BUSCA DE POLIMORFISMOS NO GENE BRCA1 EM AMOSTRAS DE TUMORES MAMÁRIOS EM CÃES POR MEIO DA TÉCNICA DE RFLP

Izabela Gonçalves Ramirez Gomes[1]; Angélica Madurera Lagos[2]; Bruno Meneguim Artacho[3]; Débora Ferreira Tomaz[4]; Rafael Ricardo Huppes[5]; Stefania Caroline Claudino da Silva[6]

[1]Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/UniCesumar. izah_gomes15@hotmail.com
[2]Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/UniCesumar. angelicamlagos@gmail.com
[3]Biomédico autônomo. bruno.artacho@hotmail.com
[4]Medico Veterinário Residente do Hospital Veterinário, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. tomazdeb@hotmail.com
[5]Medico Veterinário do Hospital Veterinário, Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR. rafaelhuppes@hotmail.com,
[6]Orientadora, Doutora, Departamento de Mestrado em Ciência, Tecnologia e Segurança Alimentar, UNICESUMAR. Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. Stefania.silva@unicesumar

RESUMO

Neoplasias de glândulas mamárias são responsáveis por aproximadamente 50% dos tumores que acometem os cães, sendo essa a espécie doméstica que apresenta a maior incidência de tumores de mama. A oncogênese das neoplasias mamárias é um processo ligado a mais de uma alteração molecular (TERRA, 2014), como falhas em sistemas de reparo de DNA e proliferação celular desordenada, sendo o potencial proliferativo ilimitado uma característica das neoplasias malignas (MCGAVIN & ZACHARY, 2013; ROSENTHAL, 2004). A associação entre mutações nos genes BRCA e predisposição ao câncer em humanos está bem descrita na literatura, entretanto em cães as informações de polimorfismos ainda são escassas. O reconhecimento das neoplasias mamárias como uma doença de etiologia genética, bem como o estudo dos mecanismos de iniciação e desenvolvimento tumoral associada a técnicas da biologia molecular possibilita a identificação de novos marcadores tumorais contribuindo para a capacidade de detectar o câncer em uma etapa mais precoce inferindo positivamente no prognóstico e sobrevida do animal (TEIXEIRA, 2007). Este estudo visou pesquisar polimorfismos genéticos por meio de técnica de RFLP, com endonuclease MscI para o éxon 9 do cromossomo 9 em amostras de tecido tumoral e saudável de cães submetidos a mastectomia. O primer desenhado bem como a enzima apresentou bom padrão de amplificação para as amostras, entretanto não houve diferença no padrão de digestão entre os animais avaliados.

PALAVRAS-CHAVE: biologia molecular; oncogênese; tumor de mama.

1 INTRODUÇÃO

Neoplasias de glândulas mamárias são responsáveis por aproximadamente a metade dos tumores que acometem os cães, sendo essa a espécie doméstica que apresenta a maior incidência de tumor mamário. As neoplasias mamárias são mais observadas em pacientes idosos, vários estudos demonstram que o risco começa a ser significante por volta dos oito anos de idade e aumenta linearmente. Outros fatores como alimentação, utilização de acetato de medroxiprogesterona como anticoncepcional e a genética podem interferir na susceptibilidade do animal em desenvolver tumores em mama (FONSECA & DALECK, 2000; NELSON & COUTO, 2001; SONREMO et al., 2011; MCGAVIN & ZACHARY, 2013; YAMAGAMI et al., 1996).

Os tumores mamários podem ocorrer em qualquer região da cadeia mamária, sendo as glândulas mamárias abdominais caudais e inguinais as mais afetadas e em mais 50% dos casos mais de uma glândula é acometida (Figura 1).

