as IAPs, proteínas inibidoras da apoptose (adaptado de Cory & Adams, 2002).

De forma similar à Bax, *Insuline-like growth factors* (IGFs) são peptídeos multifuncionais que regulam a proliferação e diferenciação celular bem como a apoptose (pontos-chaves na tumorigênese). Os peptídeos de IGF ocorrem em altas concentrações na circulação e têm efeitos hormonais sistêmicos afetando o comportamento da célula. Na circulação IGF-I liga-se a principal IGF, ou seja, a IGF-BP3. Resultados de alguns estudos mostram que altos níveis de IGF-I na corrente sanguínea estão associados ao aumento do risco de câncer (próstata, mama, col retal e pulmão). Entretanto, altos níveis de IGF-BP3 estão associados a diminuição do risco de câncer. Sabe-se que essa proteína tem ação anti-proliferativa e pró-apoptótica (Renehan, 2004).

Além de Bax, IGF-BP3 é regulado por p53 e influencia nas decisões da via apoptótica. IGF-BP3 bloqueia a sinalização mitótica do IGF por impedir a sua interação com o receptor. Desta forma, o bloqueio da atividade da proteína pode aumentar ou diminuir a apoptose em resposta à célula (Levine, 1997).

As proteínas p21<sup>WAF1/Cip1</sup> pertencem a família Cip/Kip da cinases inibitoras de ciclinas (CKI) (p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p57<sup>Kip1</sup>). p21 funciona inibindo as CDKs nas fase G1/S e G2/M e, além disso, a expressão de p21 é normalmente controlada, a nível transcricional, por vias p53-dependentes (Figura 7) e p53 independentes. Contudo, a expressão de p21 também pode ser regulada a nível pós-transcricional (Gartel & Radhakrishnan, 2005).



**Figura 7.** Regulação de p21 dependente de p53. Estímulos à p53 podem elevar a expressão de *Bax* e diminuir a de *Bcl2* (Blundell, 2006).

Há uma série de agentes que podem ativar a transcrição de p21 independente de p53. Esses agentes induzem a ligação de diferentes fatores transcricionais nas específicas regiões *cis-acting* dentro do promotor de *p21* (Blundell, 2006).

Muitos estudos têm indicado que a angiogênese pode ser parcialmente regulada pela p53. Muitos fatores de crescimento têm um papel importante na angiogênese, mas dois deles tem chamado muita atenção: VEGF e bFGF (Liekens *et al.*, 2001; Przybylski, 2009).

A p53 no estado normal e funcional suprime os fatores que estimulam a angiogênese. A indução da formação vascular por um tumor é um processo conhecido e poder ser influenciado por fatores angiostáticos e angiogênicos que são resultados de uma complexa interação entre o tumor e as células endoteliais (Folkman, 1995). Dentre muitos fatores angiogênicos, o *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) é o mais importante. Em vários tumores, VEGF tem apresentado altos níveis de expressão e tem sido associada a angiogênese tumoral (Ferrara, 1995).

Os polipeptídeos VEGFs pertencem a família PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*). Em mamíferos, VEGFs são codificados por uma família de genes que incluem *VEGF A, B, C, D e PLGF (Placenta Growth Factor)*. *Splicing* alternativo e o processo proteolítico das VEGFs geram uma série de isoformas distintas com diferentes propriedades de sinalização (Cébe-Suarez, 2006).

Como citado anteriormente, bFGF (*Basic Fibroblastic Growth Factor*) também exerce funções importantes na célula, como por exemplo, a indução da migração, proliferação, diferenciação celular e angiogênese (Dow & White, 2000).

Examinando o efeito direto de bFGF sob as células endoteliais, foi observado que esta proteína tem um efeito indireto no controle da expressão de VEGF no endotélio de músculos lisos (Przybylski, 2009). O bFGF pode ser internalizado por receptores nas membranas celulares e subseqüentemente translocado e acumulado no núcleo, onde pode estimular a transcrição de genes ribossomais durante a fase de transição  $G_0 \rightarrow G_1$  no ciclo celular (Chen *et al.*, 2004).

Além disso, bFGF pode regular a expressão de colagenases intersticiais, uroquinases (uPa) e  $\beta_1$  Integrinas, todas quais são importantes na invasão das células endoteliais na matriz durante a angiogênese (Bikfalvi *et al.*, 1997)



O estudo da expressão genômica de tumores representa uma plausível plataforma de desenvolvimento de ferramentas de precisão para prognóstico e criação de uma nova fronteira na medicina. Estudos similares estão sendo feitos com outros tipos de câncer para melhorar o entendimento da real função da p53 e suas implicações nas neoplasias (Levine & Oren, 2009).

#### **2.4. Dados epidemiológicos em neoplasias caninas e sua relação com alterações no gene *TP53***

O desequilíbrio entre a proliferação e inibição celular resulta em uma transformação maligna das células normais. Em um estudo realizado com 136 neoplasias de cães, foram relatados que 42,6% das amostras correspondem a tumores de pele e 20,6% a tumores de mama (Mukhopadhyay & Som, 1990). Em um estudo com diferentes condições neoplásicas, Brodey *et al.* (1983) observou que de todas as neoplasias encontradas em fêmeas, 52% são tumores de mama, sendo que, mais de 53% dos tumores mamários em fêmeas são malignos.

Else & Hannant (1979) mostraram em um estudo epidemiológico com 226 casos, que os tumores de glândulas mamárias em caninos fêmeas tiveram uma alta incidência. A raça Poodle (18%) foi a mais susceptível para o desenvolvimento de tumores seguida da raça Labrador (10.6%) e Cocker Spaniel (8%). Da mesma forma, Zatloukal *et al.* (2005) relataram que entre diferentes raças, os animais da raça Poodle apresentaram alto risco de desenvolver tumores de mama, seguidos por animais da raça Cocker Spaniel e Dachshunds. Segundo Egenvall *et al.* (2005) Dobermanns e Boxers tem um maior risco de desenvolver tumores de mama.

Poucos estudos relacionam a idade dos animais com o aparecimento de distintos tipos de câncer, pois há uma grande amplitude de tempo de vida entre as diversas raças. Um estudo conduzido por Zatloukal *et al.*, (2005) com 17053 cães relatou que a média de idade de cães com tumores de mama benignos foi de 8,9 anos e de tumores malignos foi de 10 anos.

O processo cancerígeno evolui devido a aberrações nos genes associados ao crescimento celular (Levine, 1997). O gene *TP53* tem sido intensivamente investigado em diversos tipos de cânceres (Levine e Oren, 2009) e a presença de mutações são observadas em  $\pm 60\%$  de tumores humanos (Levine *et al.*, 1991). Desde 1978, o cão tem sido proposto como um modelo para estudos do câncer (Hewitt, 1978). A maioria das mutações no gene *TP53*, tanto em humanos como em cães, ocorrem em 4 dos 5 domínios altamente conservados da proteína localizados entre os exons 5 ao 8, constituindo uma série de “hotspots” (Walker *et al.*, 1999; Yonemaru *et al.*, 2007).

Muto *et al.* (2000) avaliaram 63 amostras de tumores mamários e encontram 11% de mutações no gene *TP53* em tumores benignos e 20% de mutações em carcinomas. Das mutações encontradas, 80% estavam localizadas nos domínios conservados do gene *TP53*. Da mesma forma, Johnson *et al.* (1998) analisaram 15 cães com osteossarcoma apendicular e constatou que 46,7% apresentavam mutações no gene *TP53* nos mesmos “hotspots” descritos em humanos. Por outro lado, Mayr *et al.* (2002) avaliaram 19 casos de hemangiossarcomas e identificou apenas 5,3% de mutações no gene *TP53* em cães.

Powell *et al.* (2000) evidenciaram mutações no gene *TP53* entre o exon 4 ao 8 em 17% dos casos (n=1037) de tumores de mama caninos pela técnica de SSCP. Quando confirmadas por seqüenciamento, 12 mutações foram encontradas no exon 4, 67 no exon 5, 11 no exon 6, 42 no exon 7 e 46 no exon 8. Além disso, significantes associações foram detectadas entre as mutações no gene *TP53* e as características de prognóstico reservado

como alto grau histológico, tamanho do tumor e baixa quantidade de receptores hormonais, mas por outro lado, não constataram relação com a ocorrência de metástase em linfonodos.

Estudos envolvendo 69 carcinomas de mama em cães foram analisados por SSCP e seqüenciamento, os quais evidenciaram 17% de mutações entre os exon 5 ao 8 do gene *TP53* (Wakui *et al.*, 2001). Lee *et al.* (2002) estudaram 20 tumores mamários de cães para detecção de mutações no gene *TP53* por PCR com seqüenciamento direto, e reportou 4 mutações *missense* e uma mutação sem-sentido em 10 (40%) das lesões malignas.

O presente trabalho teve por objetivo o estudo da freqüência de alterações numa região do gene *TP53* e sua relação com a expressão do mesmo com outros genes relacionados a apoptose, controle de ciclo celular e angiogênese, em tumores de cães (*Canis familiaris*).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleção de tumores de animais e coleta

Após a autorização dos proprietários, foram coletadas 70 amostras de tecidos de caninos de qualquer tipo, durante as cirurgias de rotina, provenientes da Clínica Veterinária Pio X de Caxias do Sul/RS. Para a criação de uma coleção de tumores cada animal doador dispôs de 2 amostras de tecido tumoral (aprox. 3x3x10 mm) e 1 amostra de tecido normal (aprox. 3x3x10 mm). Para que a amostra seja considerada um tecido normal, essa foi coletada distante do campo cirúrgico (> 6 cm). Uma amostra de tecido tumoral foi mantida em formalina tamponada 10% e o restante (1 amostra tumoral e 1 normal) foram mantidas em freezer -80°C, sem aditivos, para posterior análise através de PCR, SSCP e qRT-PCR. Além disso, foram coletadas 21 amostras de sangue, 4 amostras de tecido mamário normal e 4 amostras de pele para serem utilizadas como controle, igualmente autorizadas pelos proprietários.

Junto com as amostras foram enviados os exames clínicos e uma descrição do histórico do paciente na clínica. Foi utilizado o estadiamento TNM (*T – tumor, N – linfonodos, M – metástase*), originalmente criado para humanos pela UICC (União Internacional Contra o Câncer), conforme adaptado para pequenos animais por Withrow e MacEwen (2001) e Morrison (2002). Para neoplasias mamárias, a classificação empregada foi: T1 para tumores inferiores a 3 cm, T2 para tumores entre 3 e 5 cm, e T3 para tumores acima de 5 cm. Quanto ao envolvimento de linfonodos a classificação é dada da seguinte forma: N0 para ausência de metástase em linfonodos, N1 para presença de metástase em linfonodo regional, e N2 para comprometimento de outros linfonodos. A ausência ou presença de metástases é orientada por M0 ou M1, respectivamente. Para tumores de pele e

subcutâneos a classificação utilizada foi a seguinte: T1 para tumores inferiores a 2 cm, T2 para tumores entre 3 e 5 cm, T3 para tumores acima de 5 cm, e T4 para tumores com invasão na musculatura, ossos ou cartilagem. Quanto ao envolvimento de linfonodos e metástases distantes a classificação usada foi a mesma para tumores de mama.

### **3.2. Análise histopatológica das amostras**

As amostras coletadas foram enviadas para o Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Passo Fundo/RS e para o Laboratório de Patologia da Universidade de Caxias do Sul/RS para realização das análises histopatológicas. Nestas análises, foram determinados os tipos e os graus histológicos das neoplasias.

As análises histopatológicas foram realizadas através de métodos convencionais de rotina (Behmer *et al.*, 1976). Resumidamente, após fixação em formalina tamponada 10%, os tecidos neoplásicos foram incluídos em parafina e cortados com 4 micrometros para confecção das lâminas. O método de coloração hematoxilina-eosina foi escolhido devido à simplicidade e confiabilidade da técnica. A hematoxilina é um corante básico que cora, em azul, as estruturas celulares como o núcleo. A eosina é um corante ácido que evidencia em vermelho ou rosa o citoplasma, filamentos citoplasmáticos e fibras extracelulares.

