

**YARA DE OLIVEIRA BRANDÃO**

**PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE *ESR1* EM TUMORES DE MAMA CANINOS  
(*Canis familiaris*)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Giseli Klassen

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edneia A. S. R. Cavalieri

**CURITIBA**

**2017**

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Brandão, Yara de Oliveira  
Perfil de metilação do gene ESR1 em tumores de mama caninos  
(*Canis familiaris*). / Yara de Oliveira Brandão. – Curitiba, 2017.  
59 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Profa Drª Giseli Klassen  
Co-orientadora: Profa Drª Edneia A. S. R. Cavalieri

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,  
Parasitologia e Patologia.

1. Tumores em animais. 2. Metilação de DNA. 3. Epigenética. I.  
Título. II. Klassen, Giseli. III. Cavalieri, Edneia Amancio de Souza  
Ramos. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,  
Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 636.0898994



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## TERMO DE APROVAÇÃO

**“Perfil de metilação do gene *ESR1* em tumores de mama caninos”**

por

**Yara de Oliveira Brandão**

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

  
Profa. Dra. Giseli Klassen – Presidente

  
Profa. Dra. Thais Andrade Costa Casagrande

  
Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

**Curitiba, 29 de março de 2017.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família, minha mãe Sônia e meus pais Narciso e Adilson por serem meus exemplos de dedicação, por sempre me incentivarem, apoiarem minhas decisões e acreditarem em mim quando eu mesma não acreditava. Esta jornada não começou há dois anos, mas sim muito antes e vocês estavam lá desde o início. Este trabalho é tão meu quanto seus, obrigada! Quero agradecer à minha irmã Karina, minha bióloga preferida e minha inspiração na ciência e ao meu irmão Bruno.

Tão igual agradeço ao meu namorado, marido, amigo, ouvinte, parceiro e patrocinador Daniel. Obrigada por escutar meus ensaios de seminários, minhas lamentações, por ir dormir sozinho enquanto eu lia um artigo ou terminava um trabalho até tarde, por cozinhar pra mim enquanto eu estava ocupada escrevendo, ou lendo, ou estudando. Ou seja, obrigada por aceitar este desafio junto comigo e me apoiar a todo momento. Parabéns pelo nosso trabalho. Te amo.

À minha orientadora Giseli Klassen, quem abriu as portas do seu laboratório para mim, uma estranha até então, me fez sentir em casa e aceitou comigo se embrenhar numa área de pesquisa diferente. Obrigada pela confiança.

À minha co-orientadora Edneia A. S. R. Cavalieri pelos ensinamentos e ajuda nos experimentos.

Às minhas colegas de laboratório e amigas para a vida, Andressa e Mariana. Sem vocês o caminho teria sido muito mais difícil e bem menos divertido. Obrigada pelos géis, minipreps, PCRs, dicas, esclarecimentos, palavras de incentivo, bombons e bolos. Sou grata também às minhas colegas de laboratório Liliane e Graciele que embora o convívio tenha sido menor estavam sempre à disposição para me ensinar e ajudar.

Ao Thierry, Claudia, Luciana, Regiane, professor Renato S. de Sousa, professora Rosângela L. Dittrich, professora Lúcia de Noronha, seja por ajudarem na coleta de amostra, por emprestar equipamento ou apenas pela amizade e apoio.

Especialmente ao Departamento de Bioquímica, representado pelos professores Emanuel M. de Souza e Fábio Pedrosa, por disponibilizarem equipamentos e ao Valter por estar sempre disposto a ajudar e a correr sequenciamentos pra gente. Sem vocês seria impossível este trabalho.

À Universidade Federal do Paraná, representada pelo programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do qual tive a honra de fazer parte e à CAPES que financiou minha bolsa de mestrado.

## RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente em cadelas não castradas e dentre os fatores envolvidos em sua patogênese está a exposição ao estrógeno e a ação de seu receptor. O receptor de estrógeno- $\alpha$  (RE $\alpha$ ) é uma proteína, codificada pelo gene *ESR1*, amplamente utilizada como marcador molecular de prognóstico para o câncer de mama em mulher, porém na cadela ainda é pouco utilizado. Um dos mecanismos envolvidos na regulação do gene *ESR1* em neoplasias mamárias em mulheres é a metilação do DNA, um evento epigenético onde há a adição de um grupamento metil em citosinas ao lado de guaninas. Nos últimos anos vem aumentando o número de trabalhos investigando a expressão da proteína RE $\alpha$  em cadelas, entretanto, ainda são poucos os estudos buscando entender os mecanismos moleculares de regulação do gene *ESR1* nestes animais. Neste trabalho, foi avaliada a expressão do gene *ESR1* e da proteína em amostras de mama normal, tumores mamários benignos e malignos, bem como verificada a influência da metilação na regulação da expressão deste gene. Neste estudo foram utilizadas quatro amostras de mama normal, oito tumores benignos e nove malignos. Observou-se uma menor expressão do gene *ESR1* ( $p < 0,05$ ) e da proteína RE $\alpha$  ( $p=0,0037$ ) nos tumores malignos em relação às mamas normais e aos tumores benignos. Embora a correlação encontrada entre mRNA e proteína seja forte e positiva ( $\rho=0,72$  e  $p < 0,05$ ), três das seis amostras RE $\alpha$  negativas (escore zero) apresentaram níveis de mRNA semelhantes aos das amostras RE $\alpha$  positivas classificadas como escore 2 na imunohistoquímica. Os resultados do sequenciamento evidenciaram um baixo percentual de metilação, sendo observados 2,5% no grupo de mamas normais, 1,9% no grupo receptor de estrógeno positivo e 2,6% no grupo receptor de estrógeno negativo, não havendo diferença estatística entre os grupos ( $p>0,05$ ). Como não foi evidenciada diferença significativa na metilação entre os três grupos é possível inferir que no câncer de mama canino o gene *ESR1* provavelmente não é silenciado por metilação, entretanto estudos com maior número amostral são necessários.

Palavras chave: câncer de mama canino, receptor de estrógeno  $\alpha$ , *ESR1*, metilação do DNA, epigenética

## ABSTRACT

The mammary cancer is the most prevalent cancer type in no spayed bitches. Exposure to estrogen and its receptor action is a factor involved in mammary carcinogenesis. The estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) is a protein encoded by the gene *ESR1* widely used as prognostic biomarker in women breast cancer but poorly used in canine mammary tumor. The DNA methylation is a regulatory mechanism of the gene *ESR1* in women breast cancer. It is an epigenetic event where the methyl group is added to a cytosine next to a guanine. In the past few years it has been increasing the number of studies about the ER $\alpha$  expression in bitches, however it still few researches investigating the molecular mechanisms of the *ESR1* gene regulation in these animals. The goal of this study was to evaluate the protein and mRNA expression of the *ESR1* gene in samples of normal mammary gland, benign and malignant tumors and identify the role of DNA methylation in this gene regulation. It was used samples of four normal mammary gland, eight benign tumors and nine malignant tumors. It was observed a significant lower expression of ER $\alpha$  mRNA ( $p < 0.05$ ) and protein ( $p = 0.0037$ ) in malignant tumors when compared to normal mammary glands and to benign tumors. Although the correlation between mRNA and protein levels was strong and positive ( $\rho = 0.72$  e  $p < 0.05$ ), three of the six ER $\alpha$  negative samples (score zero) presented mRNA levels similar to ER $\alpha$  positive samples classified as score 2 by immunohistochemistry. The sequencing results showed a low methylation percentage in all samples: 2,5% in normal mammary gland group, 1,9% in positive estrogen receptor group and 2,6% in negative estrogen receptor group. It was not observed significant difference of methylation among the groups ( $p > 0.05$ ). We can infer that in canine mammary tumors the gene *ESR1* probably is not silenced by DNA methylation. Further studies with higher number of samples are needed.

Key words: canine mammary cancer, estrogen receptor  $\alpha$ , *ESR1*, DNA methylation, epigenetic

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
2.1 CÂNCER DE MAMA .....	9
2.1.1 O câncer .....	9
2.1.2 Incidência e iniciação do câncer de mama .....	10
2.1.3 Diagnóstico e tratamento do câncer de mama .....	12
2.2 RECEPTOR DE ESTRÓGENO .....	14
2.2.1 Mecanismos de ação do RE $\alpha$ .....	15
2.3 EPIGENÉTICA.....	17
2.3.1 Metilação do DNA.....	18
2.3.2 RNAs não codificantes (ncRNA).....	20
2.3.3 Modificações pós-traducionais das histonas .....	22
3 OBJETIVOS .....	23
3.1 OBJETIVO GERAL .....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS .....	24
4.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	24
4.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE <i>ESR1</i> .....	25
4.3.1 Extração de RNA.....	25
4.3.2 Planejamento de iniciadores para PCR em tempo real (RT-qPCR) .	26
4.3.3 Síntese de cDNA e RT-PCR .....	27
4.3.4 PCR em tempo real (RT-qPCR) .....	27
4.4 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS ILHAS DE CpG DO GENE <i>ESR1</i> .....	28

4.4.1	Identificação das ilhas de CpG e planejamento dos iniciadores.....	28
4.4.2	Extração de DNA.....	29
4.4.3	Tratamento do DNA com bissulfito de sódio e amplificação do DNA	29
4.4.4	Clonagem e sequenciamento das ilhas CpG do gene <i>ESR1</i> .....	31
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5	RESULTADOS .....	33
5.1	DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	33
5.2	EXPRESSÃO RELATIVA DE mRNA DO GENE <i>ESR1</i> .....	35
5.2.1	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	35
5.2.2	RT-PCR e RT-qPCR .....	37
5.3	SEQUENCIAMENTO DA ILHA CpG.....	39
5.3.1	Análise <i>in silico</i> .....	39
5.3.2	Extração de DNA, amplificação e clonagem da ilha de CpG.....	40
5.3.3	Sequenciamento da ilha de CpG.....	42
6.	DISCUSSÃO .....	46
7.	CONCLUSÕES .....	51
	REFERÊNCIAS .....	52
	ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA .....	59

## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias apresentam elevada incidência em cadelas, correspondendo a mais da metade dos tumores nestes animais (QUEIROGA; LOPES, 2002). Embora sua carcinogênese não esteja completamente elucidada, sabe-se que o estrógeno e progesterona exercem importante papel na iniciação e progressão deste tumor (DONNAY et al., 1995; SORENMO et al., 2011). Esse papel se deve em grande parte à ligação do hormônio com seu receptor. No caso do receptor de estrógeno  $\alpha$  (RE $\alpha$ ), sua ativação leva à estimulação de diversos fatores de transcrição que irão atuar na regulação de genes responsivos ao estrógeno, muitos deles responsáveis pelo crescimento tumoral (KRÓLIK; MILNEROWICZ, 2012).

Devido à sua importância na progressão tumoral, o receptor de estrógeno, juntamente com o receptor de progesterona e com o receptor do fator de crescimento epidermal humano-2 (HER2), compõe o painel imuno-histoquímico diagnóstico e prognóstico do câncer de mama na mulher (SORLIE et al., 2001), além de ser alvo nas terapias hormonais (STUART-HARRIS; DAVIS, 2010).

Na medicina veterinária a função do RE $\alpha$  como marcador diagnóstico e prognóstico ainda não está bem estabelecida, embora muitos trabalhos tenham encontrado uma menor expressão desta proteína em neoplasias mamárias mais agressivas (PENA et al., 2014). Esta perda de expressão do receptor de estrógeno em tumores mamários de mulher de diferentes graus de malignidade foi demonstrada estar relacionada a um evento epigenético, a metilação do DNA. A hipermetilação da ilha de CpG na região promotora do gene do receptor de estrógeno  $\alpha$  (*ESR1*) em tumores de mama na mulher leva ao silenciamento deste gene e a consequente perda da expressão da proteína RE $\alpha$  (OTTAVIANO et al., 1994; RAMOS et al., 2010). Entretanto, não existem estudos sobre a regulação epigenética do gene *ESR1* em tumores mamários caninos.

Este trabalho teve o objetivo avaliar a expressão da proteína e do mRNA do gene *ESR1* em amostras de mama normal, tumores mamários benignos e malignos, bem como verificar a influência da metilação na regulação da expressão deste gene.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER DE MAMA

#### 2.1.1 O câncer

Conhecido por envolver mudanças dinâmicas no genoma, o câncer é uma classe de doenças que pode se desenvolver em qualquer tecido do corpo. Alterações genéticas e epigenéticas em oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo de DNA podem levar a defeitos nos processos biológicos regulatórios que controlam a proliferação celular e a homeostase, culminando no desenvolvimento tumoral. O câncer, no entanto, não é apenas uma massa de células em proliferação, mas sim um tecido complexo e heterogêneo, composto por vários tipos celulares que interagem entre si participando da iniciação e progressão tumoral, bem como do desenvolvimento de metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2000). HANAHAN e WEINBERG (2011) enumeraram uma série de eventos que participam da iniciação e desenvolvimento do câncer (FIGURA 1). Esses eventos incluem: autossuficiência em sinais de proliferação celular, insensibilidade aos sinais antiproliferativos, evasão a apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, instabilidade genômica, promoção de inflamação, desregulação energética metabólica e evasão a destruição imunológica.

FIGURA 1. EVENTOS CARACTERÍSTICOS DO CÂNCER



Estão representados os eventos característicos e essenciais para a iniciação, progressão e metástase do câncer. FONTE: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

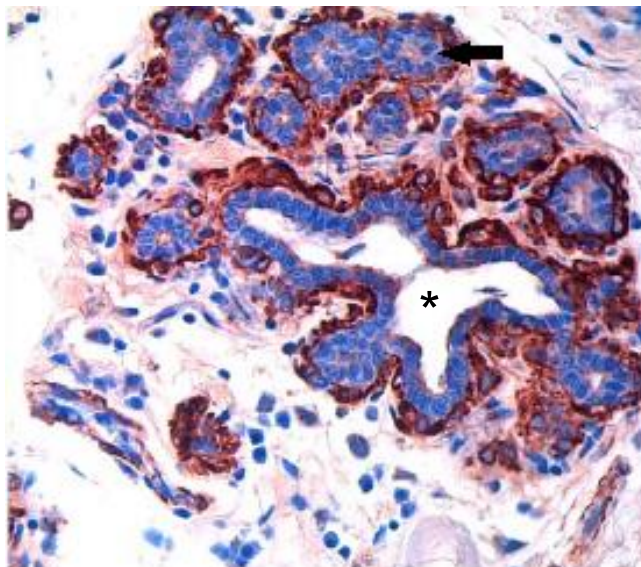
### 2.1.2 Incidência e iniciação do câncer de mama

O câncer de mama é o de maior incidência tanto nas mulheres adultas quanto em fêmeas caninas não castradas (MILLER et al., 2016; SORENMO et al., 2011). No Brasil, para o ano de 2016, foi estimado que o câncer de mama representasse 28,1% dos cânceres diagnosticados em mulher (INCA, 2016). Não existe estimativa nacional semelhante para o câncer em cadelas, entretanto em estudo retrospectivo de 19 anos conduzido na Universidade Federal de Santa Maria, o câncer de mama em cadelas teve uma prevalência anual de 36,3% a 49,2% (FILHO et al., 2010). A literatura internacional também relata elevada incidência de tumores mamários caninos (SALAS et al., 2015; VASCELLARI et al., 2016), entretanto esta incidência vem diminuindo em alguns países desenvolvidos, devido principalmente à prática mais comum da ovariectomia salpingo-histerectomia (OSH) em animais jovens (SLEECKX et al., 2011). A realização da OSH proporciona uma menor exposição aos hormônios ovarianos, os quais possuem importante papel na carcinogênese mamária. Outros fatores que também influenciam o desenvolvimento do câncer de mama tanto em cães como em humanos são a idade, dieta e obesidade (SOENMO et al., 2011; YOULDEN et al., 2012).