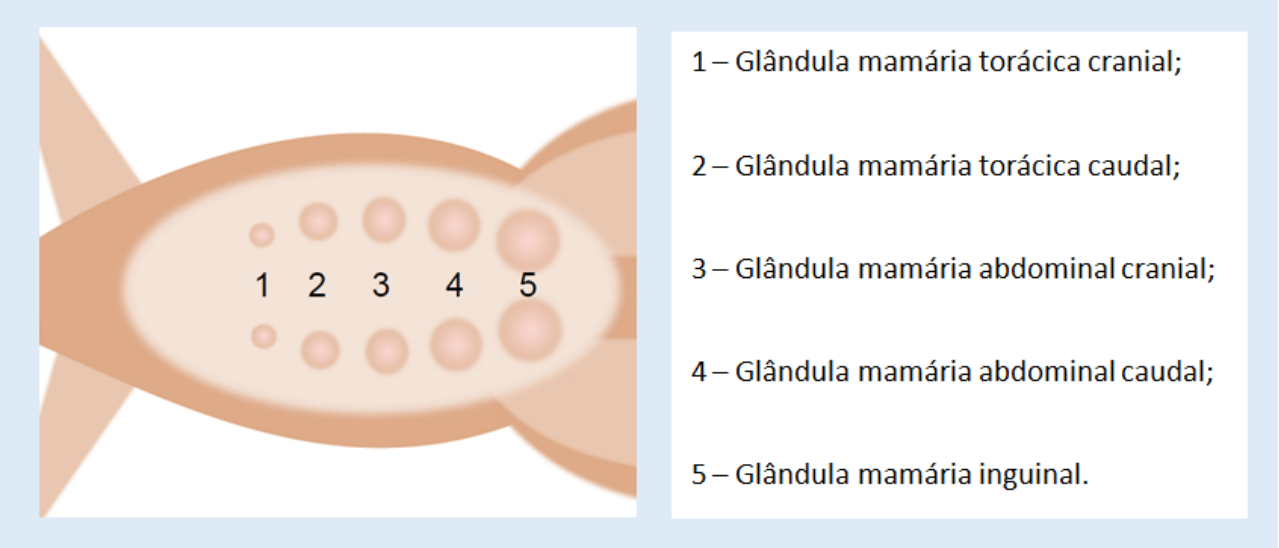

Figura 1: Nomenclatura utilizada para identificar as glândulas mamárias em cadelas.
Fonte: https://www.google.com.br/

A oncogênese das neoplasias mamárias é um processo ligado a mais de uma alteração molecular (TERRA, 2014).O mecanismo de divisão celular pode desencadear mutações genéticas que são controladas através de sistemas de reparos de DNA, no entanto, em algumas situações, esses genes deixam de desempenhar sua função no controle da proliferação celular, o que pode resultar no desenvolvimento desordenado de células cancerígenas (TEIXEIRA, 2007), sendo o potencial proliferativo ilimitado uma característica das neoplasias malignas (MCGAVIN & ZACHARY, 2013; ROSENTHAL, 2004).

Mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2 são as causas hereditárias conhecidas mais frequentes de câncer de mama familiar, sendo, em humanos, associado à cerca de 15% destes. A associação entre mutações nos genes BRCA e predisposição ao câncer em humanos está bem descrita na literatura, entretanto em cães as informações de polimorfismos ainda são escassas.

Alguns estudos têm demonstrado por meio de sequenciamento que existe variação genética para o BRCA1 em cães (SUN et al., 2015), entretanto estudos que validem estes polimorfismos em populações se fazem necessários. Uma maneira eficiente e relativamente barata de validação de polimorfismos genéticos em populações grandes é a técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism). Esta técnica utiliza enzimas endonucleases capazes de clivar o DNA em locais com sequências específicas. Quando sequências de DNA apresentam polimorfismos, as endonucleases mudam o padrão de corte possibilitando a visualização em gel da genotipagem de animais positivos para mutação como visualizado na Figura 1.