O grau histológico é a classificação que o patologista utiliza para descrever microscopicamente o grau de anormalidade morfológica, desvios no padrão de crescimento (mitose) e grau de invasão das células tumorais. Existem diversas classificações, mas a mais utilizada é a escala de I a III descrita por Mouriquand & Pasquier (1980). O grau I representa as neoplasias bem diferenciadas (padrão mitótico baixo ou ausente), grau II corresponde às neoplasias intermediárias e o grau III indica as neoplasias pobremente

diferenciadas e com um elevado grau de mitose. Esta última sugere um prognóstico reservado quanto à sobrevida do paciente.

### **3.3. Extração de DNA total**

As amostras destinadas à extração de DNA foram coletadas e congeladas imediatamente a -80° C. Posteriormente, um fragmento da amostra foi seccionado com o auxílio do criostato *CM1100* (Leica®, Germany) à -20°C. Cortes alternados foram avaliados através de técnicas histopatológicas (item 3.2) e selecionados, para extração de DNA, apenas os cortes nos quais os dois espelhos apresentavam apenas tecido tumoral.

A extração de DNA total foi realizada com base no protocolo descrito pelo fabricante do kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega®, USA). Após ressuspender o DNA com 100 µl de TE (10 mM Tris- HCl pH 8,0 e 1 mM de EDTA) o mesmo foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e sua pureza avaliada por determinação do índice A260/A280. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão de TBE 1X.

### **3.4. Análise de alterações no gene *TP53* através de SSCP**

A técnica de SSCP foi realizada com base no protocolo efetuado por Pinheiro *et al.* (1999) de forma adaptada. A amplificação dos exons 5, 6 e 7 de *TP53* foi executada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores desenhados com base na seqüência depositada no GeneBank (NC\_006587.2) e oligonucleotídeos iniciadores de controle positivo de polimorfismos (Megaprimer – MG) segundo Johnson *et al.* (1998). A seqüência dos oligonucleotídios iniciadores utilizados constam no Quadro 1.

**Quadro 1.** Caracterização dos *primers* do gene *TP53* para realização do SSCP.

LOCAL	SEQÜÊNCIA DO PRIMER	AMPLICON (pb)
Exon 5	F' - attcctccccgatggctctta R' - cctcaactcccgcctcacaaa MG' - attcctccccgatggctcttaggtAttgc	204
Exon 6	F' - gaccctgggcctaccttct R' - ggcagaggagattccacattg MG' - ccgaccctgggcctaccttctacctcaggtTgctc	237
Exon 7	F' - ctgcttctcttctctcacctg R' - ccttcacctctcttcttctg MG' - ctgcttctcttctctcacctgggtagtgTaaac	193

As reações de PCR foram feitas num volume total de 25 µL contendo: 60 ng de gDNA, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 100 µM de cada dNTP, 320 nM de cada *primer* e 0,75 U de DNA polimerase. O protocolo de amplificação foi realizado usando o termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf®, Germany) com os seguintes passos: 94°C por 3 minutos seguido de 40 ciclos, onde cada ciclo apresentava 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 72° por 20 segundos.

Após a certificação da correta amplificação dos fragmentos em gel de agarose 1%, foi misturado 10 µl de produto de amplificação com 10 µl de tampão de desnaturação (95% de formamida, 500 mM de EDTA, 0,005 % de azul de bromofenol e 0,005% de xileno cianol). Essa mistura (amplicon + tampão de desnaturação) foi colocada em banho-maria a 95°C por 10 minutos, sendo imediatamente transferida para gelo. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10 % (29:1 de Acrilamida/bis-acrilamida), contendo 5% de glicerol, e submetidas a eletroforese a 100 volts por aproximadamente 6 horas em tampão TBE 1x. O gel foi corado com nitrato de prata 0,2% por 60 minutos e

revelado com hidróxido de sódio 3% aguardando até as bandas aparecerem (Sanguinetti *et al.*, 1994).

### 3.5. Seqüenciamento dos exons 5, 6 e 7 e dos introns 5 e 6 do gene *TP53*.

Primeiramente foram realizadas amplificações dos fragmentos utilizando o mesmo mix de SSCP-PCR descrito acima com os *primers* relatados no Quadro 2. A amplificação foi realizada usando o termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf®, Germany) com os seguintes passos: 94°C por 3 minutos seguido de 40 ciclos, onde cada ciclo apresentava 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 61°C e 72° por 60 segundos.

**Quadro 2.** Caracterização dos *primers* do gene *TP53* para realização do seqüenciamento.

LOCAL	SEQUÊNCIA DO PRIMER	AMPLICON (pb)
Exon5	F' – attcctccccgatggctctta	895
Exon7	R' – ccttcacctcctcttgtcttg	

Após a amplificação, os amplicons foram avaliados e quantificados em gel de agarose 1% utilizando como padrão o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, USA). Para seqüenciamento as amostras foram tratadas previamente com 0,25 µL de *Exonuclease I* 2.500U (Amersham Biosciense®, USA), 0,25 µL de *Shrimp Alkaline Phosphatase* 5.000U (Amersham Biosciense®, USA), 0,5 µL de água autoclavada e 6 µL de produto de PCR. Essa mistura foi incubada a 37°C durante 30 minutos e posteriormente a 80°C por 15 minutos.



Realizado o pré-tratamento enzimático, 5 a 20 ng de amplicon foram colocados em um tubo de 600 µL juntamente com 1 µL de iniciador (3,2 pmol) e completados com água autoclavada até o volume de 6 µL.

Os resultados do seqüenciamento foram analisados com a ajuda dos softwares BioEdit, CLC DNA Workbenche Clustal W.

### **3.6. Análise da expressão gênica de *TP53*, *Bcl2*, *Bax*, *IGF-BF3*, *VEGF*, *bFGF*, *p21* e *MDM2* através de RT-PCR quantitativo.**

#### 3.6.1. Extração de RNA total

As amostras destinadas à extração de RNA foram coletadas e congeladas imediatamente a -80° C. Posteriormente, um fragmento da amostra foi seccionado com o auxílio do criostato modelo *CM1100* (Leica®, Germany) à -20°C. Cortes alternados foram avaliados através de técnicas histopatológicas (item 3.2) e selecionados, para extração de RNA total, apenas os cortes nos quais os dois espelhos apresentavam apenas tecido tumoral.

A extração de RNA total foi realizada com base no protocolo descrito pelo fabricante do *TRIzol® Reagent* (Gibco-BRL). Após ressuspender o RNA com 100 µl de 0,1% DEPC (dietilpirocarbonato) o mesmo foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e sua pureza avaliada por determinação do índice A260/A280. A integridade e possível contaminação dos RNAs foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão de TBE 1X.

### 3.6.2. Desenhos dos *primers* dos genes específicos e de referência

Os *primers* foram desenhados a partir de banco de dados presentes no GeneBank utilizando os programas BioEdit e FastPCR. O Quadro 3 apresenta as características destes os *primers*.

**Quadro 3.** Caracterização dos pares de *primers* dos genes específicos e de referência

LOCAL	SEQUÊNCIA DO PRIMER	AMPLICON (pb)
<i>p21</i>	F' - gacagctcaggaggaccacc R' - aagatcagccggcgtttgag	165
<i>Bax</i>	F' - gacacctgagctgcccttgg R' - atctcagctgccactcggaag	173
<i>Bcl2</i>	F' - gtggagagcgtcaaccggga R' - cgccttcagagacagccagg	186
<i>IGF-BP3</i>	F' - ctccgagtacaagcgggagac R' - tgtccacacaccagcagaagc	197
<i>MDM2</i>	F' - actgtgtatcaggcagggga R' - ccaattctcacgaaggcccaa	154
<i>VEGF</i>	F' - caaacctcatcaaggccagca R' - accgggatttcttgcgcttc	150
<i>bFGF</i>	F' - gcagaagagagaggcgttgtgtc R' - tgcccagttcgtttcagtgcca	198
<i>TP53</i>	F' - tgccttatgagccaccgag R' - cctcaaagctgttgcgtcca	162
<i>B2M</i>	F' - ctggtttcctggccttgtc R' - gtggatggaaccctgacacg	150
<i>GAPDH</i>	F' - gcaaattccacggcacagtca R' - ccgcctttcaagtgagccccag	184
<i>RPS5</i>	F' - agctctttgggaaatggagcactga R' - cgctccacaatggggcactg	160
<i>RPS19</i>	F' - gagactcgacgcccgacttgtg R' - acagtgtccaccattcaggga	188
<i>β-ACT</i>	F' - tgactgtggcttgtgccagg R' - ttcagggtcaggatgccctct	204

### 3.6.3. Transcrição reversa para obtenção de cDNAs

Uma vez obtido o RNA total dos tecidos neoplásicos e dos controles, procedeu-se a reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), utilizando-se o kit *ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase* (Promega®, USA) de acordo com as especificações do fabricante.

### 3.6.4. Análise de qRT-PCR

O método de quantificação utilizado neste estudo foi *Sybr® Green* (Invitrogen, USA). As reações de qRT-PCR foram feitas num volume total de 25 µL contendo: 12,5 µL de cDNA diluído, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 100 µM de cada dNTP, 100 nM de cada *primer*, 4 µL de *Sybr® Green* e 0,25 U de DNA polimerase *platinum*. O protocolo de amplificação foi realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul usando o equipamento *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®, USA) com os seguintes passos: 94°C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos, onde cada ciclo apresentava 15 segundos a 94°C, 10 segundos a 60°C e 72° por 10 segundos. A curva de desnaturação foi realizada de 50-94°C com acréscimo de 0,3°C por ciclo. As amostras foram avaliadas em duplicata ou quadriplicata dependendo do caso.

### 3.6.5. Análise dos resultados do qPCR

Para fins de análise, os genes constitutivos foram normalizados com base em dois controles de tecido normal. O programa *geNorm* foi utilizado para determinação dos melhores genes “padrão” para análise de expressão.

A expressão relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi utilizada para comparar os níveis expressos de cada gene (Livak & Schmittgen, 2001). O método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de quantificação relativa é dividido em etapas: calcula-se o  $\Delta Ct$  (diferença entre o  $Ct^{amostra}$  e o  $Ct^{genes\ constitutivos}$ ), o  $\Delta\Delta Ct$  (diferença do  $\Delta Ct^{amostra}$  e a média do  $\Delta Ct^{controles}$ ) e por fim o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Diferenças significativas dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  entre as amostras de um mesmo par de oligonucleotídeos iniciadores foram analisados pelo teste de Tukey com nível de significância em  $p < 0,05$ .

### **3.7. Análise estatística**

Os resultados obtidos em todos os ensaios foram analisados com auxílio do programa SPSS 16.0. De um modo geral foram realizadas análises de variância, comparação de médias pelo teste de Tukey considerando  $p < 0,05$ , e análises de correlação adequadas a cada tipo de dado. Os dendogramas foram obtidos pelo algoritmo “Neighbor-joining” utilizando distâncias “single-matching” com o auxílio dos programas SPSS 16.0 e MEGA 4.1.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Análises histopatológicas das amostras**

Das 70 amostras coletadas, 50 foram confirmadas através de análises histopatológicas como neoplasias malignas (Tabela 1), resultando em uma frequência de 71,4% das amostras suspeitas. A alta frequência de amostras neoplásicas entre aquelas coletadas deve-se à pré-seleção de amostras de tumores com características nitidamente malignas. Segundo levantamentos realizados por Brodey *et al.*,(1983) e Gilbertson *et al.*, (1983), 41% à 53% dos tumores mamários foram considerados malignos.