Tanto na mulher quanto na cadela a massa tumoral pode se originar dos tipos celulares que compõe o sistema ducto-lobular da glândula mamária, ou seja, pode ter origem no epitélio luminal dos ductos ou dos alvéolos e/ou nas células mioepiteliais que os circundam (FIGURA 2). A metaplasia óssea e/ou condroide é comumente observada nos tumores mamários caninos e pouco frequente nas mulheres (PENA et al., 2014; WEIGELT et al., 2014).

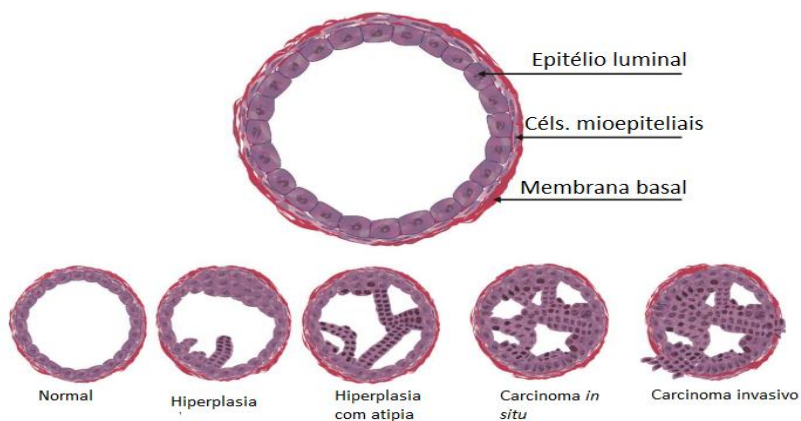
O desenvolvimento do câncer de mama pode ocorrer de uma forma progressiva (FIGURA 3), a partir de um epitélio ductal ou lobular hiperplásico, evoluindo para um carcinoma *in situ*, em que a membrana basal e as células mioepiteliais permanecem intactas, até alcançarem o estágio de carcinoma invasivo em que as células neoplásicas ultrapassam o mioepitélio e a membrana basal e passam a colonizar o estroma (CASSALI et al., 2014).

FIGURA 2. CORTE HISTOLÓGICO DE GLÂNDULA MAMÁRIA NORMAL DE CADELA MARCADA PARA CITOQUERATINA 5 (CK5) EM IMUNO-HISTOQUÍMICA



Lóbulo normal de glândula mamária de cadela composto por diversos ácinos (idênticos ao indicado pela seta preta na parte superior da imagem) e ducto (indicado pelo asterisco). As células mioepiteliais tem função contrátil e estão marcadas em marrom, circundando as células epiteliais de revestimento de ácinos e ducto de coloração azulada. FONTE: Adaptado de SORENMO et al., 2011.

FIGURA 3. ETAPAS DE FORMAÇÃO DO CARCINOMA INVASIVO



A figura representa um ducto normal, composto pelo epitélio luminal delimitado pelas células mioepiteliais e membrana basal. Na parte inferior da imagem observa-se uma formação hiperplásica em direção ao centro do ducto, passando a apresentar atipia celular. Num próximo estágio o aumento da atipia celular e da proliferação passam a caracterizar o carcinoma *in situ*, que tem seu crescimento projetado para o centro do ducto. No estágio mais avançado, as células neoplásicas conseguem ultrapassar as células mioepiteliais e a membrana basal, caracterizando um carcinoma invasivo. FONTE: Adaptado de CASSALI et al., 2014.

### 2.1.3 Diagnóstico e tratamento do câncer de mama

O diagnóstico do câncer de mama da cadela inicia com uma anamnese e exame físico completos, seguidos pelo estadiamento da neoplasia mamária através do sistema TNM, originalmente proposto pela Organização Mundial da Saúde (OWEN, 1980) e posteriormente adaptado (SORENMO; DEANNA; GOLDSCHMIDT, 2013). O sistema TNM é baseado no tamanho da neoplasia (T1 < 3 cm; T2 = 3- 5 cm; T3 > 5 cm), na metástase para linfonodo regional (N0- sem metástase; N1- presença de metástase) e metástase à distância (M0 – sem metástase; M1 presença de metástase). A combinação de T, N e M leva ao estadiamento do tumor de I a IV. A metástase nodal é avaliada por exame citopatológico e confirmada pelo histopatológico, enquanto que a busca por metástase à distância é realizada através de exames de imagem.

Após o estadiamento clínico do paciente segue-se a avaliação microscópica do tumor e do linfonodo regional. A classificação histopatológica dos tumores de mama de cadelas mais utilizada atualmente segue o proposto por Goldschmidt et al., (2011), e a graduação segue métodos modificados do sistema de ELSTON; ELLIS (1991). O exame histológico não classifica apenas os tumores em benignos ou malignos, mas também considera os aspectos morfológicos da neoplasia, a presença de proliferação de mioepitélio (tumor complexo) e a presença de componente mesenquimal (metaplasia óssea ou condroide) (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Os carcinomas mamários dos tipos anaplásico, micropapilar e sólido são os que apresentam maiores chances de realizar invasão local e metástase, enquanto tumores complexos e mistos (que apresentam metaplasia condroide e/ou óssea) são comumente associados a neoplasias menos agressivas (RASOTTO et al., 2012). Estas características diferem do que ocorre no câncer de mama da mulher, em que neoplasias que apresentam proliferação de mioepitélio ou metaplasia são mais raras e tem pior prognóstico, geralmente classificadas como *basal-like* ou triplo negativas de acordo com a imuno-histoquímica (INGTHORSSON; HILMARS DOTIR; KRICKER, 2015; WEIGELT et al., 2014).

A classificação imuno-histoquímica dos tumores de mama da mulher utiliza marcadores moleculares para determinar o prognóstico e a conduta terapêutica das

pacientes. O receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2) são os principais biomarcadores utilizados. De acordo com a presença ou ausência dessas moléculas nos ensaios de imuno-histoquímica, os tumores mamários em humanos são classificados como: Luminal A, Luminal B, os que superexpressam HER2, os *Basal-like* ou Triplos Negativos (TN). Os do tipo *Basal-like* e triplo negativo não apresentam nenhum destes três marcadores e se diferenciam quanto a expressão de citoqueratinas, sendo considerados os tipos mais agressivos de câncer de mama (SORLIE et al., 2001).

Recentemente, tem-se tentado adaptar este painel imuno-histoquímico para o prognóstico de tumores de mama de cadelas. O anticorpo componente do protocolo HercepTest (DAKO, Glostrup, Dinamarca), por exemplo, que é utilizado para a detecção de HER2 no câncer de mama de mulher, tem sido testado e mostrou ter reatividade inconstante em tecidos mamários caninos (BAILEY; WESTERLING; BROWN, 2015).

Apesar de algumas limitações da imuno-histoquímica, diversos estudos empregando esta técnica (DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005; MAINENTI et al., 2014; MILLANTA et al., 2005; NIETO et al., 2000; PENA et al., 2014), bem como trabalhos utilizando outros métodos de biologia molecular (KIM et al., 2014; MOHR et al., 2016; SPOERRI et al., 2015) tem demonstrado uma menor expressão do receptor de estrógeno em tumores mais agressivos de cadela, semelhante ao que ocorre na mulher. Entretanto, a grande variação na porcentagem de tumores positivos observada entre os estudos não permite ainda padronizar o RE como um marcador de prognóstico no câncer de mama da cadela (PENA et al., 2014).

Além do seu papel na determinação prognóstica no câncer de mama da mulher, o RE também possui grande importância no direcionamento do tratamento. Terapias hormonais são amplamente utilizadas no tratamento de câncer de mama RE positivo da mulher, sendo as drogas antagonistas de estrógeno, principalmente o tamoxifen, as de maior destaque (STUART-HARRIS; DAVIS, 2010). Na veterinária, o tratamento de escolha para o tumor de mama canino é a mastectomia, podendo ser associado aos quimioterápicos para a terapia adjuvante, sendo incomum o uso de tamoxifen (CASSALI et al., 2014). Os poucos trabalhos existentes com o uso do tamoxifen focam

nos efeitos adversos desta droga, sobretudo na piometra (infecção uterina), porém não apresentam resultados conclusivos sobre sua ação na prevenção de recidivas e sobrevida dos pacientes tratados (TAVARES et al., 2010).

## 2.2 RECEPTOR DE ESTRÓGENO

O receptor de estrógeno é um receptor predominantemente nuclear, também encontrado em menores proporções na membrana plasmática e no citoplasma (PRESS et al., 1986; RAZANDI et al., 1999). Este receptor apresenta elevada afinidade pelo estrógeno (E2), exercendo importante papel fisiológico na maturação dos órgãos reprodutivos femininos, bem como no desenvolvimento da glândula mamária (BOCCHINFUSO; KORACH, 1997; LUBAHN et al., 1993).

Foram descritos até o momento dois tipos de receptores de estrógeno, o receptor de estrógeno  $\alpha$  (RE $\alpha$ ), codificado pelo gene *ESR1* e o receptor de estrógeno  $\beta$  (RE $\beta$ ) codificado pelo gene *ESR2*, sendo o RE $\alpha$  o primeiro a ser descoberto e o mais estudado (KUIPER et al., 1996). Os receptores RE- $\alpha$  e  $\beta$  possuem suas estruturas conservadas e mecanismos de ativação semelhantes, embora apresentem algumas funções antagônicas (THOMAS; GUSTAFSSON, 2011).

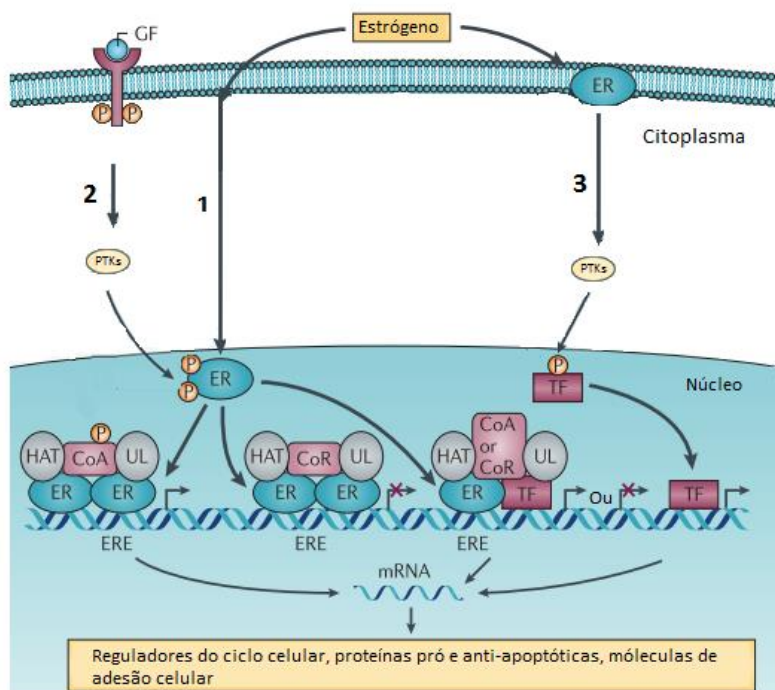
O RE $\alpha$  é altamente conservado entre as espécies e embora se observe diferenças nas sequências de aminoácidos entre as proteínas humana e canina, os principais sítios de ligação são idênticos (TONITI et al., 2011). Na sua porção N-terminal (região A/B), o RE $\alpha$  apresenta o domínio de transativação (AF1), responsável pela ativação independente de ligante. A região seguinte (C) corresponde ao domínio de ligação ao DNA (DBD), que interage com os elementos responsivos a estrógeno (EREs), presentes na região promotora dos genes responsivos ao estrógeno (KUMAR et al., 1987). Na região D há diversos domínios, inclusive o domínio dobradiça, que proporciona a mudança de conformação da proteína. O domínio de transativação dependente de ligante (AF2) está localizado na porção C-terminal que contém também o domínio de ligação ao ligante (LBD). Esta região (E/F) também é responsável pela interação com proteínas co-regulatórias, bem como pela dimerização do receptor e pela translocação nuclear (MORAS; GRONEMEYER, 1998) (FIGURA 4).

FIGURA 4. DOMÍNIOS DA PROTEÍNA RE $\alpha$ 

Figura representativa dos domínios da proteína RE $\alpha$ . Próximo à extremidade N terminal, na localização A/B está o domínio AF-1, responsável pela ativação independente de ligante. Na região C está o domínio de ligação ao DNA (DBD), que interage com as regiões ERE dos genes alvos. O domínio seguinte que ocupa a região D é o domínio dobradiça. Próximo à porção C terminal está o domínio LBD, na posição E, local aonde o estrógeno irá se acoplar e na região F está o domínio AF-2, o domínio de transativação dependente de ligante. Os números na parte de baixo da figura indica a posição dos domínios em relação aos aminoácidos. FONTE: Adaptado de KHAN; ANSAR AHMED, 2016.

### 2.2.1 Mecanismos de ação do RE $\alpha$

A ação do RE $\alpha$  pode ocorrer através da via genômica ou da via não genômica (FIGURA 5). Na via genômica o RE $\alpha$  interage diretamente com o DNA. Nesta via o RE $\alpha$  nuclear é ativado pela ligação do E2 ao seu domínio LBD, ocorrendo então sua dimerização e formando o complexo RE $\alpha$ -E2. Este complexo se liga, através do domínio DBD, aos elementos responsivos a estrógeno (ERE) presentes na região promotora de genes responsivos a estrógeno. Essa ligação proporciona a interação do complexo RE $\alpha$ -E2 com proteínas co-ativadoras ou co-repressoras. O complexo multiproteico então formado recruta proteínas co-regulatórias como a histona acetiltransferase (HAT) e a ubiquitina ligase (UL), que promovem a ativação ou repressão destes genes alvos (YAGER; PH; DAVIDSON, 2006). Além da interação direta com o DNA, o RE $\alpha$  pode interagir e ativar fatores de transcrição, como o AP-1, que irá proporcionar a ancoragem do receptor de estrógeno à cromatina ou facilitar a interação do RE $\alpha$  com a região ERE (CARROLL et al., 2006).