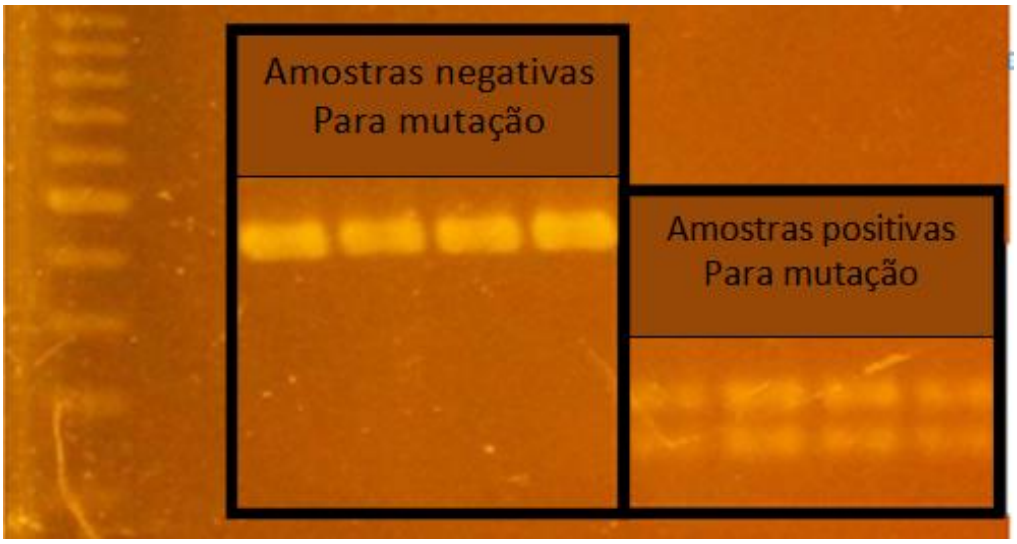

Figura 2. Exemplo de visualização em gel para técnica de PCR-RFLP. A soma do tamanho dos fragmentos positivos para a mutação apresenta exatamente o mesmo tamanho dos fragmentos negativos para a mutação.

O reconhecimento das neoplasias mamárias como uma doença de etiologia genética, bem como o estudo dos mecanismos de iniciação e desenvolvimento tumoral associada a técnicas da biologia molecular possibilita a identificação de novos marcadores tumorais contribuindo para a capacidade de detectar o câncer em uma etapa mais precoce inferindo positivamente no prognóstico e sobrevida do animal (TEIXEIRA, 2007). Deste modo objetivamos com esta pesquisa realizar busca de polimorfismos genéticos em tecido mamário (tumoral e saudável) em cadelas por meio da técnica de PCR – RFLP.

As neoplasias mamárias em cadelas representam um grande percentual da rotina clínica e cirúrgica oncológica de pequenos animais, especialmente na espécie canina. O desenvolvimento de tumores em mama está associado a diversos fatores, tais como a utilização de hormônios sintéticos e características genéticas. Inúmeros mecanismos moleculares podem estar associados ao desenvolvimento e proliferação de células cancerígenas e mais estudos precisam ser realizados nesse sentido na medicina veterinária visando identificar e esclarecer os genes associados. Em razão disso, essa pesquisa visa contribuir através de análises moleculares em busca de polimorfismos no gene BRCA1 que pode estar associado à oncogênese de neoplasias mamárias em cadelas.

O objetivo geral deste estudo é identificar a presença de polimorfismo no gene BRCA1 em amostras de tecido neoplásico em glândula mamária de cadelas submetidas à mastectomia associado a oncogênese de tumores de mama nessa espécie por meio da técnica e PCR-RFLP. As amostras coletadas são de tecido mamário saudável e tecido neoplásico de cadelas submetidas ao procedimento cirúrgico de mastectomia no hospital veterinário da instituição Unicesumar.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de DNA genômico de 19 animais sendo que cada animal foi coletada amostra de tecido saudável e tumoral. A amostras foram obtidas por meio de material de descarte de animais submetidos à mastectomia no Hospital Veterinário da UniCesumar, na cidade de Maringá-PR.

As amostras foram coletadas em tubo de 1000ul e mantidas a -20ºC até o momento da extração. A extração do DNA foi realizada conforme protocolo de extração alcalina, descrita por Silva et al. 2012: Foram adicionados para cada amostra, 35µL de NaOH (Hidróxido de sódio 0,2 M). Após a adição do NaOH, as amostras foram incubadas em banho maria a 74ºC por 20 minutos, com homogeneização a cada 5 minutos. Após esta etapa e com as amostras em temperatura ambiente, acrescentou-se à cada amostra, 70µL do tampão Tris HCl (pH= 8,0).Foi desenhado um par de primer, com tamanho final de fragmento de 449pb, conforme tabela 1:

Primer	**Sequência (5' → 3')**	**Length**	**Tm**	**GC%**
Forward	TAGGCAGATTCCCAGCACAG	20	59	55
Reverse	CTTCAGTTGTGTGGCTCACC	20	59	55

Tabela 1 – Desenho do *primer* utilizado e características de amplificação.