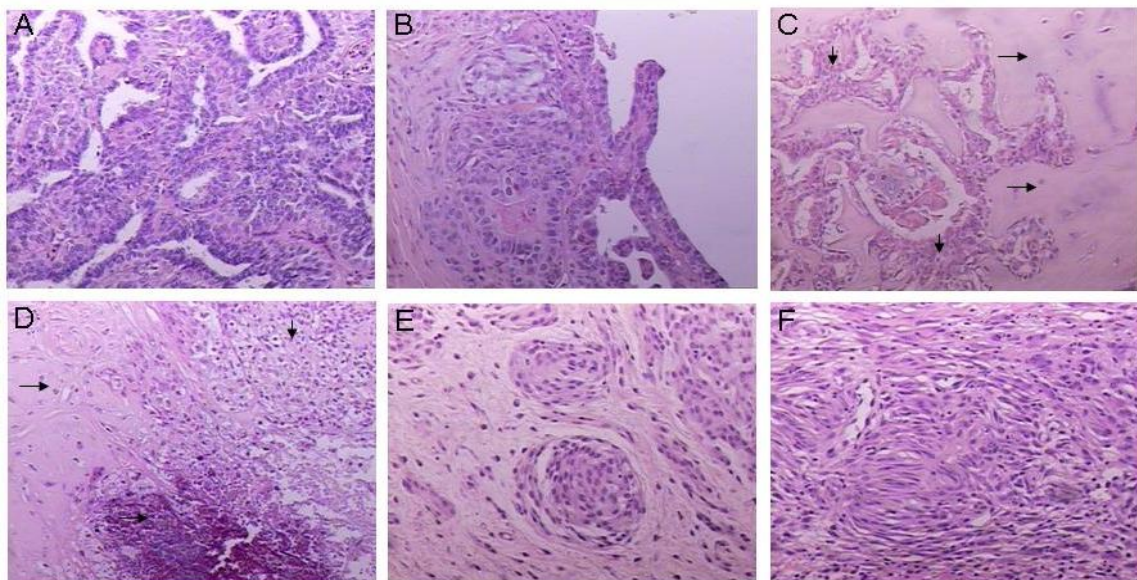
Dentre as neoplasias estudadas foram encontradas: (1)dezessete carcinomas túbulo-papilares complexos; (2) oito carcinosarcomas; (3) sete carcinomas tubulares, sendo um simples e seis complexos;(4) seis carcinomas de células escamosas; (5) três carcinomas de glândulas hepatóides; (6) dois carcinomas de células basais; (7) um melanoma maligno melanótico; (8) um carcinoma apócrino; (9) um hemangipericitoma; (10) um tricoepitelioma maligno; (11) um osteossarcoma; (12) um Schwanoma maligno e (13) um mastocitoma. Na Figura 8, encontram-se alguns exemplos de cortes histológicos visualizados e corados por HE 100X.

Além da classificação foram observadas alterações associadas às neoplasias, também conhecidas como síndrome paraneoplásica (SP). Os sinais clínicos paraneoplásicos mais evidentes foram: caquexia, hipercalcemia, hipoglicemia, anemia, hipergammaglobulemia, trombocitopenia, neutrofilia e manifestações cutâneas. Muitas vezes esses sinais se sobressaem à neoplasia e o seu desaparecimento está relacionado com o sucesso do tratamento (Withrow & MacEwen, 2001).

**Tabela 1.** Características anatomopatológicas e classificação (TNM) das neoplasias malignas de cães.

ID	SEXO	LOCAL	TIPO	GH	T	N	M	ST	SP
026	F	Mama	Carcinoma tubular simples	II	1	0	0	I	P
122	F	Mama	Carcinoma tubular complexo	II	1	0	0	I	A
086	F	Mama	Carcinoma tubular complexo	II	1	0	0	I	A
153	F	Mama	Carcinoma tubular complexo	II	2	2	0	IV	P
037	F	Mama	Carcinoma tubular complexo	III	1	0	0	I	A
002	F	Mama	Carcinoma tubular complexo	III	1	1	0	I	A
035	F	Mama	Carcinoma tubular complexo	III	2	0	0	II	A
025	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	I	1	0	0	I	A
044	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	I	2	0	0	II	P
027	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	II	1	0	0	I	P
062	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	II	1	0	0	I	A
101	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	II	1	0	0	I	A
029	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	II	1	0	0	I	A
301	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	II	1	0	0	I	P
009	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	II	1	1	0	I	A
036	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	II	2	0	0	II	A
034	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	II	2	0	0	II	P
045	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	II	2	0	0	II	P
032	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	II	2	1	0	IV	P
003	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	II	2	2	0	IV	A
040	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	III	1	0	0	I	A
160	M	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	III	2	0	0	II	A
164	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	III	2	0	0	II	P
033	F	Mama	Carcinoma túbulo-papilar complexo	III	1	0	0	I	A
163	F	Mama	Carcinossarcoma	I	1	0	0	I	P
123	F	Mama	Carcinossarcoma	I	2	0	0	II	A
012	F	Mama	Carcinossarcoma	I	2	0	0	II	A
046	F	Mama	Carcinossarcoma	I	2	0	0	II	A
087	M	Mama	Carcinossarcoma	II	1	0	0	I	A
007	F	Mama	Carcinossarcoma	II	2	1	0	IV	P
085	F	Mama	Carcinossarcoma	III	2	0	0	II	A
111	F	Mama	Carcinossarcoma	II	2	0	0	II	A
015	F	Mama	Carcinoma de células escamosas	II	1	2	0	IV	P
110	F	Mama	Carcinoma de células escamosas	I	2	0	0	I	P
013	F	Pele	Carcinoma de células escamosas	I	2	1	1	V	A
047	F	Pele	Carcinoma de células escamosas	II	1	0	0	I	A
011	F	Pele	Carcinoma de células escamosas	II	1	1	0	III	A
038	M	Pele	Carcinoma de células escamosas	III	2	0	0	II	P
042	F	Perianal	Carcinoma de glândula hepatóide	I	1	0	0	I	A
100	M	Perianal	Carcinoma de glândula hepatóide	II	1	0	0	I	P
150	M	Perianal	Carcinoma de glândula hepatóide	II	1	0	0	I	A
061	M	Pele	Carcinoma de células basais	I	1	0	0	I	A
160a	F	Pele	Carcinoma de células basais	I	1	0	0	I	A
039	F	Pele	Melanoma maligno melanótico	I	1	0	0	I	A
305	F	Pele	Carcinoma apócrino	I	1	0	0	I	P
096	F	Pele	Hemangiopericitoma	I	1	0	0	I	P
060	M	Pele	Tricoepitelioma maligno	I	1	0	0	I	A
094	F	Mama	Osteossarcoma	I	1	0	1	V	P
200	M	Pele	Schanoma maligno	II	1	0	0	I	A
004	F	Pele	Mastocitoma	III	1	1	0	II	P

\*\*GH – grau histológico; T – tumor (I-III). N – linfonodos (I-III). M – metástase (O-I). ST – estadiamento; SP – síndrome paraneoplásica (P – presença. A – ausência).



**Figura 8.** Lâminas HE, 100X: (A) Glândula mamária. Carcinoma túbulo-papilar complexo Grau I; (B) Glândula mamária. Carcinoma túbulo-papilar complexo Grau II; (C) Glândula mamária. Carcinossarcoma Grau I. Componente mesenquimal maligno (setas horizontais). Componente epitelial maligno (setas verticais); (D) Glândula mamária. Carcinossarcoma Grau III. Componente mesenquimal maligno (seta horizontal). Componente epitelial maligno (seta vertical); (E) Pele. Hemangiopericitoma Grau I; (F) Pele. Neurofibrossarcoma (Schwanoma maligno) Grau II.

Trinta e cinco das 50 amostras (70%) tumorais foram mamárias. As neoplasias mamárias estão entre os tumores mais comuns em cães fêmeas (Moulton *et al.*, 1986) e o risco de acometer cães machos é menor que 1% (Withrow & MacEwen, 2001). Cadelas castradas antes do primeiro ciclo estral têm aproximadamente 0,5% de chances de desenvolver tumores mamários, enquanto que o risco aumenta para 8% entre o primeiro e o segundo estro e extrapola os 26% após o segundo estro (Brody *et al.*, 1983). O desenvolvimento de neoplasias mamárias é claramente hormônio-dependente, por isso o uso prolongado de progestágenos e estrógeno aumenta o risco do câncer nesses animais (Rutteman, 1992). No presente trabalho não foram relatados dados referentes à utilização de anticoncepcionais já que muitos dos animais coletados não possuíam histórico na clínica.

Embora as neoplasias de pele sejam as mais prevalentes de todos os tumores (um terço) (Bostock, 1986; Rothwell *et al.*, 1987), no presente estudo representaram apenas 24% das amostras, seguido por 6% de tumores de glândula perianal. Além disso, os graus histológicos observados nas 50 amostras confirmadas como neoplásicas apresentaram a seguinte distribuição: 32% das amostras grau I, 48% amostras grau II e em 20% amostras observou-se o grau III (Tabela 2).

**Tabela 2.** Classificação do grau histológico de acordo com o tecido afetado.

TECIDO AFETADO	GRAU			TOTAL
	I	II	III	
MAMA	8 (22,9%)	19 (54,2%)	8 (22,9%)	35 (70%)
PELE	7 (58,3%)	3 (25%)	2 (16,7%)	12 (24%)
PERIANAL	1 (33,3%)	2 (66,7%)	-	3 (6%)
<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>10</b>	<b>50</b>

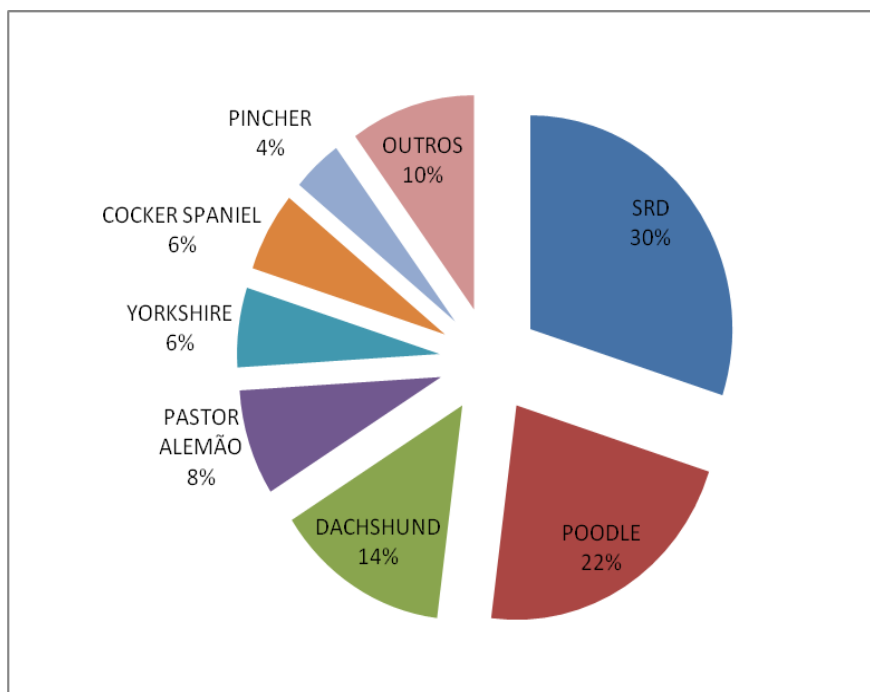
Tumores de glândulas perianais ou hepatóides (morfologia semelhante a células hepáticas) estão freqüentemente relacionadas ao sexo masculino devido à presença de receptores de testosterona e estrógeno (Vail *et al.*, 1990). Apesar do baixo número de pacientes acometidos por tumores perianais, foi evidenciada maior prevalência destes tumores em machos (66,7%), corroborando os dados da literatura. Estudos realizados em 2700 cães por Goldschmidt & Shofer (1992) mostraram que a neoplasia perianal é a terceira neoplasia mais prevalente, e que 76% desses eram machos.

Em tumores de mama observou-se uma maior prevalência de neoplasias malignas de grau II (54,2%) seguida de neoplasias grau I (22,9%) e III (22,9%). Em contrapartida, os tumores de pele apresentaram maior prevalência no grau I (58,3%), acompanhadas do grau II (25%) e grau III (16,7%).