FIGURA 5. MECANISMO DE AÇÃO DO RE $\alpha$ 

A ação do RE $\alpha$  quando ativado pode se dar pela via genômica (1 e 2) ou pela não genômica (3). Na via clássica (1) o estrógeno se liga ao RE $\alpha$  (ER), formando um complexo RE $\alpha$ -E2 que dimeriza e se liga ao elemento ERE dos genes responsivos ao estrógeno, formando um complexo multiproteico com proteínas co-ativadoras (CoA) ou co-repressoras (CoR) que por sua vez recrutam proteínas co-regulatórias (HAT e UL). Além de agir diretamente nos elementos ERE, o RE $\alpha$  pode interagir com fatores de transcrição (TF) que auxiliam em sua ancoragem ao elemento ERE para posterior recrutamento das proteínas co-ativadoras ou co-repressoras e co-regulatórias. O segundo meio de ação através da via genômica (2) se diferencia do anterior pois a ativação do RE $\alpha$  é independente de ligante, ou seja, outras proteínas como ERBB2, IGF ou EGF ao interagirem com seus receptores desencadeiam uma cascata de proteína-quinases (PTKs) que acabam por fosforilar o RE $\alpha$ , ativando-o. Uma vez ativado, o RE $\alpha$  irá agir da mesma forma já descrita. A ação pela via não genômica (3) se inicia com a ligação do estrógeno a RE $\alpha$  de membrana ou citoplasmáticos que desencadeia uma cascata de proteína-quinase, resultando na fosforilação e ativação de fatores de transcrição que irão regular a transcrição de seus genes alvo. Por fim, todas essas vias levam à regulação da expressão de diversos genes. ER: receptor de estrógeno; CoA: proteína co-ativadora; CoR: proteína co-repressora; HAT: histona acetiltransferase; UL: ubiquitina ligase; TF: fator de transcrição. FONTE: Adaptado de THOMAS; GUSTAFSSON, 2011.

Ainda na via genômica, o RE $\alpha$  pode ser ativado independente da ligação com E2. Diversos receptores de fatores de crescimento tirosina-quinase como o EGFR, IGFR e ERBB2 podem fosforilar o RE $\alpha$ , ativando-o na ausência do E2. Após sua ativação, o RE $\alpha$  segue o mesmo roteiro descrito anteriormente (YAGER; PH; DAVIDSON, 2006).

A via não genômica ocorre a partir da ligação de RE $\alpha$  citoplasmático ou de membrana com E2. Esta interação ativa vias tirosina-quinase e segundos mensageiros

que irão promover a regulação gênica por meio de fatores de transcrição (BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005). Seja pela via genômica ou não genômica, a ativação do receptor de estrógeno  $\alpha$  termina por interferir na regulação de outros genes. Devido a muitos destes genes estarem relacionados a regulação de ciclo celular e a apoptose, a ação do RE $\alpha$  pode levar a uma intensa proliferação celular que tem como consequência o acúmulo de mutações no DNA, algumas podendo ser carcinogênicas. O aumento da expressão do oncogene *MYC* e da Ciclina D1, que induz a transição entre as fases G1/S do ciclo celular, por exemplo, estão entre os eventos relacionados à ação do ER $\alpha$  na proliferação celular (THOMAS; GUSTAFSSON, 2011).

Após ser ativado e agir no gene alvo, o RE $\alpha$  será degradado e novo RE $\alpha$  deverá atuar neste gene para manter sua ativação ou repressão. Sua degradação ocorre também em casos de alteração no ambiente celular, como hipóxia; quando as chaperonas que o protegem estão em pequena quantidade ou quando há elevada expressão de ubiquitina ligase (THOMAS; GUSTAFSSON, 2011).

A síntese de RE $\alpha$  é estimulada por fatores de transcrição como GATA3 e FOXA1, responsáveis por promover a transcrição do gene *ESR1* (THEODOROU et al., 2013). Já a repressão do RE $\alpha$  ocorre por meio de eventos epigenéticos, como metilação de DNA e micro-RNAs (OTTAVIANO et al., 1994; CALVANO FILHO et al., 2014).

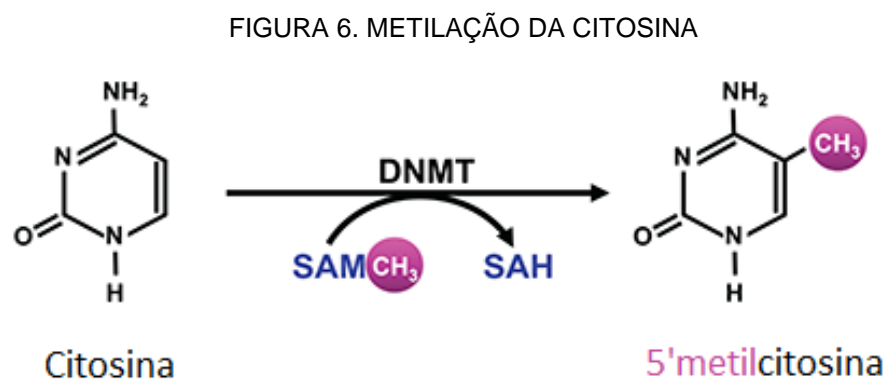
### 2.3 EPIGENÉTICA

O conceito de epigenética foi primeiramente postulado por Waddington (1942) para descrever eventos influenciados pelo ambiente, que residem entre o genótipo e sua expressão fenotípica. Tais eventos ocorrem independentemente da sequência nucleotídica do DNA e tem como produto final mudanças herdáveis da função gênica e de sua expressão fenotípica (FEINBERG; TYCKO, 2004)

As alterações epigenéticas podem ocorrer através da metilação do DNA, das modificações pós-traducionais das histonas e dos RNAs não codificadores (ncRNA) (BIRD, 2002; CAO, 2014). Tais processos interferem no acesso de diversos fatores de transcrição ao DNA e, conseqüentemente, modulam a expressão gênica podendo dar origem aos fenótipos patológicos (JONES, 2012).

### 2.3.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais conhecida (BIRD, 2002). Ela baseia-se na transferência de um grupamento metil da molécula S-adenosil-metionina (SAM) para o carbono 5 da citosina, reação catalisada pela enzima DNA metil-transferase (DNMT), tendo como produto a 5-metilcitosina (5meC) (FIGURA 6) (RAZIN; RIGGS, 1980).



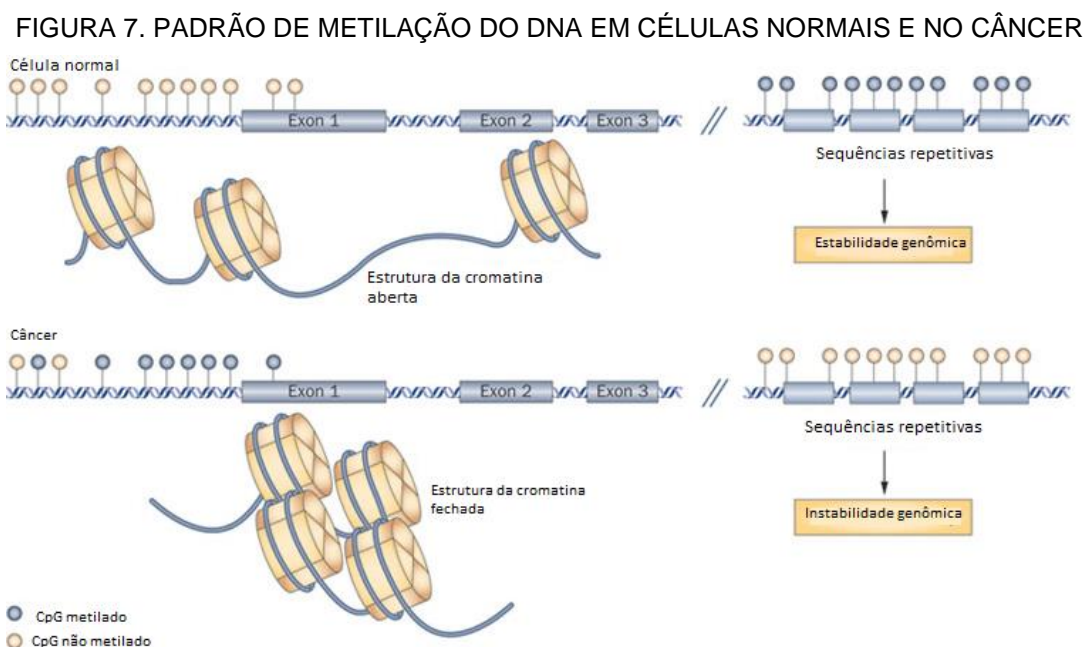
A enzima DNA metil-transferase (DNMT) catalisa a transferência do grupamento metil ( $\text{CH}_3$ ) da S-adenosil-metionina (SAM) para o carbono 5' da citosina, formando a 5-metilcitosina (5meC) ou seja, a citosina metilada. FONTE: Adaptado de <https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arcr351/6-16.htm>

Em mamíferos, a metilação do DNA acontece preferencialmente nas citosinas seguidas de guaninas, os dinucleotídeos CpG (BIRD, 2002). Algumas regiões do DNA apresentam elevada densidade de CpGs, sendo denominadas ilhas de CpG (CGI). Estas regiões do genoma contém pelo menos 200 pares de bases (pb), a soma de G+C deve corresponder a 50% ou mais do total de pares de base e a razão entre CpG observados/CpG esperados deve ser no mínimo 0,6 (GARDINER-GARDEN; FROMMER, 1987).

As CGIs estão espalhadas por todo o genoma, de uma forma não randômica, estando presente na região promotora de 60% dos genes humanos (BIRD, 2002). Quando comparado com outros mamíferos como camundongo, vaca, cavalo e cão, o homem apresenta menor densidade de CGIs, entretanto possui a maior porcentagem de CGIs associadas ao promotor (BARAZANDEH et al., 2016). Em um estudo

conduzido por HAN e ZHAO (2009) foram identificadas a presença de CGIs associadas ao promotor em 6418 genes homólogos entre cão e homem, e observou-se que 20,9% destes genes possuíam CGIs associadas ao promotor no genoma humano mas não no canino. Este estudo mostrou também que a maioria das ilhas de CpG presentes no genoma do cão estão localizadas nas regiões intragênicas (corpo do gene) e intergênicas.

A maioria das CGIs está desmetilada em todos os estágios de desenvolvimento de todos os tipos de tecido, enquanto que a maior parte dos CpGs espalhados ao longo do genoma encontram-se metilados (FIGURA 7) (JONES, 2012).



Nas células somáticas normais as CGIs encontram-se em sua maioria desmetiladas, sobretudo aquelas associadas à região promotora, mantendo a cromatina com sua estrutura aberta o que permite a ação regulatória de fatores de transcrição. Nestas mesmas células os CpGs intragênicos estão metilados, sendo uma de suas funções reprimir a transcrição de seqüências repetitivas, mantendo a estabilidade genômica. Já numa célula de câncer, determinados genes podem apresentar hipermetilação de CGI associada ao promotor, fazendo com que a estrutura da cromatina se feche, impedindo a ação de fatores de transcrição. Os CpGs intragênicos por sua vez, podem estar desmetilados, permitindo a transcrição de elementos repetitivos, o que causa uma instabilidade genômica favorecendo mutações e o câncer. FONTE: Adaptado de LAO; GRADY, 2011.

Mudanças no perfil de metilação, como a hipermetilação de CGIs e a hipometilação dos CpGs no corpo do gene, estão relacionadas com desenvolvimento de diversas doenças, como o câncer. A hipermetilação de CGI associada ao promotor

leva a uma mudança conformacional da cromatina, impossibilitando a atuação de fatores de transcrição e, conseqüentemente, suprimindo a transcrição gênica. Quando o silenciamento gênico provocado pela hipermetilação ocorre em genes supressores de tumor acontece uma desregulação do ciclo celular que resulta no desenvolvimento do câncer (NGUYEN et al., 2001). No câncer de mama da mulher, por exemplo, este meio de silenciamento gênico é responsável por 41% dos casos de receptor de estrógeno negativo (HERVOUET et al., 2013). Já a hipometilação global, quando ocorre em regiões de sequências repetitivas, gera instabilidade genômica, contribuindo para o aparecimento do processo neoplásico (LAO; GRADY, 2011)

Além de proporcionar o silenciamento de sequências repetitivas e a estabilidade genômica, existem outras hipóteses para as funções da metilação de CpG ao longo do corpo do gene. Estas funções incluem modulação do processamento alternativo (LEV MAOR; YEARIM; AST, 2015), a regulação de possíveis promotores alternativos (BLACKBURN et al., 2015; ILLINGWORTH et al., 2010), além do controle da expressão gênica. A hipermetilação de ilhas intragênicas associadas aos primeiros éxons (NGUYEN et al., 2001; SHIMIZU et al., 2014), bem como a hipometilação de CGIs em sequências repetitivas vem sendo relacionadas com a repressão da transcrição (APORNTIEWAN et al., 2011).

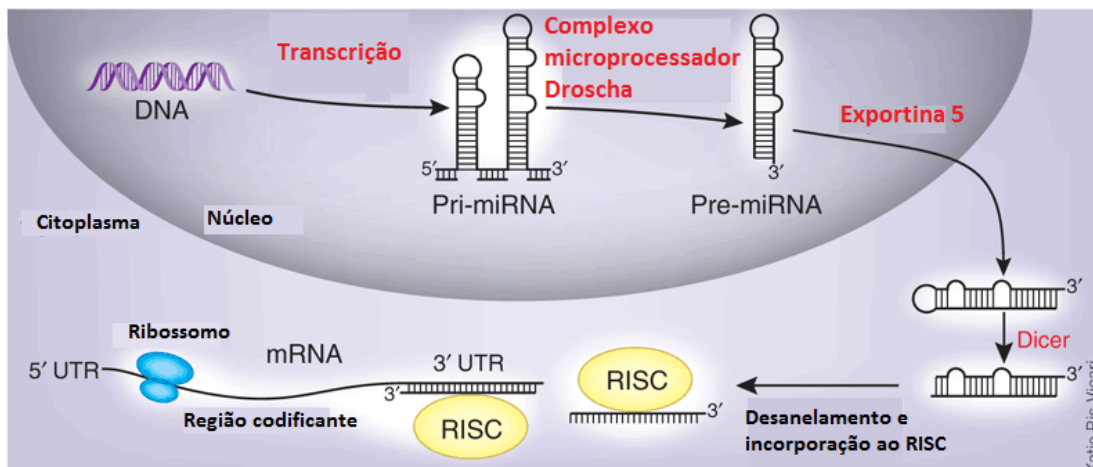
### 2.3.2 RNAs não codificantes (ncRNA)

Os RNAs não codificantes são moléculas transcritas do genoma, não traduzidas em proteínas. Embora não originem uma proteína, os ncRNAs desempenham importantes papéis. Os RNAs ribossomais (rRNA) e o transportador (tRNA), por exemplo, possuem função estrutural na célula, enquanto RNA de interferência (siRNA), os micro RNAs (miRNA) e os RNAs longos (lncRNA) são responsáveis por regulação gênica (MATTICK; MAKUNIN, 2006).