A amplificação dos fragmentos foi conduzida em Termociclador Applied Bossystens Veriti® (Applied Biossystens, EUA), utilizando volume final de 15µl, com concentrações de: 0,6 µL do*primer*, 0,5 µL de cada dNTP, 1,5 µL de $MgCl_2$, 1,5 µL de buffer, 0,1 µL de Taq DNA Polimerase e 0,8µL de DNA genômico. A definição do programa de amplificação dos primers foi realizada através de testes de eficiência. O programa final de amplificação foi conduzido da seguinte forma: inicialmente o DNA foi desnaturado a 94 ºC por cinco minutos e em seguida, realizaram-se 35 ciclos cada um consistindo de: 45 segundos de desnaturação a 94 ºC, 45 segundos de anelamento a 64 ºC e 45 segundos de extensão a 72 ºC, e extensão final a 72 ºC por 7 minutos.

A escolha das enzimas de restrição foi feita por meio do *software* Restriction Mapper (http://www.restrictionmapper.org/). Para a digestão dos amplicons obtidos foi utilizada a endonuclease MscI (New England Biolabs), com corte na posição TGG↓CCA. De acordo com a digestão virtual para sequência analisada eram esperados dois fragmentos, de acordo com a figura 1.

FRAGMENTO 1 (308 pb)

TAGGCAGATTCCCAGCACAGAGAAAAAGGTAGTTGTGAATGCTGATCTCCTGTGTGGGAGAAAAGAACTGAATA
AACAGAAACCTCCACACTCTGATAGTCCTAGAGATTCCCAAGATGTTCCTTGGATAACACTGAATAGTAGCATAC
GGAAAGTTAATGAGTGGTTTTCCAGAAGTGACGAAATATTAACTTCTGATGATTCACATGACAGAGGATCTGAAT
TGAATACTGAAGTAGGTGGTGCAGTAGAAGTTCCAAATGAAGTGGGTGAATATTCT GGTTCTTCTG
AGAAAATAGACTTAATGG

FRAGMENTO 2 (141 pb)

CCAGTGATCCTCAGGATGCTTTCATATGTGAAAGTGAAAGAGTCCACACCAAGCCAGTAGGAGGTAATATCGAA
GATAAAATATTTGGAAAAACCTATCGGAGGAAGGCAAGCCTCCCTAAGGTGAGCCACACAACTGAAG

Figura 1. Fragmentos esperados após amplificação e digestão com MscI.

A reação de digestão foi realizada de acordo com a especificação da enzima. Constituindo-se basicamente de uma reação de digestão dos produtos de PCR preparada com CutSmart® Buffer 1X, aproximadamente 1 µg de DNA total amplificado e uma unidade da enzima de restrição, com volume final da reação de 50µL. A digestão também

foi executada em Termociclador Applied Bossystens Veriti® (Applied Biossystens, EUA) por uma hora a 37°C.

As amostras digeridas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%, conduzida em tampão TBE 0,5 x (45 mM de TrisBorato e 2 mM de EDTA) com 100 V e 250 mA por 90 minutos. Os géis foram corados com brometo de etídio por 20 minutos e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nossa pesquisa a região cromossômica analisada foi o éxon 9 do cromossomo 9, com início a posição 19985163 e termino na posição 19985861 (699pb). Esta região apresenta grande homologia com *Canis simensis* (LINDBLAD-TOH et al., 2005).

A digestão dos amplicons apresentou o mesmo padrão de bandas esperado, para os dois grupos avaliados (amostra tumoral e tecido saudável). A figura 2, mostra o resultado de uma das baterias de análise em que foi utilizado amostra saudável e tumoral não digerida e amostra saudável e tumoral digeridas.