Além de relacionar os tipos de neoplasias com o grau histológico é importante ressaltar que as raças exercem um papel fundamental na incidência de doenças, em particular aquelas de base genética ou com forte interferência gênica. A alta endogamia racial e o baixo fluxo gênico entre as raças podem mudar as frequências alélicas e fixar alelos que elevam ou reduzem a susceptibilidade de uma determinada raça à diferentes doenças (Sutter *et al.*, 2004; Tamburini *et al.*, 2009).

A análise das raças dos cães acometidos por neoplasias malignas (Figura 9) permitiu evidenciar uma maior incidência em cães SRD (Sem Raça Definida) sendo equivalente a 30% do total das neoplasias avaliadas, seguido de cães da raça Poodle (22%), Dachshund (14%), Pastor Alemão (8%), Yorkshire (6%), Cocker Spaniel (6%), Pincher (4%), Sharpei (2%), Pointer (2%), Fox (2%), Schinauzer (2%) e Boxer (2%).



**Figura 9.** Porcentagem de animais acometidos por neoplasias malignas de cães de acordo com a raça.

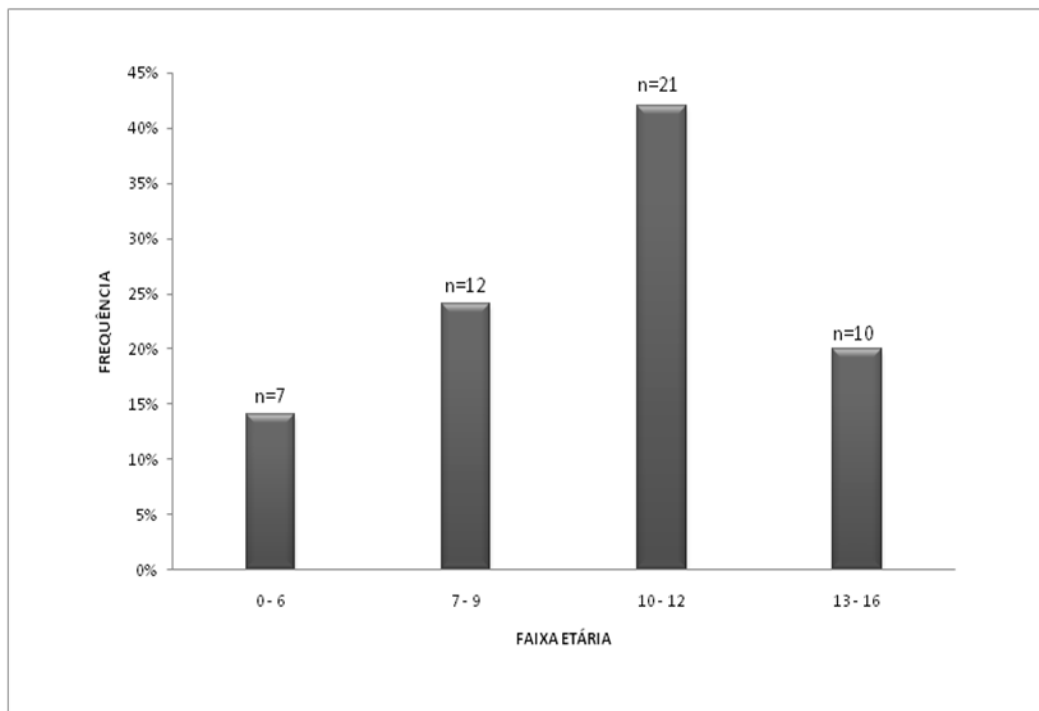
Cabe lembrar, que a incidência de tumores nas distintas raças no presente estudo não representa um dado epidemiológico, mas apenas o número de animais acometidos por neoplasias dentro de uma amostra aleatória em termos raciais. Apesar disso, os dados mostram maior prevalência de neoplasia entre animais com raça definida (70%). Dentre as raças, sobressai a alta frequência de Poodle, a qual apesar de não representar uma porcentagem dos animais desta raça acometidos por câncer, corrobora a predisposição a neoplasias desta raça (Gross & Brimacombe, 1986; Goldschmidt & Shofer, 1992).

Alguns cânceres parecem ocorrer mais frequentemente em diferentes cães e a incidência de muitos tipos de câncer varia de acordo com a raça (Tamburini *et al.*, 2009). Cães da raça Poodle são mais predispostos a desenvolver carcinomas de células basais (Goldschmidt & Shofer, 1992) e tumores das células escamosas (Gross & Brimacombe, 1986). Segundo Scoth *et al.* (1995), os cães da raça Boxer tem maior predisposição a melanomas e linfomas e Cocker Spaniel à desenvolver linfomas e hemangiopericitomas.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a incidência de câncer aumenta drasticamente com a idade, provavelmente devido ao acúmulo de fatores de riscos. Com o envelhecimento, os fatores de risco e a tendência dos mecanismos celulares de reparo tornam-se menos eficazes. Análises demonstram que o processo que envolve câncer e envelhecimento é multifatorial (Hakim *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, observa-se uma maior incidência de animais com câncer na faixa etária igual ou superior a dez anos (62%), animais idosos, seguida por animais maduros (entre 7 e 9 anos) representando 24% dos casos, e baixa prevalência (14%) entre animais jovens com 0 a 6 anos (Figura 10). Ao relacionarmos as causas de morte nos animais, vemos que estudos abrangendo mais de 2000 animais, cerca de 45% dos cães com mais de dez anos morreram de cancer. Sem relacionarmos a idade, este numero representa 23% (Bronson, 1982).

A renovação de tecidos de organismos adultos permite repor as células que são perdidas através de eventos patológicos, aleatórios ou na diferenciação. Entretanto, a proliferação celular que ocorre na renovação dos tecidos põe o genoma em grande risco por adquirir e propagar mutações que podem conferir características malignas às células (Campisi, 2003).



**Figura 10.** Frequência das neoplasias malignas de cães de acordo com a idade.

Organismos complexos possuem diversas estratégias para bloquear o desenvolvimento de câncer, principalmente no período de maturação sexual e de reprodução. Esse processo é conhecido como mecanismos de supressão tumoral (Campisi, 2003). Os genes de supressão tumoral fazem parte deste mecanismo e previnem a morte prematura causada por câncer. Por esta razão, estes genes são conhecidos por favorecer a longevidade – genes que reduzem o processo de envelhecimento e promovem a saúde e sobrevivência dos organismos adultos (Barzilai & Shuldiner, 2001). Exemplos incluem genes

que codificam as proteínas p53 e a RB (*Retinoblastoma*) que controlam a resposta celular na apoptose e senescência celular (Campisi, 2003).

#### **4.2. Avaliação de alterações no gene *TP53* de tecidos tumorais e normais em cães.**

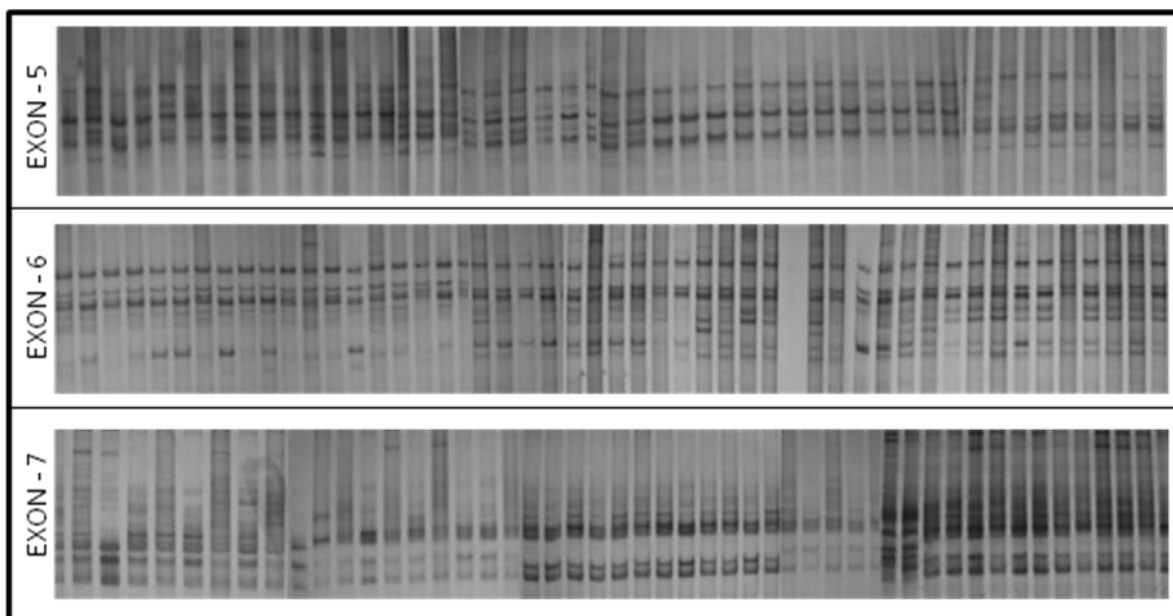
A avaliação de alterações no gene *TP53* foi realizada através de duas técnicas, SSCP de amplificadas dos exons 5, 6 e 7, e seqüenciamento da região compreendendo o exon 5, intron 5-6, exon 6, intron 6-7 e exon 7. Estes exons foram escolhidos com base na frequência de alterações em estudos desenvolvidos em humanos (*The p53Mutation Handbook* - [http://p53.free.fr/Database/p53\\_database.html](http://p53.free.fr/Database/p53_database.html)) e nos poucos relatos em cães (Muto *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 1998).

Diversos trabalhos relatam o uso da técnica de SSCP-PCR para identificação de polimorfismos em fita simples de DNA no *TP53* (Fagin *et al.*, 1993; Wakui *et al.*, 2001; Yonemaru *et al.*, 2007). Visando determinar a ocorrência de mutações de ponto nos exons 5 ao 7, nos quais se localiza os *hotspots* mutacionais mais importantes (Brosh & Rotter, 2009) procedeu-se a análise através da técnica de SSCP-PCR.

De acordo com a Figura 11, podemos observar um padrão de SSCP para cada exon, com elevada repetibilidade entre géis e entre amostras. Em todos os exons foram observadas bandas comuns com distâncias relativas equivalentes que caracterizaram o exon em questão.

Nesta análise foram comparados os padrões de SSCP do tecido normal e tumoral do mesmo individuo para determinação de alterações genéticas no gene *TP53* no tecido neoplásico, sendo denominado “normal” quando ambas as amostras apresentaram o mesmo perfil, e “alterado” quando evidenciadas diferenças de perfil entre tecido normal e tumoral. Considerando todos os exons, podemos observar na Tabela 3 que 43,34% das

amostras tumorais apresentam alterações nos seus perfis em relação às amostras de tecido normal do mesmo indivíduo. O exon 6 apresentou a maior frequência de alterações (50% das amostras) e o exon 7 exibiu a menor frequência (36%). Essas alterações podem representar mutações presentes nas seqüências.



**Figura 11.** Padrões de SSCP do gene *TP53* de cães.

**Tabela 3.** Número de alterações no perfil do SSCP por exon do gene *TP53*

	NORMAL		ALTERADO	
	Nº	%	Nº	%
EXON 5	28	56	22	44
EXON 6	25	50	25	50
EXON 7	32	64	18	36
<b>TOTAL</b>	<b>85</b>	<b>56,67</b>	<b>65</b>	<b>43,34</b>

Para o exon 5 foram evidenciados oito perfis, sendo que os mais prevalentes foram o perfil A e o G presentes em 32% e 26% amostras, respectivamente. Nos controles (animais clinicamente sadios) observa-se que 86% e 14% apresentam o perfil A e G,

respectivamente. As bandas representadas pela distancia relativa equivalentes a 0,44 e 0,5 estavam presentes em todas as amostras. A frequência do perfil A é maior nos controles do que nos animais neoplásicos, enquanto a frequência do perfil G é menor nos controles. As bandas com distancia relativa de 0,34, 0,4, 0,42, 0,48 e 0,60 foram observadas em 6, 3, 2, 6 e 1 perfis, respectivamente. (Figura 12).