Os miRNA foram primeiramente descritos em *Caenorhabditis elegans* em 1993, onde viu-se que um RNA codificado pelo gene *lin-4* se ligava à região 3'UTR do mRNA *lin-14*, reprimindo sua tradução (LEE, 1993).

Os miRNAs são transcritos a partir de um *locus* próprio no genoma ou de introns de genes codificantes de proteínas, dando origem ao miRNA primário (primiRNA). Este miRNA primário é processado em pre-miRNA que é então translocado para o citoplasma onde será transformado em miRNA. O miRNA formado irá integrar parte de um complexo de ribonucleoproteína, o Complexo de Silenciamento Induzido por miRNA (RISC ou miRISC ) que reconhece uma sequência complementar ao miRNA na região 3'UTR de mRNAs e realiza a degradação ou repressão da tradução deste mRNA (FIGURA 8) (BARTEL, 2004).

FIGURA 8. BIOGÊNESE E AÇÃO DOS miRNAs



O transcrito primário, o Pri-miRNA é longo, com capacete 5' e cauda poli(A), que pode dar origem a um único miRNA ou pode conter um cluster de dois ou mais miRNA. Ainda no núcleo o Pri-miRNA sofre clivagem pela enzima Droscha, componente de um complexo microprocessador, liberando o Pre-miRNA em forma de grampo. O Pre-miRNA é então exportado para o citoplasma através da Exportina 5, onde é clivado pela enzima DICER de forma assimétrica na região do grampo, formando um miRNA de fita dupla, de aproximadamente 22 nucleotídeos com 2 nucleotídeos sobressalentes em cada extremidade 3'. Uma das fitas do miRNA, a fita guia, é englobada pelo RISC que irá guiar o complexo para mRNA alvo, o qual possui sequência complementar ao do miRNA, que será então reconhecido pelo miRNA e degradado ou terá sua tradução reprimida. FONTE: Adaptado de (JEFFREY, 2008).

Desde sua descoberta, os miRNAs vem sendo estudados em diversas doenças, inclusive no câncer (LU et al., 2005). A superexpressão de miRNAs com função oncogênica (oncomiR) ou a depleção de miRNAs que agem como supressores de tumor colaboram com a iniciação e progressão do câncer (LIN; GREGORY, 2015). No caso do câncer de mama, alguns miRNAs como miR-18a e o miR-222 tem mostrado um relação inversa com a expressão de RE $\alpha$ , ou seja, tumores RE $\alpha$  negativos

apresentam maiores níveis destes miRNA, sugerindo ação destes micro RNAs sobre o transcrito do gene *ESR1* (CALVANO FILHO et al., 2014; PETROVIC et al., 2016).

### 2.3.3 Modificações pós-traducionais das histonas

Os nucleossomos são as unidades funcionais da cromatina, compostos por 147 nucleotídeos envolvendo um octâmero de histonas (MCGHEE; FELSENFELD, 1980). Formando o octâmero estão as histonas H2A, H2B, H3 e H4, cujas caudas N terminais podem sofrer modificações como fosforilação, acetilação e metilação entre outras (FEINBERG; TYCKO, 2004). Estas modificações afetam a conformação da cromatina, podendo ativar ou silenciar a transcrição gênica (MICELI et al., 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência da metilação do DNA na regulação do gene *ESR1* em tumores de mama caninos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a expressão proteica do receptor de estrógeno  $\alpha$  em tumores de mama malignos e benignos em comparação com a mama normal;
- Investigar a expressão do mRNA do gene *ESR1* em tumores de mama caninos e correlacioná-lo com a expressão proteica;
- Clonar e sequenciar a ilha de CpG do gene *ESR1*, correlacionando seu perfil de metilação com a expressão gênica.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de tumores mamários e glândulas mamárias normais foram obtidas de peças cirúrgicas encaminhadas ao Laboratório de Patologia Veterinária do HV-UFPR, para exame histopatológico de rotina após mastectomia radical unilateral. O procedimento terapêutico cirúrgico foi realizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (HV-UFPR). Sob a supervisão do médico veterinário patologista Renato Silva de Sousa, as amostras de mama normal e tumoral foram coletadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de DNA e RNA. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná sob o número 048/2015 (ANEXO 1).

Após a coleta das amostras para congelamento as peças cirúrgicas foram fixadas em formol 10% tamponado por 24 a 72 horas e seguiram o processamento histológico de rotina, com inclusão em parafina e posterior corte e coloração das secções histológicas com hematoxilina e eosina. A avaliação histológica foi realizada por dois patologistas, seguindo a classificação proposta por Goldschmidt et al. (2011) e graduação de Elston e Ellis (1991) modificada (CASSALI et al., 2011). Amostras apresentando proliferação de mioepitélio ou metaplasia foram excluídas deste estudo, uma vez que há contradição na literatura quanto à expressão de receptor de estrógeno  $\alpha$  por estes tipos celulares (DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005; NIETO et al., 2000). Quatro glândulas mamárias normais e 17 neoplasias mamárias simples foram selecionadas para o estudo, sendo oito tumores benignos e nove malignos. Para o grupo de tumores malignos foram selecionadas apenas neoplasias metastáticas, uma vez que estas possuíam maior chance de serem RE $\alpha$  negativo.

### 4.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Durante a avaliação histopatológica, uma área representativa de cada amostra foi selecionada para compor o *Tissue Microarray* (TMA). O TMA foi montado conforme padronizado pelo Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR (SCHULER et al.,

2008). A lâmina de TMA foi então submetida à marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-receptor de estrógeno, clone RE $\alpha$  EP1 (Dako), realizada no Centro de Patologia de Curitiba (CPC).

Inicialmente foi feita a recuperação antigênica em tanques PT Link a 97°C com soluções EnVision FLEX Target Retrieval Solution por 20 minutos. A reação foi realizada em plataforma de automação imuno-histoquímica (Dako Autostainer Link 48), sendo a incubação do anticorpo primário em temperatura ambiente por 20 minutos de acordo com protocolo específico. A revelação foi realizada com o sistema EnVision FLEX DAB + cromógeno.

A avaliação da lâmina de TMA foi realizada por dois patologistas, em microscópio de luz, em campo de maior aumento de 400X, utilizando o sistema *Allred score*. Este sistema de avaliação baseia-se na aplicação de escores de 0 a 5 para porcentagem de células marcadas e de 0 a 3 para a intensidade da marcação. Desta forma, a pontuação final poderá variar de 0 ou 2 a 8, sendo 0 sem reatividade e 8 elevada reatividade. Para fins de comparação, uma amostra de útero de cadela foi incluída no TMA, sendo a intensidade de sua marcação considerada como escore 3 (PENA et al., 2014). A amostra de útero também foi utilizada como controle positivo da reação. Glândulas mamárias normais adjacentes ao tumor foram utilizadas como controle positivo interno de cada tecido e células estromais como controle negativo. Amostras apresentando escore zero foram consideradas como RE $\alpha$  negativas, enquanto que amostras com escore igual ou maior que dois foram consideradas como RE $\alpha$  positivas.

### 4.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE *ESR1*

#### 4.3.1 Extração de RNA

Foram testados três métodos de lise do tecido para a extração de RNA. Inicialmente testou-se clivar o tecido em pequenos pedaços utilizando lâmina de bisturi. O segundo teste foi realizado macerando o tecido com nitrogênio líquido utilizando gral e pistilo. E por último, a amostra foi adicionada a um tubo contendo *Trizol Reagent* (Invitrogen), acoplado ao equipamento Tissue Lyser II (Qiagen) programado na

frequência de 25 Hz por 1 a 2 minutos. A extração do RNA seguiu as instruções do fabricante. A quantidade e qualidade do RNA foram avaliadas através da leitura em espectrofotômetro Nanodrop 2000 e gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. No gel de agarose foi aplicado 2µL de RNA de cada amostra e 1µL do plasmídeo pGEM (100ng/µL) usado como referência de quantidade.

#### 4.3.2 Planejamento de iniciadores para PCR em tempo real (RT-qPCR)

Os genes *HPRT* e *RPS18* foram usados como normalizadores endógeno para o gene alvo *ESR1*. Os iniciadores utilizados para amplificar os genes *ESR1* e *RPS18* no RT-qPCR foram desenhados com o auxílio do software Primer 3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os iniciadores para o gene *RPS18* foram planejados flanqueando o último íntron, de forma que em caso de contaminação com DNA fosse observada uma banda de 229 pb. A sequência dos iniciadores do outro normalizador endógeno, o *HPRT*, foi obtida na literatura (KLOPFLEISCH; KLOSE; GRUBER, 2010). As sequências e temperaturas de anelamento dos iniciadores estão dispostas no QUADRO 1.

QUADRO 1. SEQUÊNCIA DE CARACTERÍSTICAS DOS INICIADORES UTILIZADOS

Iniciador	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto	Temp. anelamento (°C)
RT-qPCR-ESR1 (U) RT-qPCR-ESR1 (R)	AGCTCCTCCTCATCCTCTCC AGGTCGTAGAGAGGCACCAC	100 pb	63
RT-qPCR-HPRT (U) RT-qPCR-HPRT (R)	TGCTCGAGATGATGAAGG TCCCCTTGACTGGTCATT	191 pb	60
RT-qPCR-RPS18 (U) RT-qPCR-RPS18 (R)	CCTGTGGTCTTGGTGTGCT CCATGCAGAAGTTTTACGAGCT	121 pb	60
ILHA ESR1 (U) ILHA ESR1 (R)	GAGTGATGTTTAAATTAATGTTAGAAG AAATCTAATACAACAAACCATTCC	421 pb	48

Os iniciadores U representam os universais e R reversos.

#### 4.3.3 Síntese de cDNA e RT-PCR

Para a síntese da fita de DNA complementar ao RNA (cDNA), foi utilizado 1000 ng de RNA a partir do protocolo da enzima transcriptase *High Capacity*, (Applied Biosystem) conforme orientações do fabricante. Para avaliar a eficiência da síntese, foi realizada uma RT-PCR utilizando 1 µL do cDNA sintetizado, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 1 U *Taq Platinum I* (Invitrogen) e 0,3 µM de iniciadores para o gene *RPS18*, em um volume de 20 µl, realizando um total de 35 ciclos em termociclador. O produto da reação foi aplicado em gel de poliacrilamida 8% e revelado com nitrato de prata. As reações de RT-PCR para os genes *HPRT* e *ESR1* foram realizadas conforme descrito acima e o produto foi aplicado em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio.

#### 4.3.4 PCR em tempo real (RT-qPCR)

Para a padronização da técnica de qPCR foi realizada uma curva de eficiência de cada iniciador, utilizando cDNA de mama normal, na proporção de 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000. Com base nos resultados obtidos para o gene *RPS18*, a concentração de 1:100 de cDNA foi a escolhida para ser utilizada em todos os experimentos. Após a definição da diluição do cDNA, foi realizada a curva de concentração de cada iniciador nas concentrações de 150 nM, 300 nM, 600 nM e 900 nM. A melhor concentração obtida dos iniciadores foi 150 nM. Todo o experimento, incluindo a padronização, foi realizado utilizando o reagente *SYBR Green 1X* (*Applied Biosystem*) em sistema de 10 µL utilizando o equipamento *StepOne* (*Applied Biosystem*). Após a padronização, a qPCR foi conduzida para todas as amostras em triplicata seguindo as condições descritas acima, com a construção de curva de dissociação. Para cada amostra foi realizada uma média entre os valores de Ct das replicatas e esse valor foi linearizado e normalizado utilizando o programa geNorm (PFAFFL, 2001; VANDESOMPELE et al., 2002).

A curva de eficiência de cada iniciador foi realizada no programa *Excel* a partir dos dados de Ct da diluição seriada do cDNA. A eficiência dos iniciadores estava entre 95 - 105% e seu cálculo foi realizado pela fórmula:

$$E = 10^{-1/\text{coef.angular}}$$

Utilizando o valor de eficiência de cada iniciador as médias dos Cts foram linearizadas e utilizando o programa *geNorm* foi gerado um fator de normalização à partir dos dados dos genes constitutivos. Esse fator de normalização foi então utilizado para normalizar o gene alvo em cada amostra e nos controles. Com estes valores normalizados foi determinada a razão amostra/controle. O dado final gerado foi analisado estatisticamente.

#### 4.4 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS ILHAS DE CpG DO GENE *ESR1*

##### 4.4.1 Identificação das ilhas de CpG e planejamento dos iniciadores

A sequência do gene *ESR1* canino foi obtida dos bancos de dados *GenBank*, sequência referência NCBI: NC\_006583.3 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC\\_006583.3?report=fasta&from=41985881&to=42368550](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_006583.3?report=fasta&from=41985881&to=42368550)) e *Ensemble*, código ENSCAFG00000000430, ([http://www.ensembl.org/Canis\\_familiaris/Gene/Summary?db=core;g=ENSCAFG00000000430;r=1:42081316-42368689;t=ENSCAFT00000000680](http://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Gene/Summary?db=core;g=ENSCAFG00000000430;r=1:42081316-42368689;t=ENSCAFT00000000680)). Para investigar a presença de ilhas de CpG no gene em questão, toda a sequência gênica, acrescida de 1000 pares de bases (pb) acima do sítio de início de transcrição (TSS) foi submetida ao programa *EMBOSS CpGPlot* ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/segstats/emboss\\_cpplot/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/segstats/emboss_cpplot/)). Os parâmetros utilizados foram os mesmos estipulados por GARDINER-GARDEN; FROMMER (1987), ou seja, comprimento mínimo da ilha de 200 pares de base, 50% ou mais de C+G e CpG observados/ CpG esperados maior ou igual a 0,6.

A ilha de CpG mais próxima do TSS, apresentando 1133 pb foi selecionada para o estudo. Os iniciadores para amplificação desta ilha foram planejados com auxílio do programa *Methprimer* (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>),

utilizando os mesmos parâmetros citados anteriormente para o programa *EMBOSS CpGPlot*. Ao submeter a ilha de CpG, o programa *Methprimer* fornece a sequência dos iniciadores para o DNA tratado com bissulfito de sódio (item 4.4.3). As sequências dos iniciadores, bem como suas temperaturas de anelamento e o tamanho dos produtos estão no QUADRO 1.