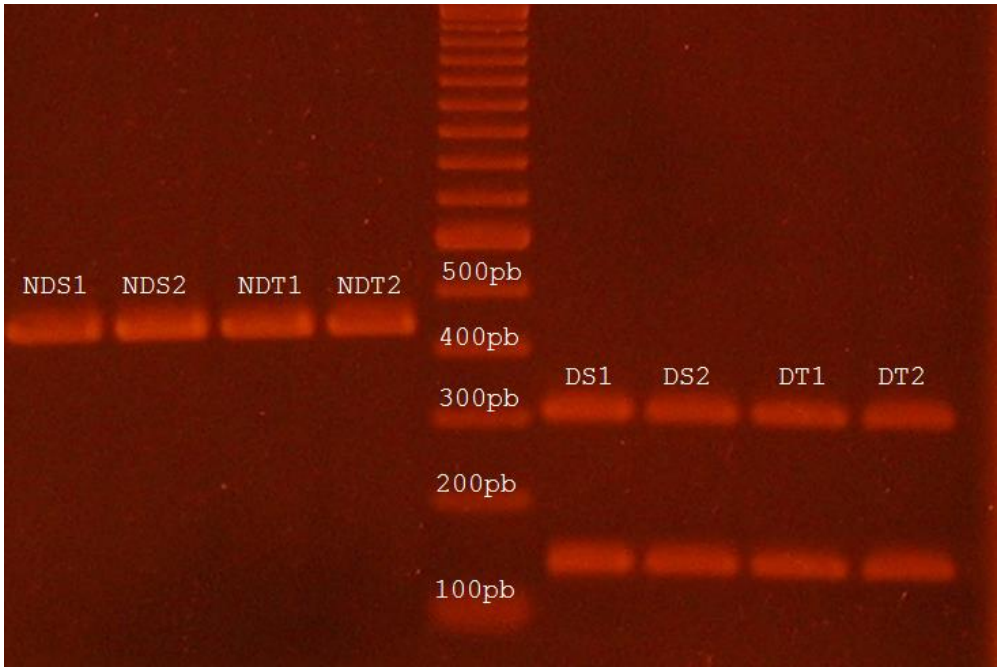

Figura 2: Gel de agarose corado com brometo de etídio. Padrão de DNA de 100pb. Canaletas à esquerda: amostras amplificadas, porém não digeridas para tecido saudável (NDS) e tumoral (NDT). Canaletas à direita: amostras amplificadas e digeridas com endonuclase para tecido saudável (DS) e tumoral (DT).

Não houve diferença de amplificação entre os grupos “tecido saudável” e “Tecido tumoral”.

Apesar de não encontrarmos polimorfismos com a estratégia proposta, o presente trabalho não elimina a possibilidade de existência de polimorfismos em outro loco deste gene, ou ainda com outras enzimas de restrição. Novos estudos são necessários para uma investigação mais aprofundada do gene BRCA1, uma vez que este gene pode influenciar o surgimento de tumores carcinogênicos em cães.

Rivera et al. (2009) fizeram um estudo de associação de 10 genes candidatos com a presença de tumores mamários e indicaram que os haplótipos em BRCA1 e BRCA2 estão realmente envolvidos no desenvolvimento de tumores mamários caninos, e são excelentes candidatos para estudos de associação.

Semelhante ao executado em nossa pesquisa, Hsu et al. (2010) realizaram análise de polimorfismos genéticos no éxon 11 do gene BRCA2 canino em tecido mamário

saudável e tumoral. Por meio de sequenciamento, estes autores evidenciaram a presença de 19 polimorfismos pontuais quando comparado com a glândula mamária normal, e destes 32% foram classificadas como mutações silenciosas e 68% como mutações *missense*, ou seja, com a codificação de um aminoácido diferente do normal.

Uma mutação na região promotora do gene BRCA1 foi relatada por Qiu et al. (2015). Estes autores evidenciaram que a expressão gênica de BRCA1 é reduzida em tecidos tumorais. Qiu & Lin (2016) encontraram duas mutações pontuais na região codificadora do BRCA1 em uma amostra de tumor mamário maligno canino nas posições 3619 (A→G; substituição do resíduo de treonina por alanina) e 4006 (G→A; substituição do resíduo de valina por isoleucina). Além destas mutações *missenses* este autores encontraram ainda a metilação de ilhas CpG em uma amostra de tumor mamário maligno, fator conhecido por promover o silenciamento gênico.

Em 2015, Sun e colaboradores realizaram o sequenciamento direto das sequências flanqueadoras das regiões 5' e 3' UTRs de BRCA1 e elencaram novos polimorfismos de nucleotídeo único nas posições 1228 (T→C) e 1173 (C→T), além de um polimorfismo no éxon 23 na posição 63449 (G→A). Estes autores associaram o polimorfismo 1173 (C→T) a um risco de 2,57 para o desenvolvimento de tumor mamário quando comparado a indivíduos com a variante nativa.