PERFIL POLIMÓRFICO DO GENE <i>TP53</i>																																																
DISTANCIA RELATIVA	EXON 5								EXON 6								EXON 7																															
	A	B	C	D	E	F	G	H	A	B	C	D	E	F	G	H	I	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M																			
0.02																																																
0.04																																																
0.06																																																
0.08																																																
0.1																																																
0.12																																																
0.14																																																
0.16																																																
0.18																																																
0.2																																																
0.22																																																
0.24																																																
0.26																																																
0.28																																																
0.3																																																
0.32																																																
0.34	-	-		-	-			-																																								
0.36																																																
0.38																																																
0.4		-	-																																													
0.42	-				-																																											
0.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																				
0.46																																																
0.48	-	-	-			-	-	-																																								
0.5	-	-	-	-	-	-	-	-																																								
0.52																																																
0.54																																																
0.56																																																
0.58																																																
0.6																																																
0.62																																																
0.64																																																
0.66																																																
0.68																																																
0.7																																																
0.72																																																
0.74																																																
0.76																																																
0.78																																																
0.8																																																
0.82																																																
0.84																																																
0.86																																																
0.88																																																
0.9																																																
0.92																																																
0.94																																																
0.96																																																
0.98																																																
1																																																
<i>NORMAL</i>	16	7	1	7	5	1	13	1	27	9	6	1	0	0	3	3	1	1	0	28	16	1	1	0	0	1	1	1	0																			
<i>TUMOR</i>	16	7	1	6	5	1	13	0	27	4	4	1	1	1	2	6	4	0	1	33	13	0	0	1	1	0	0	0	1																			
<b>TOTAL</b>	<b>32</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>26</b>	<b>1</b>	<b>54</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>61</b>	<b>29</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>																		
<i>CONTROLE (n=21)</i>	18								3								15								6								14								7							
<i>CONTROLE (%)</i>	86								14								71								29								67								33							

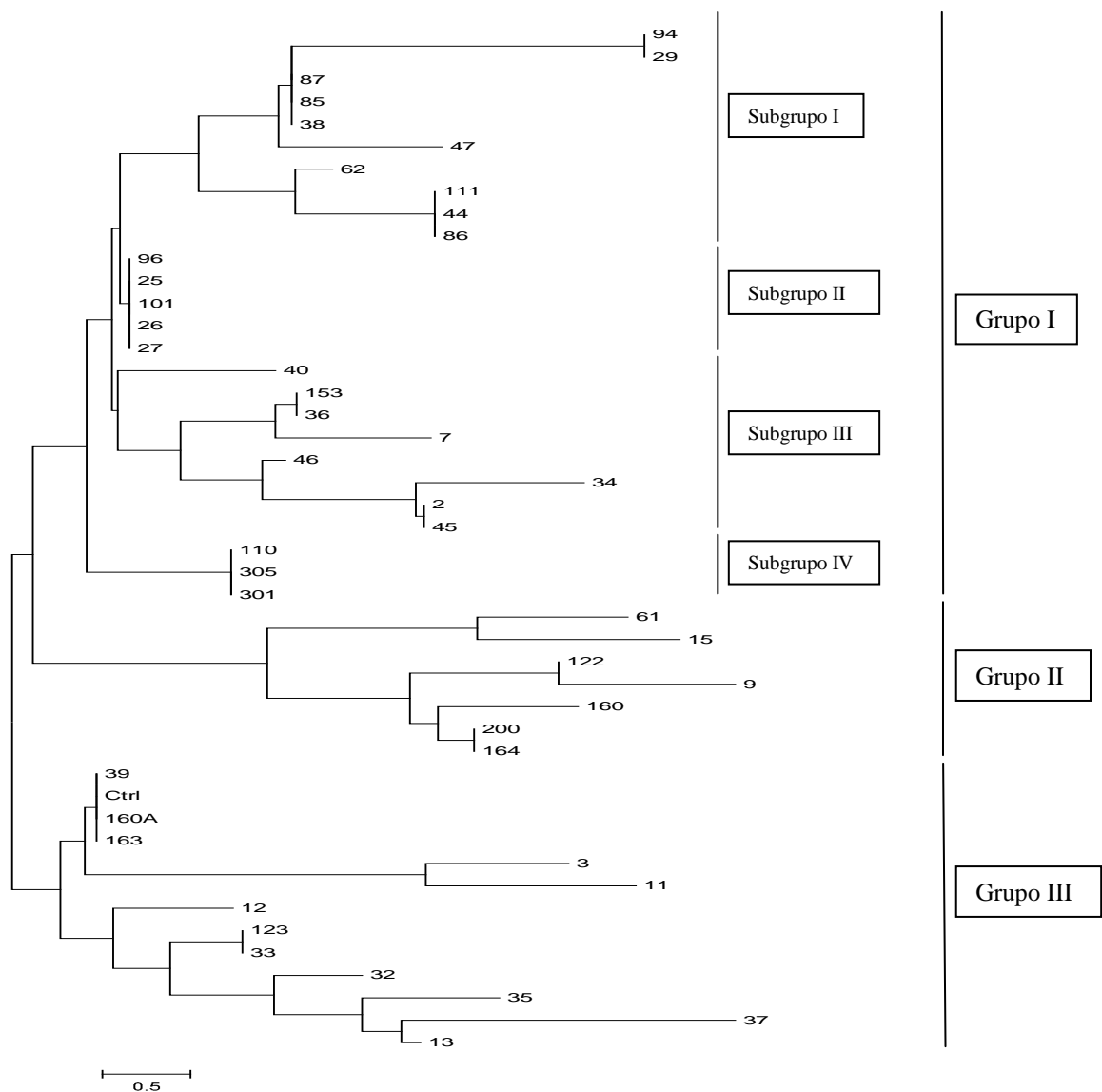
Figura 12. Tipos de perfis encontrados por SSCP nos distintos exons de *TP53*.

Considerando o exon 6, foram encontrados nove perfis polimórficos sendo os perfis A e B mais prevalentes, 54 e 13 amostras respectivamente. No grupo controle, cerca de 71% das amostras apresentaram o perfil A e 29% o perfil B. As bandas 0,3, 0,38, 0,44 e 0,62 estavam presentes em todos os perfis. A banda 0,16 foi encontrada em apenas um polimorfismo, a banda 0,48 em 5 perfis, a 0,52 em 6 e a 0,52 em 2 perfis.

No exon 7 foram observados 12 perfis polimórficos com prevalências dos perfis C e D, correspondendo a 61 e 29 amostras respectivamente. Nos controles, 67% apresentou o perfil C e 33% o perfil D. A banda 0,48 estava presente em todos os perfis. Já as bandas 0,1, 0,12 e 0,38 foram observadas em apenas um perfil cada. Enquanto, as bandas 0,08 e 0,4 apareceram em 4 perfis cada, as bandas de 0,16, 0,42, 0,5 e 0,52 em 2 perfis, a banda 0,58 em 3, a banda 0,62 em 9 e as bandas 0,44 e 0,56 em 8 perfis cada.

A análise de agrupamentos (Neighbor-Joining) baseada nos perfis polimórficos do gene *TP53* dos exons 5 ao 7 permitiu a separação de três grupos (Figura 13). O grupo maior foi formado por 26 amostras divididas em quatro subgrupos, sendo: 94, 29, 87, 85, 38, 47, 62, 111, 44 e 86 pertencentes ao subgrupo I; 96, 25, 101, 26 e 27 pertencentes ao subgrupo II; 40, 153, 36, 7, 46, 34, 2 e 45 pertencentes ao subgrupo III; 110, 305 e 301 pertencentes ao subgrupo IV. Este grupo apresentou predominância dos perfis G (50%) e B (23%) no exon 5, perfil A (61%) no exon 6 e perfil C (88%) no exon 7.

As amostras 61, 15, 122, 9, 160, 200 e 164 formaram o grupo II. Neste grupo há uma discrepância de perfis nos exon 5 e 6, porém todos apresentaram perfil D (100%) com relação ao exon 7. Já o grupo III foi composto pelas amostras 160A, 39, 163, Controle, 3, 11, 12, 123, 33, 32, 35, 37 e 13 (Figura 13). Neste grupo podemos evidenciar uma predominância do perfil A (54% e 46%) nos exons 5 e 6 respectivamente e também do perfil C (77%) no exon 7.

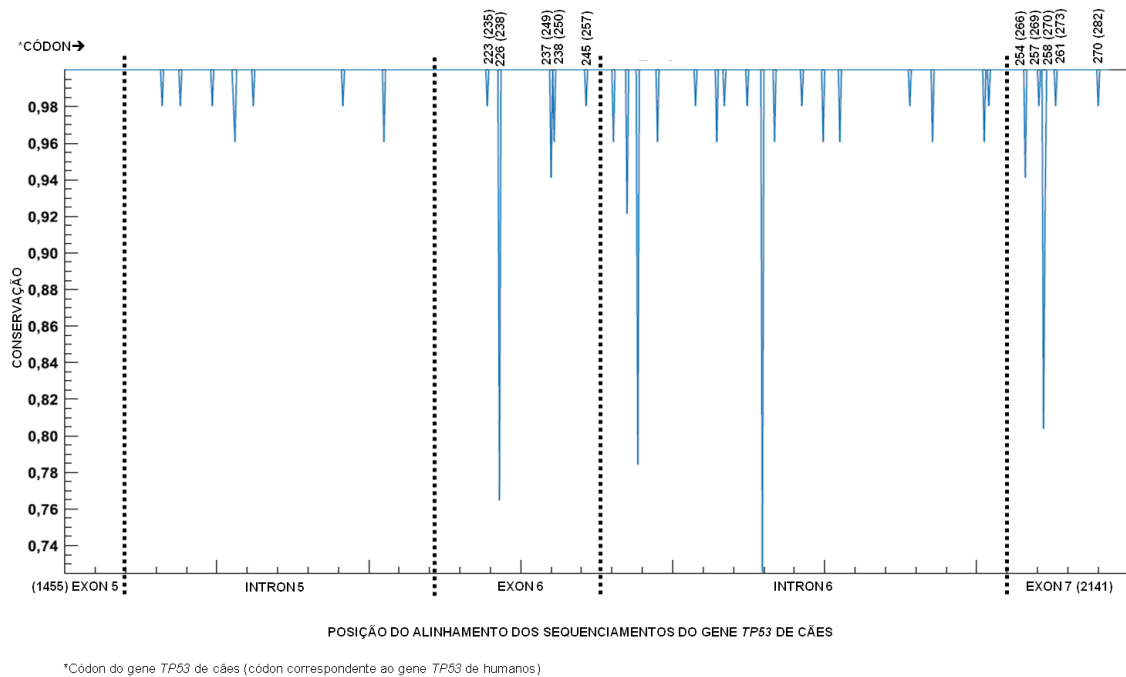


**Figura 13.** Análise de agrupamento (Neighbor-Joining) de distintos perfis polimórficos dos exons 5 ao 7 do gene *TP53* de neoplasias caninas.

Visando comprovar a existência de possíveis mutações nas seqüências correspondentes aos exons 5 ao 7 do gene *TP53*, as 50 amostras neoplásicas foram submetidas para seqüenciamento. O seqüenciamento foi realizado nas duas direções (*forward* e *reverse*) visando aumentar a precisão, especialmente nas regiões inicial e terminal. As seqüências obtidas foram comparadas com a seqüência obtida do GeneBank (NC\_006587.2).



Foram encontradas 39 alterações nas distintas regiões dos exons 6 e 7 sendo 34 transições e 5 transversões. Destas alterações, 38 se encontraram em heterozigose, caracterizadas pela presença de dois nucleotídeos possíveis na sequência obtida, e uma mutação *missense* em homozigose. Alterações nucleotídicas nos exons 6-7 foram constatadas em 42% (21/50) dos tumores analisados, sendo que oito (16%) apresentaram mais de uma substituição de bases. A Figura 14 mostra o nível de conservação nas sequências nucleotídicas dos exons e introns e nos distintos códon dos exons 5, 6 e 7 do gene *TP53*.