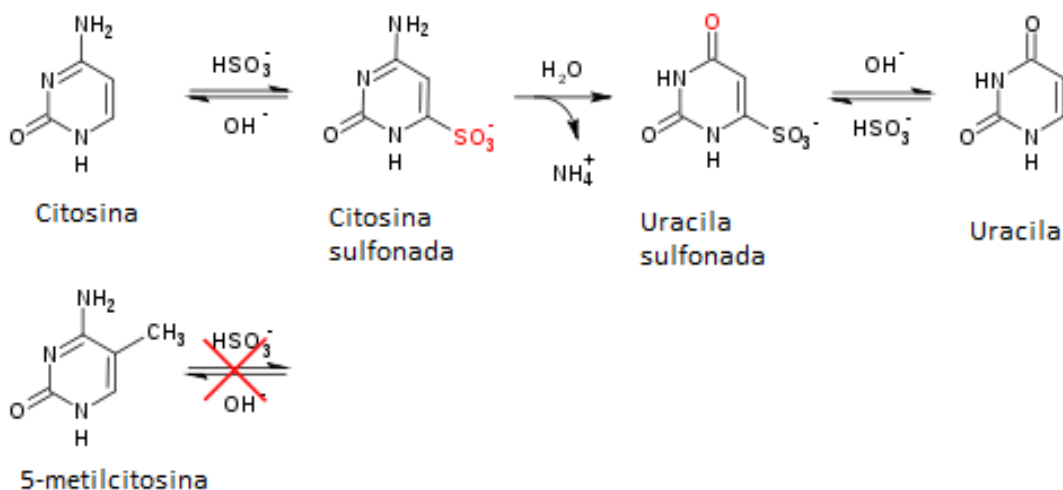
#### 4.4.2 Extração de DNA

Cerca de 100 mg de cada amostra coletada foi utilizado para a extração do DNA por meio do método de fenol/clorofórmio (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). A quantidade e qualidade do DNA foram avaliadas através da leitura em espectrofotômetro Nanodrop 2000 e gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e revelado em luz ultravioleta. No gel de agarose foi aplicado 2 $\mu$ L de RNA de cada amostra e 1 $\mu$ L do plasmídeo pGEM (100ng/ $\mu$ L) usado como referência de quantidade.

#### 4.4.3 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio e amplificação do DNA

O DNA extraído foi tratado com bissulfito de sódio utilizando o protocolo EpiTec (Qiagen), seguindo as especificações do fabricante. Neste tratamento ocorre inicialmente a sulfonação da citosina (adição de grupamento sulfito), resultando numa citosina sulfonada que sofrerá deaminação dando origem à uracila sulfonada. No último passo, ocorre a dessulfonação alcalina da uracila sulfonada, resultando em uracila (FIGURA 9). Entretanto, quando a citosina está metilada a sulfonação é impedida, não ocorrendo a transformação de citosina em uracila. De uma forma geral, o tratamento de bissulfito converte citosina não metilada em uracila e não promove alterações na citosina metilada (CLARK et al., 1994).

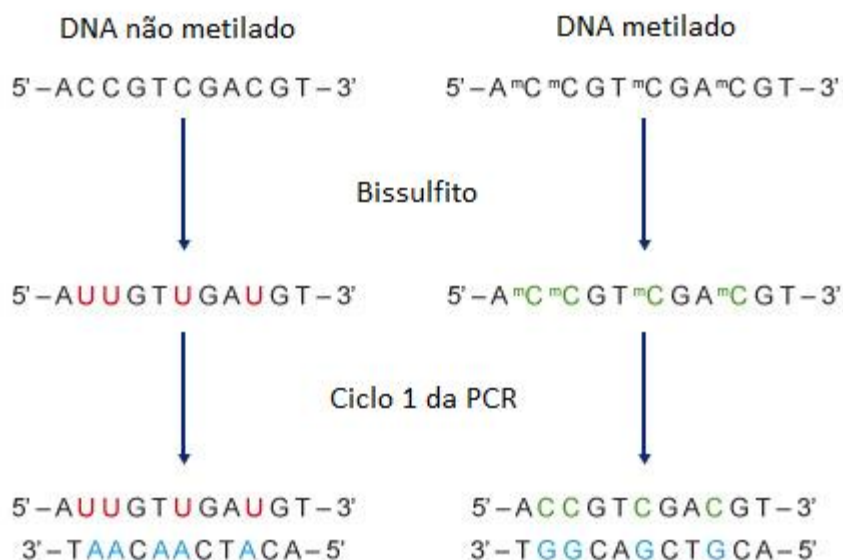
FIGURA 9. CONVERSÃO DA CITOSINA NÃO METILADA PELO BISSULFITO DE SÓDIO



No tratamento com bissulfito de sódio a citosina não metilada recebe o grupo sulfito ( $\text{SO}_3^-$ ) do bissulfito de sódio ( $\text{NaHSO}_3$ ) sendo transformada em citosina sulfonada, que por sua vez na presença de água sofrerá deaminação (perda de  $\text{NH}_4^+$ ) formando a uracila sulfonada. Em um último passo a uracila sulfonada passa pelo processo de dessulfonação alcalina, liberando o grupamento sulfito na presença de pH básico. Entretanto quando a citosina é metilada ela se torna refratária a este tratamento, permanecendo citosina ao fim da reação. FONTE: Adaptado de <https://www.neb.com/applications/epigenetics/dna-methylation-analysis/bisulfite-conversion>

Após o tratamento com bissulfito de sódio, foi realizada uma reação de PCR para amplificação da ilha de CpG do gene *ESR1*. A PCR foi realizada com  $1\mu\text{L}$  do DNA tratado, tampão de PCR 1X (Invitrogen),  $1,5\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $200\ \mu\text{M}$  dNTP,  $1\text{ U}$  *Taq Platinum I* (Invitrogen) e  $8\ \mu\text{moles}$  dos iniciadores específicos. No primeiro ciclo da PCR, ao fazer a extensão da fita molde, a enzima *Taq polimerase* parecia adenina com uracila e nos ciclos subsequentes a timina é adicionada para parear com a adenina (FIGURA 10). Assim, no produto final da PCR a uracila é substituída por timina, ou seja, após o tratamento de bissulfito de sódio seguido de PCR, as citosinas não metiladas são convertidas em timina.

FIGURA 10. SUBSTITUIÇÃO DE URACILA POR TIMINA NA PCR



Após o tratamento com bissulfito as citosinas não metiladas são convertidas em uracila e as metiladas permanecem como citosinas. No primeiro ciclo da PCR a enzima *Taq polimerase*, responsável por adicionar os nucleotídeos e realizar a extensão da fita de DNA, pareia a uracila presente na fita molde com adenina na fita complementar. Nos ciclos seguintes a adenina é pareada com timina na fita complementar e então a duplicação das fitas segue normalmente. No caso das citosinas metiladas, elas sofrem replicação normalmente, sem haver substituição de bases no DNA. FONTE: Adaptado de <http://www.abcam.com/epigenetics/dna-methylation-a-guide>

#### 4.4.4 Clonagem e sequenciamento das ilhas CpG do gene *ESR1*

Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta. O fragmento de interesse foi cortado do gel e purificado utilizando protocolo do QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen). O DNA purificado foi ligado no plasmídeo *pGEMTeasy* (Promega), que possui resistência à ampicilina 250 ug/mL, e transformado por eletroporação em cepas de *Escherichia coli* DH10B, resistentes à estreptomicina 20ug/mL. Após a eletroporação, as bactérias foram plaqueadas em meio Luria Bertani Ágar, acrescido de X-Gal (80uL/mL), IPTG (100uL/mL), ampicilina 30% e estreptomicina 20%.

A seleção das bactérias que apresentam o inserto de DNA é definida a partir da  $\alpha$ -complementação, uma vez que a presença de estreptomicina e ampicilina permite apenas o crescimento de *E. coli* DH10B que incorporaram o plasmídeo após a eletroporação, inibindo o crescimento daquelas que não o possuam e de bactérias

contaminantes. A  $\alpha$ -complementação é um método utilizado para diferenciar, a partir da coloração das colônias, as bactérias que de fato possuem o inserto de DNA ligado ao plasmídeo daquelas que possuem apenas o plasmídeo, sem o inserto. Quando utilizando o vetor *pGEMTeasy*, o fragmento de DNA de interesse é inserido no interior do gene *Lac z* do plasmídeo, impedindo a produção correta da  $\beta$ -galactosidase, proteína codificada por este gene. A  $\beta$ -galactosidase tem capacidade de clivar o X-Gal, um substrato cromógeno que quando clivado exibe coloração azulada. A transcrição do gene *Lac z* é estimulada pelo reagente IPTG. Doze colônias de cada amostra de DNA foram selecionadas e submetidas a uma PCR para confirmar a presença do inserto de DNA. A PCR foi realizada sob as mesmas condições citadas no item anterior, utilizando os mesmos iniciadores e a eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 8% e corada com nitrato de prata. Após a confirmação, foi realizada a extração do DNA plasmidial de oito colônias contendo o inserto, utilizando o protocolo QiaPrep (Qiagen). Este DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o *kit Big Dye terminator*, o iniciador reverso M13 e entre 300 e 500 ng de DNA plasmidial. Para o sequenciamento foi utilizado o sequenciador *ABI 3500 XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos na imuno-histoquímica foram analisados pelo teste  $\chi^2$ . Os dados normalizados da qPCR foram analisados pelo teste *Man Whitney*. A análise de correlação entre os dados de imuno-histoquímica e qPCR foi feita pelo coeficiente de correlação de Spearman. Os dados de metilação dos grupos foram avaliados pelo teste *Kruskal-Wallis*. Todas as análises estatísticas foram feitas no programa Graphpad Prism v5.0 (GraphPad Software).

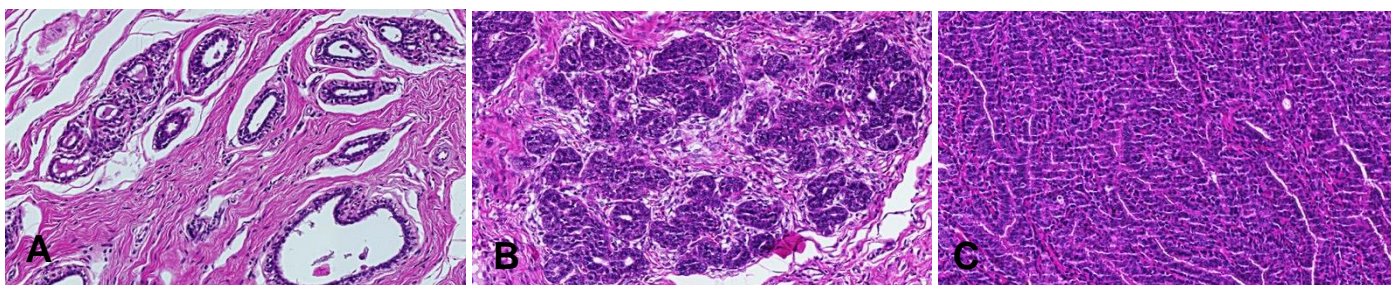
## 5 RESULTADOS

### 5.1 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICA

Após a avaliação histológica, as amostras foram divididas em grupos de mamas normais, tumores benignos e tumores malignos (FIGURA 11). Os dados referentes à classificação histológica, tamanho, presença de metástase à distância ou para linfonodos, classificação TNM e escore imuno-histoquímico estão relacionados na TABELA 1.

Todos os tumores malignos incluídos no trabalho apresentavam metástase, sendo cinco (5) para linfonodo, três (3) à distância e para linfonodos e uma (1) à distância, sem ser observada a colonização de células neoplásicas em linfonodo regional. Quanto à classificação histológica, os tipos de tumores malignos encontrados foram: o adenocarcinoma papilífero e o sólido. Todos os tumores benignos foram classificados como adenomas.

FIGURA 11. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DAS AMOSTRAS.



Coloração H&E, 10X. (A) Glândula mamária normal. (B) Tumor mamário benigno (adenoma). (C) Tumor mamário maligno (adenocarcinoma sólido). FONTE: O autor.

TABELA 1. DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS TUMORES MAMÁRIOS.

<b>Variáveis</b>	<b>Tumores benignos (n=8)</b>	<b>Tumores malignos (n=9)</b>
<b><i>Tipo histológico</i></b>		
Adenoma	8(100%)	-
Adenocarcinoma sólido	-	4 (45,5%)
Adenocarcinoma papilífero	-	5 (55,5%)
<b><i>Tamanho</i></b>		
	<1,5cm	>3cm
<b><i>Metástase à distância</i></b>		
	0	4 (45,5%)
<b><i>Metástase para linfonodo</i></b>		
	0	8 (88,9%)
<b><i>Classificação TNM</i></b>		
Grau I	8 (100%)	0
Grau II	0	0
Grau III	0	5 (55,5%)
Grau IV	0	4 (45,5%)
<b><i>Escore imuno-histoquímica</i></b>		
0	0	6 (66,6%)
2-4	0	3 (33,4%)
5-8	8 (100%)	0

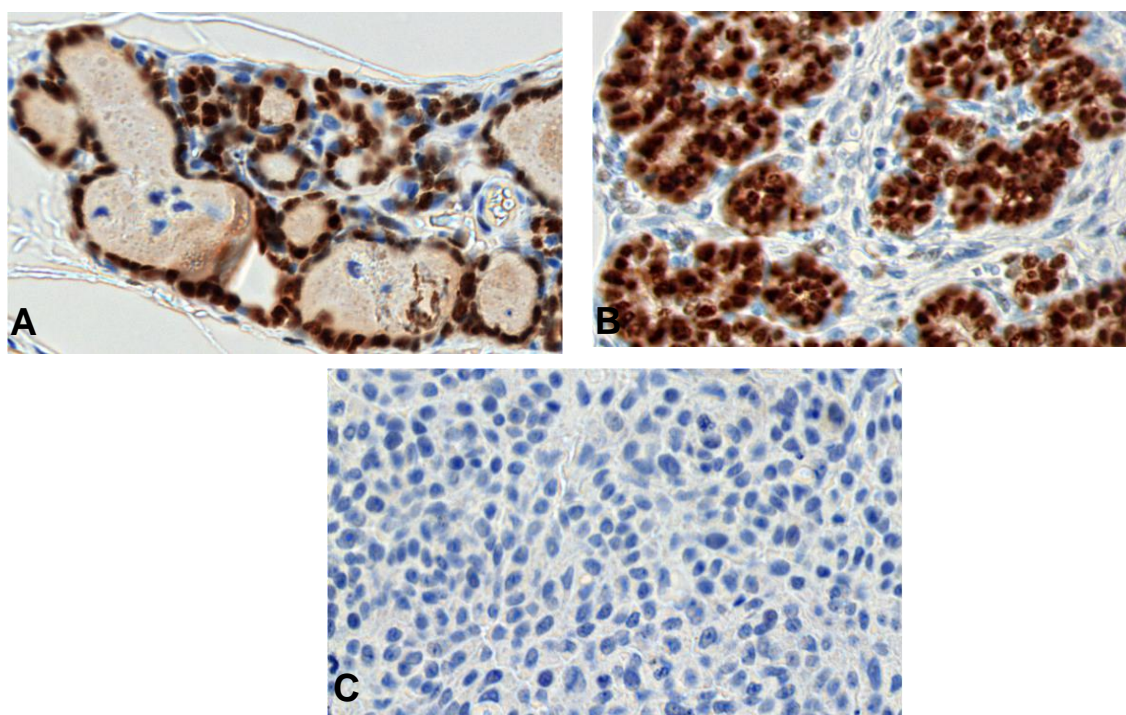
Na TABELA 3 os três grupos tiveram suas amostras classificadas como RE $\alpha$  positiva ou RE $\alpha$  negativa de acordo com a imuno-histoquímica, e foram avaliados pelo teste de  $X^2$ . Observa-se uma expressão significativamente menor ( $p=0,0037$ ) do RE $\alpha$  no grupo dos tumores malignos quando comparado aos outros dois grupos. As amostras de tumores benignos bem como o grupo controle, receberam escore maior ou igual a 5, mostrando uma moderada a elevada expressão de RE $\alpha$ . Já as amostras de tumores malignos apresentaram uma baixa ( $n=3$ ) ou nula ( $n=6$ ) expressão de RE $\alpha$  (FIGURA 12).