4 CONCLUSÃO

Tendo como base os parâmetros estabelecidos para a realização deste trabalho, não foram encontrados polimorfismos no gene BRCA1 nos animais avaliados.

REFERÊNCIAS

BAU, D.T; MAU, Y.C; SHEN, C.Y. The role of BRCA1 in non-homologous end-joining. Journal Cancer Letters; v. 240, ed.1, p.1-8, ago/set. 2006.

ESCOBAR, K.A. **Determinação de mutações e polimorfismos nos genes BRCA1 e BRCA2 em pacientes com câncer de mama com indicação para teste genético.** USP, São Paulo, 2011.

FONSECA, C. S; DALECK, C. R. **Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovário-histerectomia como terapia adjuvante.** Cienc. Rural; v. 30, n.4, p. 731-735. Santa Maria, 2000.

FORD, D. et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast câncer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. American Journal of Human Genetics; v.62, p.676-689, march 1998.

HORWITZ, A.A. et al. **A mechanism for transcriptional repression dependent on the BRCA1 E3 ubiquitin ligase.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA ; v.104, ed.16, p.6614-6619, 2007.

HSU, W.L; HUANG, Y.H; CHANG, T.J; WONG, M.L; CHANG, S.C. Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. The Veterinary Journal; v.184, p.351– 356, June 2010.

JOHANNSSON, O. et al. Incidence of malignant tumours in relatives of BRCA1 and BRCA2 germline mutation carries. European Journal of Cancer. v.35, ed.8, p.1248-1257, August 1999.

LINDBLAD-TOH, K; WADE, M.C; LANDER, S.E. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 803, 2005.

MACLEOD K. **Tumor Supressor Genes.** Curr Opin Genet Dev. v.10, p. 81-93, fev 2000.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. ed.2 . Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

MEUTEN, D.J. Tumors in domestic animals. ed. 4., p. 788. Lowa State Press: University California. Canadian Veterinary Journal. p.788, 2002.

MOULTON, J.E. (Ed.). **Tumors in domestic animals.** ed.3. Berkeley: Univ. California, p.672, 1990.

NAROD, S.A, FOULKES, W.D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. **Nature reviews Cancer**. V.4, n.9, p.665–676, September 2004.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais.** 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2001.

NIELL, B.L. et al. BRCA1 and BRCA2 founder mutation sand the risk of colorectal cancer. Journal of the Nation Cancer Institute,v.96, ed.1, p. 15-21, January 2004.

QIU, H; LIN, D. Roles of DNA mutation in the coding region and DNA methylation in the 5′ flanking region of BRCA1 in canine mammary tumors. Journal of Veterinary Medical Science, China Agricultural University, v. 78, ed. 6, p. 943-949, February 2016.

QIU, H. B., et al. Promoter mutation and reduced expression of BRCA1 in canine mammary tumors. Research in veterinary science, v. 103, p.143-148, oct 2015

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

RIVERA, P. et al. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. Cancer Research; v. 69, p.8770– 8774, nov 2009.

ROSENTHAL, Robert C. **Segredos em oncologia veterinária.** Porto Alegre: Artmed, 2004.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. **Small animal clinical oncology.** ed. 2, Sanders, p.455-477, Philadelphia 2001.

SIMARD, J. et al. Common origens of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. **Nature Genetics**; v. 8, p. 392-398, Dec 1994.

SORENMO, K. U. et al. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. Vet Pathol. V. 48, n. 1, p. 85-97, Jan 2011.

STRATTON MR, RAHMAN N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. **Nature genetics.** V. 40, n.1, p. 17–22, Jan 2008.

SUN, W. et al. Relationship between three novel SNPs of BRCA1 and canine mammary tumors. Journal of Veterinary Medical Science, v. 77, ed.11, p. 1541-1543, Nov 2015.

TEIXEIRA, M. J. C. D. S. *Mutação e super expressão de p53 em neoplasias mamárias de cadelas.* Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária. Pernambuco, p. 86, 2007.

TERRA, E. M. *Neoplasias mamárias de cadelas: expressão gênica e proteica da via WNT/B-catenina, sua associação com a transição epitélio-mesênquima e prognóstico.* Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo, p.105. 2014.

YAMAGAMI, T. et al. Influency of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumors. J. Small Animal Pract. v. 37, ed.10, p. 462-464. Oct 1996.