**Figura 14.** Nível de conservação nos exons 5, 6 e 7 e introns 5 e 6 do gene *TP53* em tumores caninos.

Conforme pode ser observado na Figura 14, a maior parte das alterações observadas encontram-se dentro dos introns (59%). Análise destas alterações indica que as mesmas provavelmente não determinam modificação de *splicing* já que nenhuma delas se encontra nas regiões conservadas de início e final de intron, ou nas regiões ricas em citosina ou na adenina sub-terminal conservada.



Como pode ser observado na Figura 15, somente a amostra 094 (osteossarcoma) apresentou uma mutação em homozigose do tipo *missense* no exon 7. Neste caso ocorreu uma transição G→A, que resulta na mudança do códon 270 de CGC para CAC e conseqüentemente leva a uma substituição de uma arginina por histidina.

Seqüenciamento de tecido normal do paciente 094 não mostrou alteração (em homo ou heterozigose) no códon 270. Esta observação indica que a transição A→G observada no tecido tumoral surgiu durante o desenvolvimento neoplásico, provavelmente em heterozigose inicialmente, e posteriormente, em homozigose como detectada. Em um estudo em pacientes humanos com osteossarcoma realizado por Wunder *et al.* (2005), 42% dos casos contendo mutações apresentavam evidências de perdas de heterozigosidade indicando perda alélica ou deleções.

No osteossarcoma humano tem sido verificada alta prevalência de alterações no gene *TP53*. Deleções alélicas de *TP53* têm sido relatadas em mais de 70% dos casos (Andreassen *et al.*, 1993). Entretanto, mutações de ponto, pequenas deleções, inserções e mutações nas regiões de *splice* são referidas em 18 à 100% dos casos (Smith-Sorensen *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1996). Estudos ressaltam o importante papel do *TP53* no desenvolvimento deste sarcoma, sendo determinante do comportamento clínico e resposta terapêutica em cães (Johnson *et al.*, 1998).

### **4.3. Análise da expressão gênica das amostras**

Neste estudo verificou-se a expressão relativa dos genes *TP53*, *Bax*, *p21*, *MDM2*, *Bcl2*, *IGF-BP3* e *bFGF* em neoplasias caninas (n=45) e controles (n=8), tecidos normais de pacientes clinicamente sadios. Além dos anteriormente citados também foi avaliada a expressão do gene *VEGF-A*, envolvido na proliferação tumoral e metastática (Folkman,

1995). Para este gene, apesar de ter sido verificada a expressão em amostra controle positiva de cultura de fibroblastos de hamster (V79), não foi evidenciada expressão nos tecidos neoplásicos e controles de cães. A expressão do gene *VEGF* é alta em inúmeros tumores benignos e malignos, principalmente os de origem vascular incluindo angiosarcomas, hemangiomas e tumores sólidos (Arbiser *et al.*, 2000). Já em tumores mamários caninos foram verificados níveis aumentados de expressão do gene *VEGF-C*, outro gene da família VEGF responsável pela linfoangiogênese (Van der Auwera *et al.*, 2005)

Em um primeiro momento, 5 genes de referência (*GAPDH*, *RPS5*, *RPS19*, *B2M* e  $\beta$ -*ACT*) foram avaliados para determinação dos melhores padrões internos. Foi utilizado o software *geNorm* que calcula a estabilidade da expressão gênica baseada na variação média pareada entre todos os genes estudados. Os resultados obtidos mostraram que a associação entre os genes de referência *RPS5*, *RPS19* e *GAPDH* apresentaram uma maior estabilidade para o estudo da expressão gênica em neoplasias caninas de pele e mama, do que os genes *B2M* e  $\beta$ -*ACT*. Estes resultados corroboram as observações de Brinkhof *et al.* (2006), que evidenciaram que a expressão dos genes *RPS5* e *RPS19* é as mais estáveis em tecidos mamários caninos, enquanto a expressão de  $\beta$ -*ACT* é o menos estável.

Posteriormente, a análise de qPCR foi realizada para calcular o  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  das amostras e dos controles tanto para as neoplasias mamárias como as de pele. O cálculo de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  foi realizado individualmente para cada um dos genes de referência (*RPS5*, *RPS19* e *GAPDH*), sendo posteriormente calculada a média.

Visando estabelecer de forma mais clara as relações de expressão entre os sete genes em estudo, os resultados foram analisados através de análise multivariada de agrupamentos calculando-se as distâncias por “Single-matching” e as relações de expressão observadas

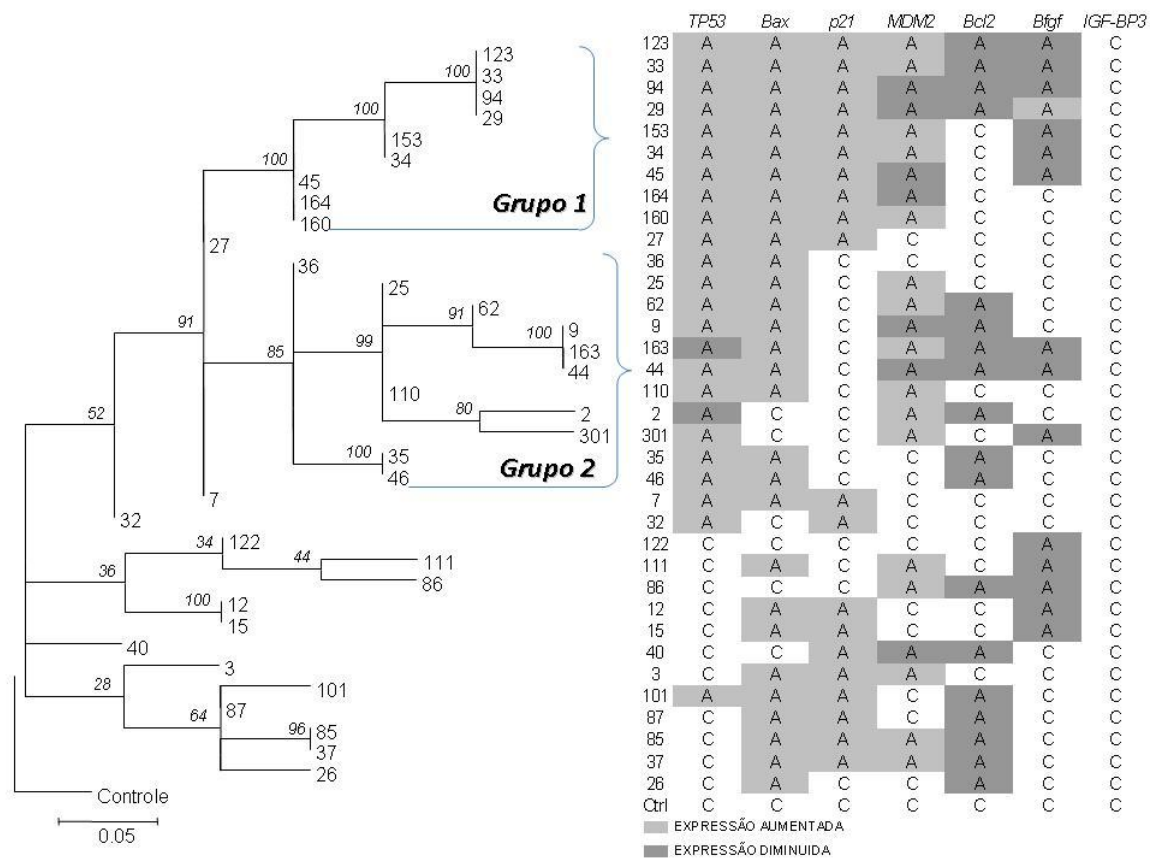
em dendogramas gerados por Neighbor-Joining. A significância dos agrupamentos foi avaliada através de “bootstrap” com 1000 repetições.

Nas Figuras 16 e 17 são evidenciados os dendogramas gerados com base na expressão relativa dos genes *TP53*, *Bax*, *p21*, *MDM2*, *Bcl2*, *IGF-BP3* e *bFGF* em neoplasias de mama e de pele, respectivamente, assim como a presença ou ausência de alterações nos níveis de expressão com respeito aos controles (tecidos de animais clinicamente sadios). Foram consideradas “alteradas” expressões significativamente superiores ou inferiores aos controles pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Conforme pode ser observado na Figura 16, a expressão do gene *TP53* mostrou-se alterada em 68,6% das amostras sendo menos expresso em apenas 2 tumores (5,7%). A expressão de *TP53* apresenta elevada variação em tumores mamários e tem sido correlacionada com o receptor de estrogênio, malignidade, subtipos de câncer (De Witte et al., 1996) e com alelos específicos do gene *TP53* (De Witte et al., 1996; Bladino et al., 1999). Considerada uma proteína chave no controle de apoptose, ciclo celular e outras respostas em nível celular e tissular (Levine & Oren, 2009), o aumento da expressão de *TP53* pode ser considerado indicativo de resposta celular às alterações genéticas e fisiológicas da condição neoplásica (Miller et al., 2005) e um prognóstico reservado quanto a sobrevida do paciente (Miller et al., 2005; Liu et al., 2008). Cabe ressaltar que a resposta celular induzida por p53 é dependente dos níveis de expressão e da forma alélica expressa, já que determinados alelos não inibem a proliferação da célula neoplásica e não induzem a apoptose (Bladino et al., 1999).

Os genes *Bax* e *p21* foram super expressos em 82,9% e 57,1% das amostras neoplásicas, respectivamente. As proteínas Bax e p21 estão associadas à ativação da cascata apoptótica via ligação à membrana mitocondrial e parada do ciclo celular, respectivamente (Maddika et al., 2007). Diversos trabalhos mostram que a transcrição dos

genes *Bax* e *p21* é aumentada quando a proteína p53 funcional é super expressa (Hermann *et al.*, 2001; Chipuk *et al.*, 2004). Por outro lado, avaliação de proteína Bax em tumores mamários humanos demonstra ausência de modificação das concentrações de Bax citosólica (Verheijen *et al.*, 2002). O aumento da expressão de *Bax* e *p21* independente da expressão de *TP53* evidenciada no presente trabalho indica a existência de outros mecanismos de controle transcricional de *Bax* e *p21*.



**Figura 16.** Análise de agrupamentos dos tumores de mama de acordo com o nível de expressão dos genes *TP53*, *Bax*, *P21*, *MDM2*, *Bcl2*, *bFGF* e *IGF-BP3* determinada por qPCR.

LEGENDA: (A) corresponde à expressão alterada ( $p < 0,05$ ) com respeito ao controle e (C) expressão semelhante ao controle. Cor cinza claro representa aumento de expressão e cinza escuro redução da expressão.

O gene *MDM2* apresentou alteração na sua expressão em 65,7% das amostras, estando esta reduzida em 20% das amostras tumorais. A proteína MDM2 interage com a proteína p53 levando à inativação da mesma por ubiquitinação e subsequente degradação

proteossomal (Levine & Oren, 2009). Desta forma, o aumento da expressão de MDM2 leva a incremento da proliferação celular, inibição da apoptose, tolerância a instabilidade genética e resistência à quimioterapia antineoplásica (Moll & Petrenko, 2003; Turbin *et al.*, 2006). Assim como no estudo de O'Neil *et al.* (1998), no presente trabalho não foi constatada relação entre os níveis de expressão de *MDM2* e *TP53*, fato que confirma a complexidade das relações entre estes dois produtos chave da resposta celular.

Para os genes *Bcl2* e *bFGF* foi evidenciada uma tendência de baixa expressão representando 51,4% e 42,86% das amostras de neoplasias mamárias avaliadas, respectivamente. A proteína Bcl2 é considerada anti-apoptótica tendo em geral a sua expressão reduzida em tumores malignos. É interessante observar que assim como ocorreu para o gene *VEGF-A*, não foram detectadas variações significativas na expressão do gene associado à proliferação celular *IGF-BP3* em nenhuma das amostras de neoplasias mamárias analisadas.