TABELA 3. STATUS DO RE $\alpha$  NAS AMOSTRAS DE MAMA NORMAL, TUMORES BENIGNOS E MALIGNOS

Grupo	RE $\alpha$ negativo	RE $\alpha$ positivo
Mama normal (controle)	0	4 (100%)
Tumores benignos	0	8(100%)
Tumores malignos	6 (66,6%)	3(33,4%)

\*Os dados foram analisados pelo teste  $\chi^2$ ;  $p=0,0037$

FIGURA 12. IMUNO-HISTOQUÍMICA DO RECEPTOR DE ESTRÓGENO  $\alpha$ .



Na mama normal (A) e no tumor benigno (B) observa-se marcação em marrom do núcleo das células acinares e ductais, evidenciando a presença do RE $\alpha$ . O tumor maligno (C) não apresenta reatividade para RE $\alpha$ , sendo negativo para este receptor.

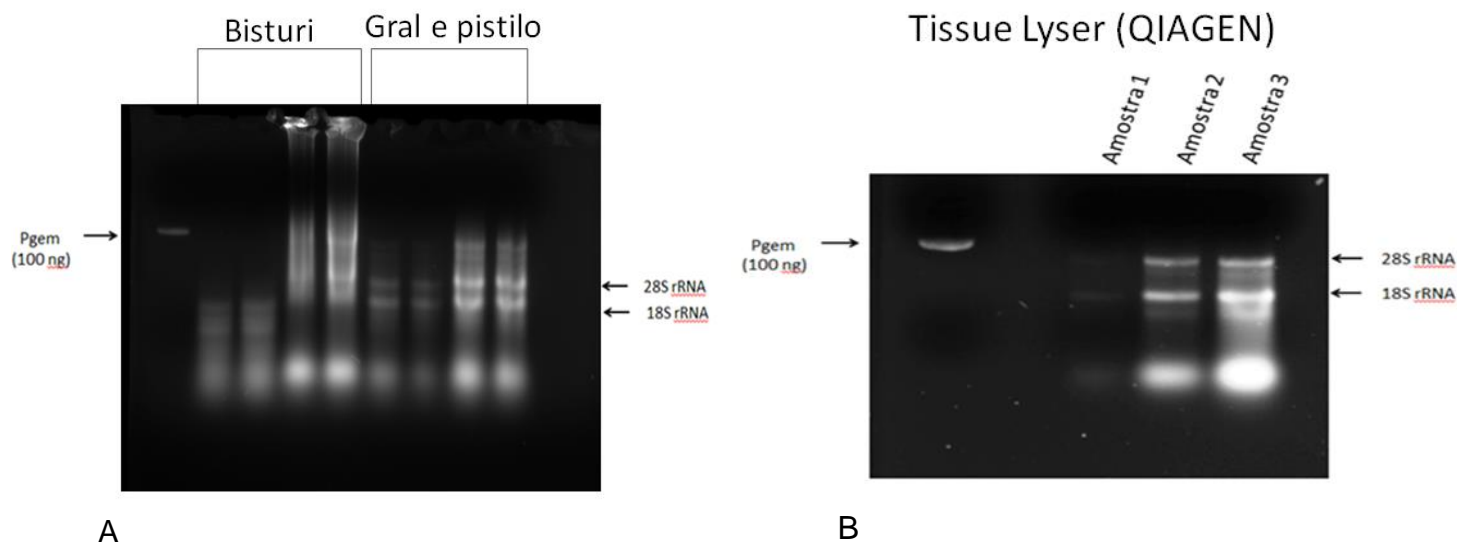
## 5.2 EXPRESSÃO RELATIVA DE mRNA DO GENE *ESR1*

### 5.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Após a extração, o RNA das amostras foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%. Ao comparar os métodos de extração de RNA (FIGURA 13) observou-se que a extração utilizando o equipamento Tissue Lyzer II (QIAGEN) apresentou menor degradação das amostras, sendo o método escolhido para este trabalho. Na

FIGURA 13B a amostra 1 possui menos de 100 ng/μL, sendo descartada do trabalho, pois não havia quantidade necessária de RNA para realizar a síntese de cDNA da forma padronizada. As amostras 2 e 3 apresentam quantidade adequada de RNA.

FIGURA 13. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RNA

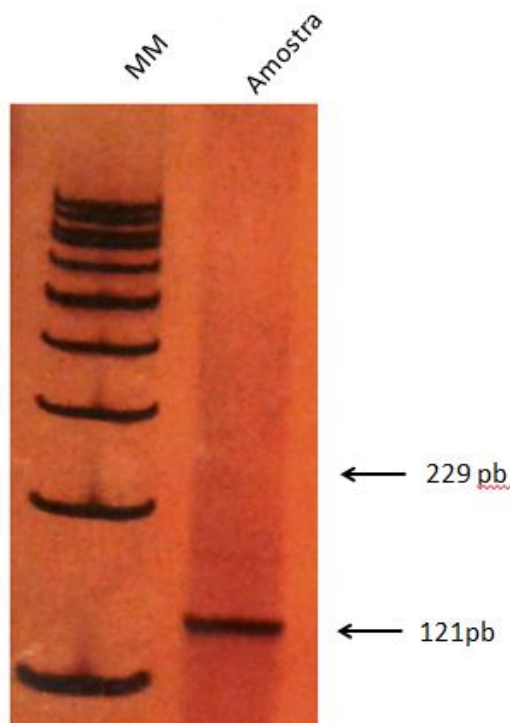


Eletroforese de amostras de RNA em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Na figura A estão representadas duplicatas de amostras de RNA extraídos a partir da clivagem com bisturi e a partir da maceração com nitrogênio líquido com gral e pistilo. Na imagem B estão representadas três amostras diferentes de RNA extraído utilizando o equipamento Tissue Lyser II. pGem: marcador de quantidade (100ng). FONTE: O autor.

Foi possível avaliar, a partir da eletroforese, a qualidade do RNA e estimar sua quantidade, mais precisamente determinada pelo equipamento Nanodrop. As amostras com elevada degradação de RNA ou com quantidade insuficiente foram excluídas do estudo.

Uma reação de PCR utilizando o cDNA sintetizado a partir do RNA (RT-PCR) foi realizada para o gene constitutivo *RPS18* afim de confirmar a eficácia da síntese e a ausência de contaminação com DNA genômico da amostra. Na FIGURA 14 observa-se ausência de banda na altura de 229 pb, indicando que o material está livre de contaminação por DNA genômico.

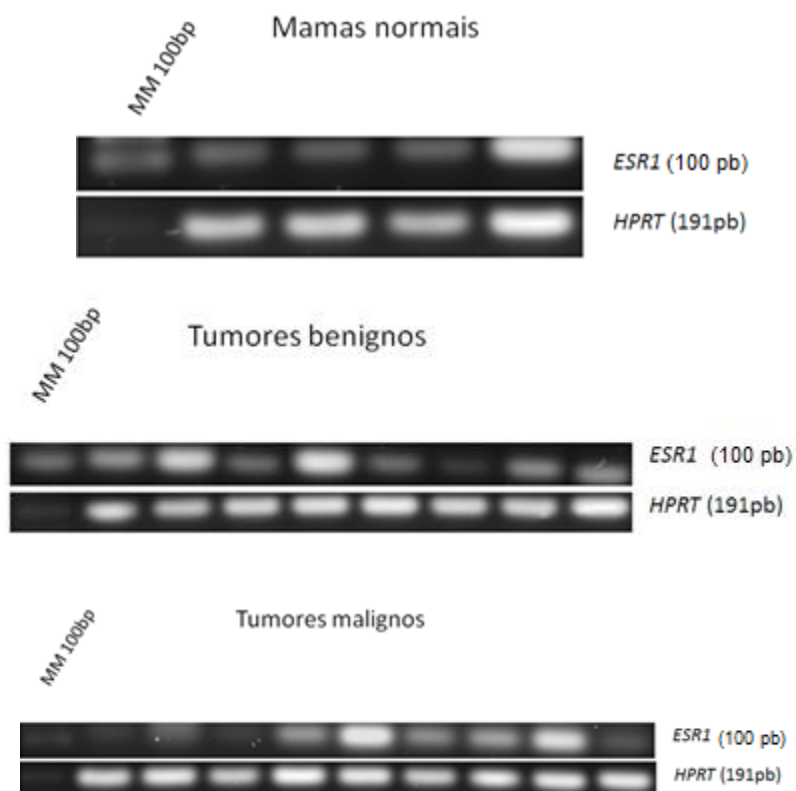
FIGURA 14. ELETROFORESE DE RT-PCR EM GEL DE POLIACRILAMIDA.



Eletroforese de produto de RT-PCR em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Marcador de massa molecular (MM) de 100 pb. A banda esperada: 121 pb. FONTE: O autor.

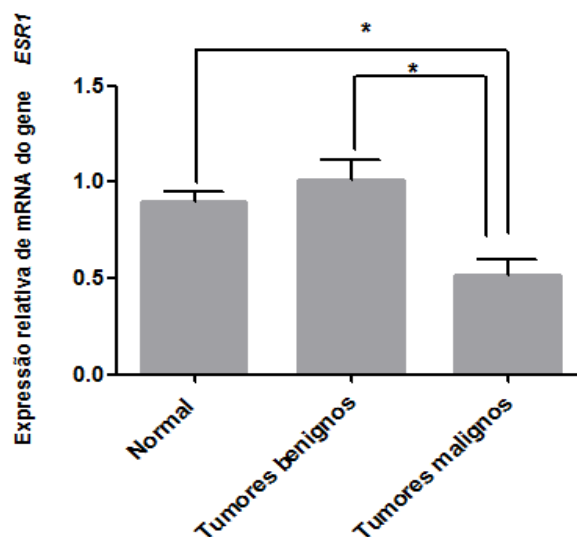
### 5.2.2 RT-PCR e RT-qPCR

A expressão do gene *ESR1* foi investigada através da RT-PCR, utilizando como constitutivo o gene *HPRT*. Nos três grupos a intensidade dos fragmentos obtidos do gene *HPRT* é homogênea, sugerindo este gene como um bom controle endógeno (FIGURA 15). Já os fragmentos do gene *ESR1* apresentaram variação de intensidade entre os grupos, sobretudo quanto ao grupo de tumores malignos, menos intensos que os outros dois grupos, sugerindo menor expressão deste gene nos tumores malignos.

FIGURA 15. RT-PCR PARA OS GENES *HPRT* E *ESR1*

RT-PCR para o gene constitutivo *HPRT* (191 pb) e o gene alvo *ESR1* (121 pb) realizada em todas as amostras. Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% e corados com brometo de etídio. MM: marcador de massa molecular (100pb). FONTE: O autor.

Para quantificar a expressão relativa de mRNA nas amostras foi realizada a técnica de RT-qPCR, confirmando uma menor expressão do gene *ESR1* nos tumores malignos (expressão relativa de mRNA de 0,512) quando comparados com as mamas normais e com os tumores benignos (expressão relativa de mRNA de 0,089 e 1,0, respectivamente;  $p < 0,05$ ) (FIGURA 16).

FIGURA 16. GRÁFICO DE EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *ESR1*

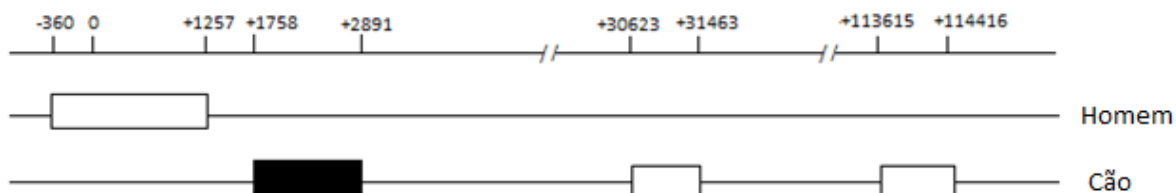
A expressão relativa de mRNA do gene *ESR1* é menor ( $p < 0,05$ ) nas amostras de tumores malignos (expressão relativa de 0,52) em relação aos tumores benignos (expressão 0,89) e às mamas normais (expressão 1,0). FONTE: O autor.

Embora haja uma correlação forte e positiva entre os dados de imunohistoquímica e qPCR ( $\rho = 0,725$  e  $p < 0,05$ ), três amostras negativas para o receptor de estrogênio apresentaram uma expressão relativa de mRNA semelhante às do escore 2, evidenciando uma divergência entre o escore de imunohistoquímica e a expressão relativa de mRNA.