Na análise multivariada baseada na expressão de sete genes em estudo nas amostras neoplásica de mama permitiu a separação de dois grupos (Figura 16) e um conjunto de comportamentos independentes. O grupo 1 foi formado por 9 amostras (123, 33, 94, 29, 153, 34, 45, 164 e 160) que apresentaram aumento da expressão de *TP53*, *Bax* e *p21*, e alteração na expressão de *MDM2*. Dentro do grupo 1, as amostras 123, 33, 94 e 29 exibiram ainda redução da expressão de *Bcl2*. Já o grupo 2 foi formado por dez amostras (36, 25, 62, 9, 163, 44, 2, 301, 35 e 46) que apresentaram alteração na expressão de *TP53*, aumento da expressão de *Bax* (com exceção das amostras 163 e 2) e expressão não alterada de *p21*. Além das anteriores, aumento da expressão do gene *TP53* e *p21* foi evidenciado nas amostras 27, 7 e 32 relacionadas aos grupos 1 e 2, mas não agrupadas nos mesmos.

As 11 (31,4%) amostras de neoplasias mamárias restantes não formaram agrupamentos consistentes, mas caracterizaram-se por apresentar expressão de

*TP53* semelhante aos controles, porém com modificações variadas na expressão dos outros genes avaliados.

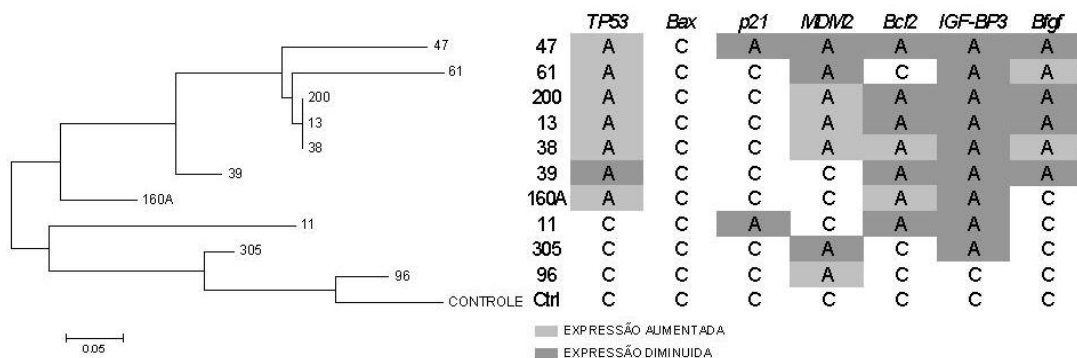
Não foi evidenciada relação entre a ocorrência de mutações nos exons 5, 6 e 7, identificadas por seqüenciamento, e a expressão de *TP53*: 42,8 % dos tumores com aumento de *TP53* apresentaram mutações, e 35,7% dos tumores sem alteração na expressão ou com expressão reduzida de *TP53* exibiram alguma mutação. Fato semelhante foi constatado quando relacionamos a presença de alterações nos perfis de SSCP (perfis alterados em pelo menos dois exons) e aumento da expressão de *TP53*. Por outro lado, diferença significativa na ocorrência de alterações nos perfis de SSCP foi detectada entre os agrupamentos estabelecidos pelo padrão de expressão dos sete genes avaliados. Neste sentido, 77,8% dos tumores que formaram o grupo 1, caracterizado por alteração na expressão de *TP53*, *Bax*, *p21* e *MDM2*, apresentaram perfis de SSCP-*TP53* distintos do controle, fato observado em apenas 36,3% dos tumores que constituíram o grupo 2 e 40% dos tumores que não se enquadraram dentro dos grupos anteriores.

Com respeito à relação entre o grau histológico (I, II e III) e expressão de *TP53*, não foram evidenciadas correlações significativas, o mesmo ocorrendo na comparação do grau histológico com os agrupamentos obtidos com base na análise de expressão dos sete genes em estudo. Este resultado é até certo ponto surpreendente considerando que a proteína p53, assim como *Bax*, *p21* e *Bcl2*, têm sido apontadas como marcadores imunohistoquímicos para determinação de malignidade e prognóstico (Sabah *et al.*, 2007). Neste sentido ainda, cabe ressaltar que a funcionalidade de p53, assim como dos outros genes envolvidos nos processos neoplásicos, depende da forma alélica e processamento pós-traducional (Brosh & Rotter, 2009), fato pelo qual modificação nos níveis de transcrição não implicam obrigatoriamente em alterações no comportamento do tecido neoplásico.



Com relação ao nível de expressão gênica relativa das neoplasias de pele (Figura 17): o gene *TP53* mostrou-se alterado em 70% das amostras sendo menos expresso apenas na amostra 39; o gene *p21* apresentou expressão diminuída em 20% das amostras; *MDM2* teve a sua expressão alterada em 70% das amostras sendo que 30% das amostras com a expressão reduzida; *Bcl2* exibiu expressão alterada em 70% das amostras sendo 50% das amostras com expressões reduzidas. Em relação à expressão gênica, cabe ressaltar que o gene *IGF-BP3*, para o qual não foram constatadas alterações em tumores de mama, apresentou baixa expressão em 90% das amostras neoplásicas de pele, e que o gene *Bax* não apresentou alterações significativas de expressão quando comparado com o controle, enquanto expressão alterada deste gene foi constatada em 82,9% dos tumores de mama.

A análise de agrupamentos das neoplasias de pele baseada na expressão dos genes *TP53*, *Bax*, *p21*, *MDM2*, *Bcl2*, *IGF-BP3* e *bFGF* permitiu a separação de dois grupos (Figura 17). O grupo maior foi formado por sete amostras neoplásicas (47, 61, 200, 13, 38, 39 e 160A) e o grupo II por três amostras tumorais (11, 305 e 96) e o controle.



**Figura 17.** Análise de agrupamentos dos tumores de pele de acordo com o nível de expressão dos genes *TP53*, *Bax*, *p21*, *MDM2*, *Bcl2*, *bFGF* e *IGF-BP3* determinada por qPCR. LEGENDA: (A) corresponde à expressão alterada ( $P < 0,05$ ) com respeito ao controle e (C) expressão semelhante ao controle. Cor cinza claro representa aumento de expressão e cinza escuro redução da expressão.

Avaliando as características, o grupo I foi marcado por aumento da expressão de *TP53*, com exceção da amostra 39, associada com alterações na expressão *IGF-BP3* e elevada frequência de alterações de expressão dos genes *MDM2* e *bFGF*. Já o grupo II caracterizou-se pela ausência de alterações na expressão de *TP53*.

Assim como ocorreu na análise dos tumores mamários, não foi constatada relação entre os níveis de expressão de *TP53* e dos outros genes estudados e o grau histológico dos tumores. Neste estudo foram avaliados os níveis de expressão destes genes, principalmente *TP53* e não a proteína ou sua função. As alterações de expressão de p53 (com ou sem mutação), tanto isolada como combinada com enzimas com potencial modificante, dificilmente irão refletir os níveis naturais e/ou o equilíbrio com proteínas de interação. Para tanto somente a ubiquitinação de p53 realizada por MDM2 foi comprovada *in vivo* (Olsson *et al.*, 2007).

## 5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados experimentais obtidos é possível relatar as seguintes conclusões:

- 1) Os tumores mais freqüentes em cães são as neoplasias mamárias, particularmente carcinomas túbulo-papilares complexos, variando quanto ao grau de malignidade.
- 2) Algumas raças de cães apresentam particular predisposição ao desenvolvimento de câncer. Entretanto, independente da raça constatou-se relação positiva entre ocorrência de câncer e idade dos animais.
- 3) Alta prevalência de alterações nos perfis de SSCP foi constatada nos exons 5, 6 e 7 em tumores caninos.
- 4) A técnica de SSCP representa uma alternativa simples, barata e confiável de avaliação de alterações no gene *TP53*. Entretanto, a sua análise e interpretação é complexa e subjetiva.
- 5) A maior parte das alterações nucleotídicas na região intron 5-exon 7 do gene *TP53* se encontram dentro dos introns (59%) e possivelmente não determinam modificações no processo de maturação do RNA.
- 6) Alterações nucleotídicas nos exons 6 e 7 do gene *TP53* foram constatadas em 42% dos tumores avaliados, sendo que 16% apresentaram mais de uma alteração. A maior parte (97,4%) das alterações encontraram-se em heterozigose.
- 7) Apenas uma alteração em homozigose foi detectada entre as amostras. Esta foi encontrada em um osteossarcoma de mama e correspondeu a uma transição G→A no códon 270 que resulta na substituição de uma arginina por histidina. O códon 270 de cães corresponde ao 282 de humanos, conhecido como *hotspot* situado no domínio de ligação da proteína p53 ao DNA.

- 8) Ampla variação na expressão relativa dos genes *TP53*, *Bax*, *p21*, *MDM2*, *Bcl2*, *IGF-BP3* e *bFGF* foi constatada em tumores mamários e de pele. Entretanto, não foi possível estabelecer relações entre expressão e as alterações no gene *TP53*, ou entre a expressão dos genes estudados.
- 9) Em tumores mamários não foi detectada alteração na expressão do gene *IGF-BP3*, enquanto este gene foi hiper ou hipo expresso em 60% dos tumores de pele. Por outro lado, 82,9% dos tumores mamários apresentaram hiper expressão do gene *Bax*, enquanto não foi observada alteração na expressão deste gene em tumores de pele.
- 10) De um modo geral não foi constatada correlação entre o nível de expressão dos genes *TP53*, *Bax*, *p21*, *MDM2*, *Bcl2*, *IGF-BP3* e *bFGF* e o grau de malignidade dos tumores determinado por análise histopatológica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreassen, A.; Oyjord, T.; Hovig, E.; Holm, R.; Florenes, V.A.; Nesland, J.M.; Myklebost, O.; Hoie, J.; Bruland, O.S.; Borresen, A.L.; Fodstad, O. (1993) *p53* Abnormalities in different subtypes of human sarcomas. **Cancer Res.**53, 468-471.
- Animal Health Survey. (1998) *In* Companion animal news, Morris Animal Foundation. Englewood, CO.
- Arbiser, J.L.; Larsson, H.; Claesson-Welsh, L.; Bai, X.; LaMontagne, K.; Weiss, S.W., Soker, S., Flynn, E., Brown, L.F.(2000) Overexpression of VEGF 121 in immortalized endothelial cells causes conversion to slowly growing angiosarcoma and high level expression of the VEGF receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in vivo. **Am. J. Pathol.** 156, 1469–1476.
- Barzilai, N.; Shuldiner, A. R. (2001) Searching for human longevitygenes: the future history of gerontology in the post-genomicera.**J. Gerontol.**56:83–87.
- Bates, S.; Rrwan, S.; Vousden, K.H. (1996). Characterization of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible. **Oncogene** 13:1103-1109.
- Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Freitas, A.G. (1976) **Manual de técnica para histologia normal e patológica.**Edart/SP: , 239.
- Bikfalvi, A.; Klein, S.; Pintucci, G.; Rifkin, D. B. (1997) Biological roles of fibroblast growth factor-2.**Endocr.Rev.**18:26-45.
- Blundell, R.A. (2006) The Biology of p21<sup>Waf1/Cip1</sup>.**Am. J. Biochem.Biotech.**2:33-40
- Borner C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol. Immunol.** 39:615-47.
- Bostock, D.T. (1986) Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats.**Br. Vet. J.** 142:1-19.

- Brosh, R.; Rotter, V. (2009) When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. **Nat. Rev. Cancer**9:701-713.
- Bunz, F.; Dutriau, A.; Lengauer, C.; Waldman, T.; Zhou, S.; Brown, J. P.; Sedivy, J. M.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. **Science**282:1497-1501.
- Campisi, J. (2003). Cancer and ageing: rival demons? **Nat. Rev. Cancer.** 3:339-349.
- Cébe-Suarez, S.; Zehnder-Fjällman, A.; Ballmer-Hofer, K. (2006) The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. **Cell. Mol. Life Sci.** 63:601–615.
- Chen, C. H.; Poucher, S. M.; Lu, J.; Henry, P. D. (2004) Fibroblast growth factor 2: from laboratory evidence to clinical application. **Curr.Vasc.Pharmacol.**2:33-43.
- Clem, R.J.; Cheng, E.H.; Karp, C.L.; Kirsch, D.G.; Ueno, K.; Takahashi, A.; Kastan, M.B.; Griffin, D.E.; Earnshaw, W.C.; Veluona, M.A.; Hardwick, J.M. (1998) Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. **Proc. Natl. Acad. Sci.**95:554-559.
- Cory, S.; Adams, J.M. (2002) The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat. Rev. Cancer**2: 647-656.
- Del Puerto, H.L.; Martins, A.S.; Moro, L.; Milsted, A.; Alves, F.; Braz, G.F.; Vasconcelos, A.C. (2010) Caspase-3/-8/-9, *Bax* and *Bcl-2* expression in the cerebellum, lymph nodes and leukocytes of dogs naturally infected with canine distemper virus. **Genet. Mol. Res.** 9:151-161.
- Dow, J.K.; deVere White, R.W. (2000) Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. **Urology**55:800-806.
- Else, R.W.; Hannant, D. (1979) Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. **Vet. Record** 104:296-304.

- Egenvall, A.; Bonnet, B.N.; Öhagen, P.; Olson, P.; Hedhammar, A.; von Euler, H. (2005) Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. **Prev. Vet. Med.** 69:109-127.
- Fagin, J.A.; Matsuo, K.; Karmakar, A.; Chen, D.L.; Tang, S.H.; Koeffler, H.P. (1993) High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. **J. Clin. Invest.** 91:179-184.
- Ferrara, N. (1995) The role of vascular endothelial growth factor in pathological pathogenesis. **Breast Cancer Res. Tr.** 36:127-137.
- Festjens, N.; van Gurp, M.; van Loo, G.; Saelens, X.; Vandenabeele, P. (2004) Bcl-2 family members as sentinels of cellular integrity and role of mitochondrial inter membrane space proteins in apoptotic cell death. **Acta. Haematol.** 111:7-27.
- Folkman, J. (1995) Clinical application of research on angiogenesis. **N. Engl. J. Med.** 333:1757-1763.
- Gartel, A.L.; Radhakrishnan, S.K. (2005) Lost in transcription: p21 repression, mechanisms and consequences. **Cancer Res.** 65:3980-3985.
- Gesrschenson, L.E.; Rotello, R.J. (1992) Apoptosis: a different type of cell death. **FASEB J.G.** 2450-2455.
- Hainaut, P.; Soussi, T.; Shomer, B.; Hollstein, M.; Greenblatt, M.; Hovig, E.; Harris, C.; Montesano, R. (1997) Database of p53 gene somatic mutation in human tumors and cell lines; updated compilation and future prospects. **Nucleic Acid Res.** 25:151-157.
- Hartwell, L.H. (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for genomic instability of cancer cells. **Cell** 71: 543-546.
- Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. **Nature.** 407:770-76.
- Hermann, S.; Sturm, I.; Mrozek, A.; Klosterhalfen, B.; Hauptmann, S.; D'Orken, B.; Daniel, P.T. (2001) Bax expression in benign and malignant thyroid tumors: regulation

- of wild-type p53 is associated with a high *Bax* and *p21* expression in thyroid carcinoma. **Int. J. Cancer**92:805–811.
- Hewitt, H.B. (1978) The choice of animal tumors for experimental studies of cancer therapy. **Adv. Cancer Res.** 27: 149-200.
- Hirama, T.; Koeffler, P. (1995) Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. **Blood** 86: 841-854.
- Hjortsberg, L.; Rubio-Nevado, J.M.; Hamroun, D.; Claustre, M.; Bérout, C.; Soussi, T. (2008) The p53 Mutation HandBook **Disponível (online)** - [http://p53.free.fr/Database/p53\\_database.html](http://p53.free.fr/Database/p53_database.html) (10 de agosto).
- Johnson, A.S.; Couto, C.G.; Weghorst, C.M. (1998) Mutation of the p53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. **Carcinogenesis** 1:213–217.
- Levine, A.; Momand, J.; Finlay, C. (1991) The p53 tumour suppressor gene. **Nature** 351: 453-456.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell.** 88:323–331
- Levine, A.J.; Oren, M. (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nat. Rev. Cancer.** 9:749-757.
- Lewin, B. (2001) **Genes VII.** Artmed Editora Ltda. Porto Alegre, 955.
- Liekens, S.; De Clercq, E.; Neyts, J. (2001) Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochem.Pharmacol.**61:253-270.
- Livak, K.J. & Schmitgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods** 4:402-408.
- Maddika, S.; Ande, S.R.; Panigrahi, S.; Paranjothy, T.; Weglarczyk, K.; Zuse, A.; Eshraghi, M.; Manda, K.D.; Wiechec, E.; Los, M. (2007) Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. **Drug Resist. Update**10:13-29.



- Meek, D.W. (2009) Tumor suppression by p53: a role for the DNA damage response. **Nat. Rev.Cancer.** 9: 714-723.
- Miller,C.W.; Aslo,A.; Won,A.; Tan, M.; Lampkin,B.; Koeffler,H.P.(1996) Alterations of the *p53*, *Rb*, and *MDM2* genes in osteosarcoma.**J. Cancer Res. Clin. Onc.**122:559–565.
- Morrison W.B. (2002) **Cancer in Dogs and Cats. Medical and Surgical Management** (ed 2). Jackson, WY, Teton NewMedia.
- Mouriquand, J.; Pasquier, D. (1980) Fine needle aspiration of breast carcinoma: a preliminary cytoprognostic study. **Acta Cytol.**24:153-9.
- Muto, T.; Wakui, S.; Takahashi, H.; Maekawa, S.; Masaoka, T.; Ushigome, S.; Furusato, M. (2000) p53 Gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog.**Vet.Pathol.** 37:248–253.
- Nasmyth, K. (1996) Viewpoint: putting the cell cycle in order. **Science** 274: 1643-1645.
- Oda, E.; Ohki, R.; Murasawa, H.; Nemoto, J.; Shibue, T.; Yamashita, T.; Tokino, T.; Taniguchi, T.; Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis.**Science**288:1053–1058.
- Olsson, A.; Manzi, C.; Strasser, A.; Villunger, A. (2007) How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? **Cell Death Differ.**14:1561–1575
- Okada, H.; Mak, T.W. (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat. Rev. Cancer** 4:592-603.
- Oltvai, Z.N.; Milliman, C.L.; Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**74: 609-619.
- Pardee, A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. **Science** 246: 603-608.

- Pinheiro, N.A.; Moura, R.P.; Monteiro, E.; Villa, L.L. (1999) Detection of point mutations by non-isotopic single strand conformation polymorphism. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 32: 55-58.
- Polager, S; Ginsberg, D. (2009) p53 and E2f: partners in life and death. **Nat. Rev. Cancer** 9: 738-748.
- Przybylski, M. (2009) A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis. **J. Wound Care** 18:516-519.
- Renehan, A.G.; Zwahlen, M.; Minder, C.; O'Dwyer, S.T.; Shalet, S.M.; Egger, M. (2004) Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. **The Lancet.** 363: 1346-1353.
- Rothwell, T.L.W.; Howlett, C.R.; Middleton, D.J; Griffiths, D.A.; Duff, B.C. (1987) Skin neoplasms of dogs in Sydney. **Aust. Vet. J.** 64:161-164.
- Sabah, M.; Cummins, R.; Leader, M.; Kay, E. (2007) Immunoreactivity of p53, Mdm2, p21 (WAF1/CIP1) Bcl-2, and Bax in soft tissue sarcomas: correlation with histologic grade. **Appl. Immunohisto. M. M.** 15:64-9
- Sanguinetti, C.L.; Dias Neto, E.; Simpson, A.J.G. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques.** 17:915-921.
- Sherr, C.J (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinase. **Gene Dev.**9: 1149-1163.
- Sherr, C.J. (2000) The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Res.**60: 3689-3695.
- Shimizu, S.; Eguchi, Y.; Kamiike, W.; Funahashi Y.; Mignon, A.; Lacronique, V.; Matsuda, H.; Tsujimoto, Y. (1998) Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95: 1455-1459.

- Smith-Sorensen, B.; Gebhardt, M.C.; Kloen, P.; McIntyre, J.; Aguilar, F.; Cerutti, P.; Borresen, A.L. (1993) Screening for *TP53* mutations in osteosarcomas using constant denaturant gel electrophoresis (CDGE). **Human Mut.** 2: 274–285.
- Sutter, N.B.; Eberle, M.A.; Parker, H.G.; Pullar, B.J.; Kirkness, E.F.; Kruglyak, L.; Ostrander, E.A. (2004) Extensive and breed-specific linkage disequilibrium in *Canis familiaris*. **Genome Res** 14: 2388–2396.
- Tamburini, B.A.; Trapp, S.; Phang, T.L.; Schappa, J.T.; Hunter, L.; Modiano, J.F. (2009) Gene expression profiles of sporadic canine hemangiosarcoma are uniquely associated with breed. **PLoS ONE** 4:5549.
- Vail, D.M.; Withrow, S.J.; Schwarz, P.D.; Powers, B.E. (1990) Perianal adenocarcinoma in the canine male: a retrospective study of 41 cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** 26:329-334.
- Van Cruchten, S.; Van Den Broeck, W. (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat. Histol. Embryol.** 31: 214-23.
- Van Der Auwera, I.; Van den Eynden, G.G.; Colpaert, C.G.; Van Laere, S.J.; Van Dam, P.; Van Marck, E.A.; Dirix, L.Y.; Vermeulen, P.B. (2005) Tumour lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: a histomorphometric study. **Clin. Cancer Res.** 11: 7637-7642.
- Veldhoen, N.; Metcalfe, S.; Milner, J. (1999) A novel exon within the *mdm2* gene modulates translation initiation in vitro and disrupts the p53-binding domain of *mdm2* protein. **Oncogene** 18:7026 – 7033.
- Verheijen, F.M.; Donker, G.H.; Viera, C.S.; Sprong, M.; Jacobs, H.M.; Blaauw, G.; Thijssen, J.H.H.; Blankenstein, M.A. (2002) Progesterone receptor, Bcl-2 and Bax expression in meningiomas. **J. Neurooncol.** 56:35-41

- Wakui, S.; Muto, T.; Yokoo, K.; Takahashi, H.; Masoka, T.; Hano, H.; Furusato, M. (2001) Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. **Anticancer Res.**, 21:611-666.
- Withrow S.J.; Macewen E.G. (2001) **Small animal clinical oncology**. 3ª Edição WB Saunders and Co.
- World Health Organization(2009)Fact sheet N°297, **Disponível (online)** <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> (10 de agosto).
- Wunder, J.S.; Gokgoz, N.; Parkes, R.; Bull, S.B; Eskandarian, S.; Davis,A.M.; Beauchamp, C.P.; Conrad,E.U.; Grimer,R.J.; Healey, J.H.; Malkin,D.; Mangham,D.C.; Rock,M.J.; Bell,R.S.; AndruliS, I.L. (2005)TP53 mutations and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. **J. Clin. Oncol.**23:1483-1490.
- Yonemaru, K.; Sakai, H.; Murakami, M.; Kodama, A.; Mori, T.; Yanai, T.; Maruo, K.; Masegi, T. (2007)The significance of p53 and retinoblastoma pathways in canine hemangiosarcoma. **J. Vet. Med. Sci.** 69:271-278.
- Zhang, W.; Grasso, L.; McClain, C.D.; Gambel, A.M.; Cha, Y.; Travali, S.; Deisseroth, A.B.; Mercer, W.E. (1995) p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. **Cancer Res.** 55: 668-674.
- Ziegler, U.; Groscurth P. (2004) Morphological features of cell death.**News Physiol. Sci.**19:124-28.