### 5.3 SEQUENCIAMENTO DA ILHA CpG

#### 5.3.1 Análise *in silico*

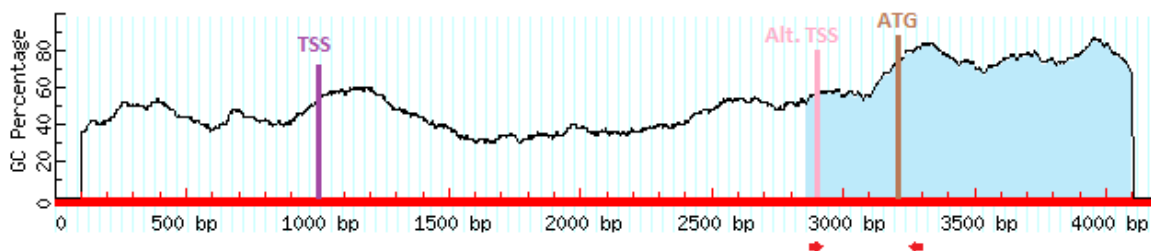
A busca por ilhas de CpG (CGI) no gene *ESR1* em caninos revelou apenas ilhas intragênicas, não sendo observada CGI na região promotora do gene (FIGURA 17). No gene humano observa-se uma ilha na região promotora se estendendo para regiões intrônicas. Já no gene canino as múltiplas CGIs encontradas estão no corpo do gene, não havendo associação com a região promotora.

FIGURA 17. REPRESENTAÇÃO DAS ILHAS DE CpG DO GENE *ESR1* NO HOMEM E NO CÃO

Análise da presença de CGIs no gene *ESR1* em cães comparada com o homem. Retângulos: ilhas de CpG. Em preto esta representada a região avaliada nesse estudo. FONTE: O autor.

No cão, a ilha mais próxima ao sítio do início de transcrição se encontra entre as posições +1758 e +2891, contendo 1133 pb. Esta ilha se estende do primeiro ao segundo íntron, englobando o sítio de início de tradução (ATG) e um possível sítio alternativo de início de transcrição (FIGURA 18). O fragmento amplificado pelos iniciadores mede 421 pb e envolve estas regiões do gene.

FIGURA 18. REPRESENTAÇÃO DA ILHA DE CpG ESTUDADA.



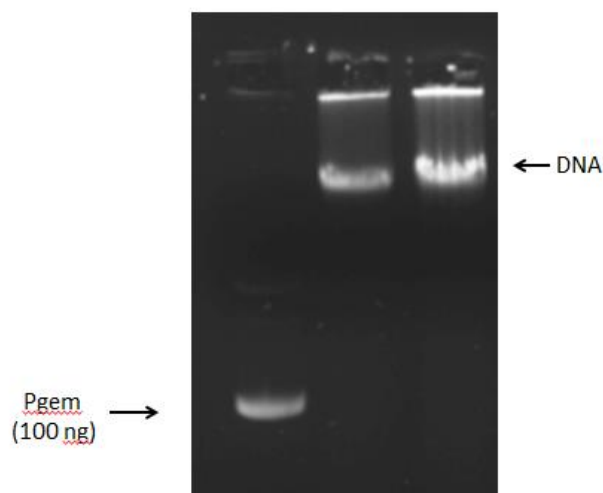
A ilha de CpG estudada (azul) está localizada a cerca de 2000 pb do TSS (TSS-roxo), não sendo observada ilha na região promotora do gene (1000 pb acima do TSS). As setas vermelhas representam os locais onde os iniciadores, universal e reverso, foram desenhados amplificando um fragmento de 421 pb que compreende um possível sítio de início de transcrição alternativo (Alt. TSS- rosa) e a região de início de tradução (ATG- marrom). FONTE: O autor.

### 5.3.2 Extração de DNA, amplificação e clonagem da ilha de CpG

A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo de fenol/clorofórmio e sua qualidade foi avaliada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. A quantidade de DNA foi mais precisamente determinada pelo equipamento Nanodrop. Na FIGURA 19, ambas as amostras possuem quantidade e qualidade adequadas para o estudo, uma vez que a intensidade da banda de DNA quando comparada com a do

pGem revela elevada quantidade de DNA e não se observa grande degradação das amostras. Todas as amostras tiveram o DNA submetido a esta avaliação e apenas aquelas com boa quantidade e qualidade de DNA foram mantidas no estudo

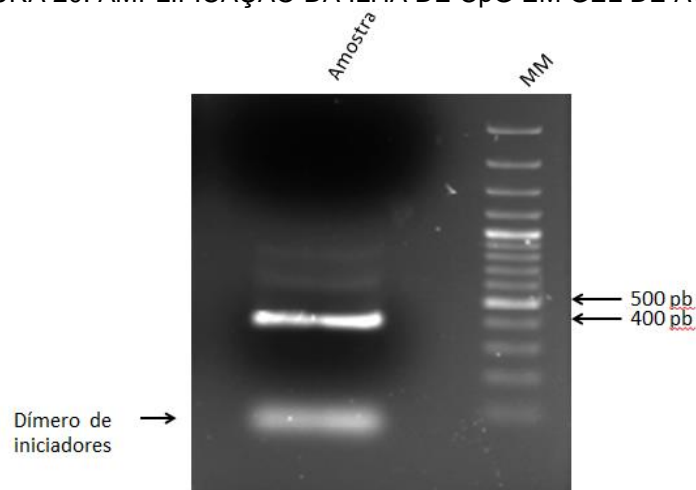
FIGURA 19. ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE.



Gel de agarose 0,8%, submetido a eletroforese e corado com brometo de etídio. pGem: marcador de quantidade (100ng). FONTE: O autor.

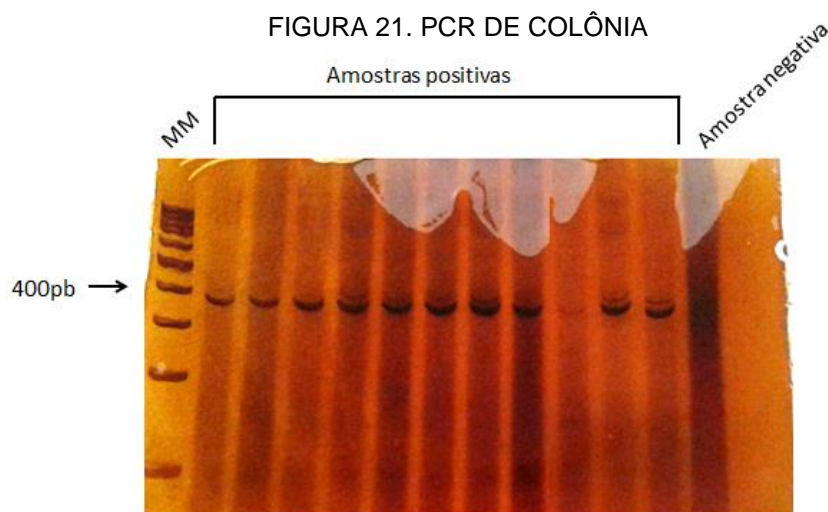
Após a padronização (FIGURA 20), prosseguiu-se ao protocolo de purificação do fragmento do gel, sua ligação ao vetor e clonagem em *E. coli* DH10B.

FIGURA 20. AMPLIFICAÇÃO DA ILHA DE CpG EM GEL DE AGAROSE



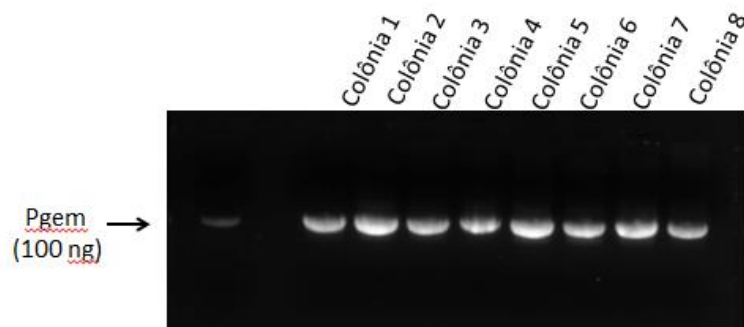
A ilha de CpG foi amplificada por PCR e aplicada em gel de agarose 1% , submetido a eletroforese e corado com brometo de etídio. O marcador de massa molecular (MM) de 100 pb indica que a banda está entre 500 e 400 pb ou seja, corresponde à banda de interesse de 421 pb. Uma banda de pouca intensidade localizada abaixo de 100 pb representa dímeros dos iniciadores. FONTE: O autor.

A seleção das colônias por  $\alpha$  complementação foi seguida por confirmação da presença do fragmento por PCR de colônia (FIGURA 21), extração de DNA plasmidial de oito colônias (FIGURA 22) e o sequenciamento.



Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Produtos de uma PCR de colônia. MM: marcador de massa molecular 100 pb. FONTE: O autor

FIGURA 22. DNA PLASMIDIAL EM GEL DE AGAROSE



Os fragmentos observados neste gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio correspondem ao DNA plasmidial extraído de oito colônias positivas para o PCR de colônia. pGem: marcador de quantidade (100ng). Este procedimento foi realizado em todas as amostras. FONTE: O autor.

### 5.3.3 Sequenciamento da ilha de CpG

As sequências obtidas do DNA clonado foram alinhadas com a sequência disponível no banco de dados (GenBank), utilizando o programa *Clustal Omega*

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Devido ao tratamento com bissulfito todas as citosinas não metiladas foram convertidas em timina enquanto que as metiladas permaneceram citosinas. Assim, realizando o alinhamento das sequências pode-se encontrar quais CpGs estavam metilados e quais não estavam em cada colônia de cada amostra (FIGURA 23).

FIGURA 23. ALINHAMENTO DO SEQUENCIAMENTO

```

sequencia_base -----GAGTG
42543 ATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGC-GGGAATTCGATTAGTG
42547 -----CGGCCGCGGAATTCGATTAGT
42542 ATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGG-GAATTCGATTAGTG
42545 ATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAAATTCGATTAGTG
42549 ATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGG-GAATTCGATTAGTG
42544 ATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGG-GAATTCGATTAGTG
42546 ATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGG-GAATTCGATTAGTG
42548 ATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGG-GAATTCGATTAGTG

```

```

sequencia_base ATGTTTAAACCAATGTCAGTGCAAGGCAACAGCCCCTGGCCGCTTCCAGCACCTTTGTA
42543 ATGTTTAAATTAATGTTAGTGTAAGGTAATAGTTTTTGGTTGGTTTTAGTATTTTTGTA
42547 GATGTTTAAATTAATGTTAGTGTAAGGTAATAGTTTTTGGTTGGTTTTAGTATTTTTGTA
42542 ATGTTTAAATTAATGTTAGTGTAAGGTAATAGTTTTTGGTTGGTTTTAGTATTTTTGTA
42545 ATGTTTAAATTAATGTTAGTGTAAGGTAATAGTTTTTGGTTGGTTTTAGTATTTTTGTA
42549 ATGTTTAAATTAATGTTAGTGTAAGGTAATAGTTTTTGGTTGGTTTTAGTATTTTTGTA
42544 ATGTTTAAATTAATGTTAGTGTAAGGTAATAGTTTTTGGTTGGTTTTAGTATTTTTGTA
42546 ATGTTTAAATTAATGTTAGTGTAAGGTAATAGTTTTTGGTTGGTTTTAGTATTTTTGTA
42548 ATGTTTAAATTAATGTTAGTGTAAGGTAATAGTTTTTGGTTGGTTTTAGTATTTTTGTA

```

```

sequencia_base ATGCATATGAGCGCCGGAGACCGGTACTTAAAGTTGGAGACCGCGAGCCGGAGTTGGCT
42543 ATGTATGTGAGTGTGGGAGATTGGTATTTAAAGTTGGAGATGTGGAGTGGGAGTTGGTT
42547 ATGTATATGAGTGTGGGAGATTGGTATTTAAAGTTGGAGATGTGGAGTGGGAGTTGGTT
42542 ATGTATATGAGTGTGGGAGATTGGTATTTAAAGTTGGAGATGTGGAGTGGGAGTTGGTT
42545 ATGTATATGAGTGTGGGAGATTGGTATTTAAAGTTGGAGATGTGGAGTGGGAGTTGGTT
42549 ATGTATATGAGTGTGGGAGATTGGTATTTAAAGTTGGAGATGTGGAGTGGGAGTTGGTT
42544 ATGTATATGAGTGTGGGAGATTGGTATTTAAAGTTGGAGATGTGGAGTGGGAGTTGGTT
42546 ATGTATATGAGTGTGGGAGACTGGTATTTAAAGTTGGAGATGTGGAGTGGGAGTTGGTT
42548 ATGTATATGAGTGTGGGAGATTGGTATTTAAAGTTGGAGATGTGGAGTGGGAGTTGGTT

```

```

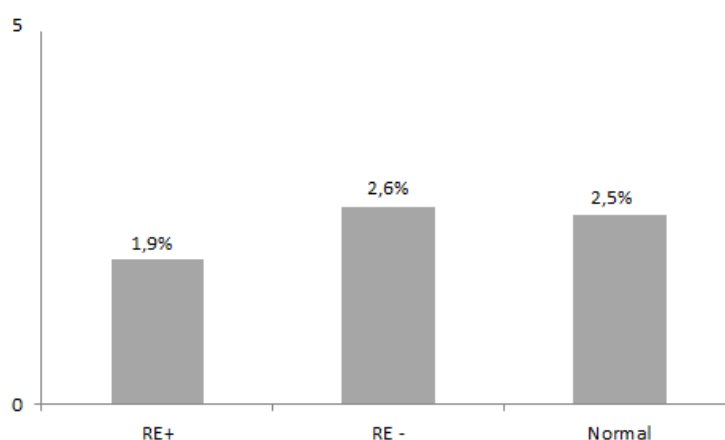
sequencia_base GAGCGCCCGGCAGCCCGCAGCCCAGCGCGCTCCCGGGACCGCCCGGCTCCCG
42543 GAGTGTCTTGGTAGTTGGTAGTTTGTAGTGTGGTTTGTGGGATGTGTGGGTTTGG
42547 GAGTGTCTTGGTAGTCTGGTAGTTTGTAGTGTGGTTTGTGGGATGTGTGGGTTTGG
42542 GAGTGTCTTGGTAGTTGGTAGTTTGTAGTGTGGTTTGTGGGATGTGTGGGTTTGG
42545 GAGTGTCTTGGTAGTTGGTAGTTTGTAGTGTGGTTTGTGGGATGTGTGGGTTTGG
42549 GAGTGTCTTGGTAGTTGGTAGTTTGTAGTGTGGTTTGTGGGATGTGTGGGTTTGG
42544 GAGTGTCTTGGTAGTTGGTAGTTTGTAGTGTGGTTTGTGGGATGTGTGGGTTTGG
42546 GAGTGTCTTGGTAGTTGGTAGTTTGTAGTGTGGTTTGTGGGATGTGTGGGTTTGG
42548 GAGTGTCTTGGTAGTTGGTAGTTTGTAGTGTGGTTTGTGGGATGTGTGGGTTTGG

```



grupo RE $\alpha$  positivo foi composto pelas amostras com escore maior que zero na imunohistoquímica, ou seja, todas as amostras de tumores benignos e três amostras de tumores malignos (duas com escore dois e uma de escore quatro). O grupo RE $\alpha$  negativo foi composto pelas seis amostras de tumores malignos com escore zero. As mamas normais continuaram formando um grupo a parte, o grupo controle. Na FIGURA 24 apresenta-se o percentual de metilação global de cada um destes grupos, não sendo observada diferença significativa entre eles ( $p>0,05$ ).

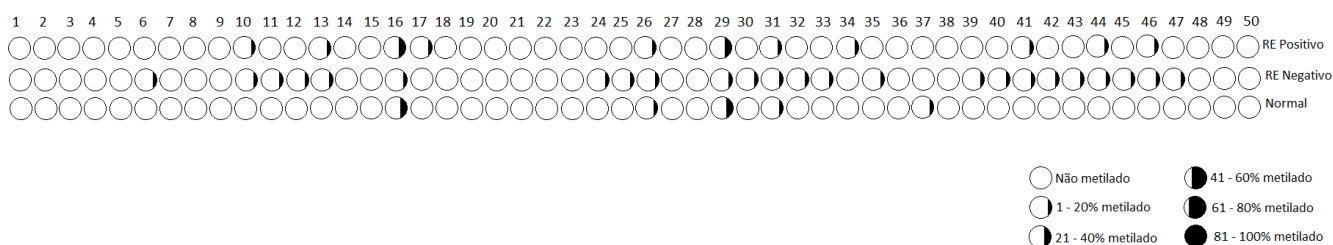
FIGURA 24. GRÁFICO DE METILAÇÃO GLOBAL DOS GRUPOS.



O gráfico apresenta o percentual de CpGs metilados em cada grupo. Todos os grupos apresentaram uma reduzida taxa de metilação da CGI. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ )  
 FONTE: O autor.

A avaliação individual de cada CpG também foi semelhante entre os grupos (FIGURA 25). Devido aos CpGs 16 e 29 apresentarem maior percentual de metilação que os demais nos grupos RE $\alpha$  positivo (25% e 37,5% respectivamente) e controle (31,25% em ambos CpGs), foi pesquisado por meio do programa *MatInspector* (<https://www.genomatix.de>) se a região destes CpGs correspondia ao sítio de ligação de fatores de transcrição, porém não foi encontrado nenhum candidato. Os demais CpGs ou estão desmetilados ou possuem um percentual de metilação menor que 20%.

FIGURA 25. PERCENTUAL DE METILAÇÃO DE CADA CpG



O fragmento de ilha avaliado possui 50 CpGs, representados na figura pelos círculos. Os círculos brancos correspondem à CpGs desmetilados em todas as colônias de todas as amostras do grupo. Os círculos parcialmente pintados de preto se referem à porcentagem de metilação do CpG, de acordo com a legenda no canto inferior direito da figura.. FONTE: O autor.

## 6.DISCUSSÃO

O tumor de mama é o de maior ocorrência em fêmeas caninas não castradas (SORENMO et al., 2011). A gravidade desta doença e seu prognóstico são inferidos por meio de dados clínico-patológicos. Embora o objetivo deste trabalho não tenha sido realizar uma avaliação de dados clínico-patológicos, alguns dados como o tamanho, classificação histológica e estadiamento TMN para os tumores mais agressivos estão de acordo com o encontrado na literatura (CASSALI et al., 2014). Todos os tumores malignos deste estudo apresentaram tamanho maior que 3 cm, estadio III ou IV no sistema TNM e foram histologicamente classificados como adenocarcinoma sólido ou papilífero, ou seja, apresentavam características de tumores mais agressivos. Outra característica que a maioria dos tumores malignos deste trabalho também apresentaram foi a ausência de expressão do receptor de estrógeno  $\alpha$ .

A importância do receptor de estrógeno é bem estabelecida no início e progressão do câncer de mama (YUE et al., 2013). Muitos trabalhos têm demonstrado uma tendência de perda de expressão do RE $\alpha$  em tumores de mama caninos mais agressivos (ALENZA et al., 2000; DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005; MAINENTI et al., 2014; MILLANTA et al., 2005). Os resultados do ensaio de imuno-histoquímica obtidos neste trabalho estão de acordo com o descrito na literatura, uma vez que os

carcinomas apresentaram menor expressão proteica do que tumores benignos e glândula mamária normal. Com relação à expressão de mRNA do gene *ESR1*, os resultados relatados na literatura são controversos. Alguns estudos (KLOPFLEISCH; KLOSE; GRUBER, 2010; LAMP et al., 2013) não encontraram qualquer diferença na expressão de mRNA do gene *ESR1* entre glândula mamária normal, tumor benigno e carcinoma mamário primário ou metastático, já outro trabalho relatou menor expressão de mRNA em carcinomas mamários quando comparados a glândula mamária normal, mas não quando comparados com tumores benignos (SPOERRI et al., 2015). Nosso estudo, por sua vez, revelou uma menor expressão do transcrito em carcinomas quando comparados com adenomas e glândulas normais, um achado também descrito na literatura (MOHR et al., 2016).

Como esperado, o nível de transcrito do *ESR1* está de acordo com a expressão da proteína RE $\alpha$ . Entretanto, três dos seis carcinomas que apresentaram escore zero para RE $\alpha$  expressaram mRNA no mesmo nível que os de escore 2. Esta inconsistência foi também descrita por KIM e colaboradores (2014), que encontraram expressão de mRNA em tumores RE $\alpha$  negativos. Dados similares a respeito do RE $\alpha$  foram relatados em câncer de mama (IWAO et al., 2000) e de ovário (KOSTI et al., 2016) em mulher. Esta divergência entre expressão de transcrito e proteína tem sido atribuída ao ensaio de imuno-histoquímica (KIM et al., 2014; KLOPFLEISCH; KLOSE; GRUBER, 2010) devido às variações na técnica como o clone do anticorpo, o tempo de fixação do tecido, entre outros (PENA et al., 2014). Entretanto, outros fatores como regulação pós-transcricional devem ser considerados.

Um mecanismo envolvido na regulação pós-transcricional é a ação de microRNAs (miRNAs). miRNA é um RNA não codificante que reconhece uma sequência alvo na região 3'UTR do mRNA e o degrada ou reprime sua tradução (BARTEL, 2004). Alguns miRNAs como o miR18a, miR22 e miR221 vem sendo implicados na regulação do RE $\alpha$  por meio de sua interação com o mRNA, impedindo a tradução desta proteína (CALVANO FILHO et al., 2014; DI LEVA et al., 2010; PANDEY; PICARD, 2009). No câncer de mama em mulher esses miRNAs tem apresentado maior expressão em tumores RE $\alpha$  negativos, sugerindo um papel de inibidor da tradução da proteína RE $\alpha$  (CALVANO FILHO et al., 2014; PETROVIC et al., 2016; XIONG et al.,

2010). Muitos miRNAs já foram detectados em tecidos caninos, incluindo os miRNAs citados acima (BOGGS et al., 2008; GENINI et al., 2014; QIN et al., 2013). Assim, a interferência causada pelo miRNA deve ser considerada como uma hipótese para explicar a diferença entre expressão do transcrito e da proteína RE $\alpha$ . Uma vez que miRNAs que tem como alvo RE $\alpha$  estejam superexpressos, o tumor pode apresentar mRNA mas não a proteína, sendo classificado como RE $\alpha$  negativo.

Quando o gene do receptor de estrógeno  $\alpha$  foi testado para a pesquisa de ilhas de CpG foram encontradas três ilhas no corpo do gene, mas nenhuma ilha no promotor, diferente do gene *ESR1* humano. O genoma do cão foi descrito com maior densidade de CGI do que muitos mamíferos como o humano, o camundongo, vacas, cavalos, ovelhas e cabras (BARAZANDEH et al., 2016; HAN; ZHAO, 2009). Entretanto, o número de CGIs associadas ao promotor no genoma do cão é menor do que nos humanos (HAN; ZHAO, 2009), uma característica que pode ser exemplificada pela distribuição das CGIs do gene *ESR1*. O maior número de CGIs encontradas no genoma do cão pode ser parcialmente atribuída à elevada taxa de recombinação A/T para C/G entre os alelos, o que parece ser mais intensa na vizinhança das ilhas CpG, provocando um processo de retro alimentação. Assim, a menor associação de CGIs a região promotora pode ser uma tentativa de evitar recombinação em elementos funcionais importantes (AUTON et al., 2013).

Sabe-se que a hipermetilação das CGIs associadas ao promotor está relacionada com a repressão da expressão gênica, entretanto o papel das CGIs intragênicas permanece desconhecido (BIRD, 2002). Alguns estudos demonstraram que a hipermetilação de CGIs localizadas no primeiro (BRENET et al., 2011; SAKAMOTO et al., 2015) e no terceiro éxons (SHIMIZU et al., 2016) está intrinsecamente relacionada com o silenciamento gênico, enquanto outros autores associam a repressão da transcrição com a hipometilação de CGIs intragênicas (APORNTWAN et al., 2011; LEE et al., 2014; SHANN et al., 2008). O silenciamento da transcrição por hipometilação da CGI intragênica está relacionada à perda de repressão de elementos repetitivos, como os retrotransposons. Na ausência da metilação esses elementos são amplificados e acabam por interromper o processamento do mRNA do gene que o abrigava (APORNTWAN et al., 2011). De

uma forma semelhante, quando um promotor alternativo associado a CGI originalmente metilado se torna hipometilado, permite a transcrição de TSSs alternativos e pode inclusive alterar os níveis de expressão das isoformas da proteína (BLACKBURN et al., 2015).

A atividade do provável TSS alternativo não foi avaliada neste estudo, portanto, continua desconhecido se a metilação pode regular sua expressão. Entretanto, nós não encontramos diferença significativa no *status* de metilação entre os grupos controle, ER $\alpha$  positivo ou ER $\alpha$  negativo, o que sugere que caso este promotor alternativo esteja relacionado com a carcinogênese mamária ele provavelmente não é regulado por metilação do DNA.

O sequenciamento da CGI neste estudo mostrou uma metilação discretamente menor (1,9%) em amostras RE $\alpha$  positivas e surpreendentemente, os grupos controle e RE $\alpha$  negativo apresentaram virtualmente a mesma taxa de metilação (2,5 e 2,6% respectivamente). Este resultado inesperado pode ser atribuído a maior quantidade de células estromais presentes nas amostras de glândula mamária normal, uma vez que estas células não expressam RE $\alpha$  e provavelmente apresentam um epigenoma diferente das células do parênquima glandular, já que o epigenoma pode ser diferente entre os tipos celulares (JONES, 2012).

A ausência de níveis diferentes de metilação entre os grupos que expressam abundantemente RE $\alpha$  e os que não expressam esta proteína sugere que no tumor de mama canino o gene *ESR1* não é regulado pela metilação de DNA. No humano entretanto, um dos mecanismos regulatórios deste gene é a metilação de CGI (OTTAVIANO et al., 1994). Muitos estudos com câncer de mama em mulher revelaram uma associação entre a metilação do promotor do gene *ESR1* e baixa expressão da proteína RE $\alpha$ , principalmente nos tumores triplo negativos (LI; RONG; IACOPETTA, 2006; PRABHU et al., 2012). Esta correlação foi encontrada também entre a expressão tumoral da proteína RE $\alpha$  e a metilação do promotor do gene *ESR1* em células circulantes de pacientes com câncer de mama (MARTÍNEZ-GALÁN et al., 2014).

Devido a muitas semelhanças entre o câncer em cães e em humanos, como a ocorrência espontânea, o comportamento biológico e as vias moleculares, o cão vem sendo considerado um modelo promissor para o estudo do câncer de mama

(RICCARDO et al., 2015; ROWELL; MCCARTHY; ALVAREZ, 2011; UVA et al., 2009). Estas similaridades também propiciaram o desenvolvimento de estudos na veterinária baseados em biomarcadores e terapêuticas bem estabelecidas para o câncer humano (KARAYANNOPOULOU; LAFIONIATIS, 2016). Entretanto ainda existem diferenças entre estas duas espécies, como a apresentada neste trabalho, que devem ser consideradas quando do uso do cão como modelo experimental, sobretudo em estudos que tem como alvo o gene *ESR1*.

Muitos trabalhos, por exemplo, têm utilizado agentes desmetilantes para reverter a metilação do gene *ESR1* e restaurar a expressão do RE $\alpha$  em câncer de mama de mulher (SHARMA et al., 2005). Entretanto, de acordo com o observado no nosso estudo, tal resultado não seria esperado para o câncer de mama canino, uma vez que este gene não se mostrou ser regulado por metilação do DNA. Neste caso portanto, o cão não seria um bom modelo experimental.

Dessa forma, é importante considerar as particularidades das espécies quando da utilização do cão para modelo experimental ou quando da transposição de conceitos diagnósticos, prognósticos ou terapêuticos da medicina para a medicina veterinária.

## 7.CONCLUSÕES

Concluindo, este estudo revelou menor expressão do mRNA do *ESR1* e da proteína RE $\alpha$  em tumores caninos mais agressivos. Não foi observada diferença de metilação do gene *ESR1* entre as amostras que expressam e as que não expressam RE $\alpha$ . De acordo com estes resultados pode-se inferir que provavelmente o gene *ESR1* não é regulado por metilação de DNA no câncer de mama canino.

## REFERÊNCIAS

ALENZA, M. D. P. et al. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. **The Journal of small animal practice**, v. 41, n. 7, p. 287–291, 2000.

APORNTEWAN, C. et al. Hypomethylation of intragenic LINE-1 represses transcription in cancer cells through AGO2. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.

AUTON, A. et al. Genetic Recombination Is Targeted towards Gene Promoter Regions in Dogs. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 12, p. 1–9, 2013.

BAILEY, S. T.; WESTERLING, T.; BROWN, M. Loss of estrogen-regulated microRNA expression increases HER2 signaling and is prognostic of poor outcome in luminal breast cancer. **Cancer Research**, v. 75, n. 2, p. 436–445, 2015.

BARAZANDEH, A. et al. Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. **Czech Journal of Animal Science**, v. 61, n. 11, p. 487–495, 2016.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, p. 6–21, 2002.

BJÖRNSTRÖM, L.; SJÖBERG, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 19, n. 4, p. 833–842, 2005.

BLACKBURN, J. et al. Damage-inducible intragenic demethylation of the human TP53 tumor suppressor gene is associated with transcription from an alternative intronic promoter. **Molecular Carcinogenesis**, v. 1951, n. December 2015, p. 1940–1951, 2015.

BOCCHINFUSO, W. P.; KORACH, K. S. Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 2, n. 4, p. 323–34, 1997.

BOGGS, R. M. et al. MicroRNA expression in canine mammary cancer. **Mammalian Genome**, v. 19, n. 7–8, p. 561–569, 2008.

BRENET, F. et al. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

CALVANO FILHO, C. M. C. et al. Triple-negative and luminal A breast tumors: differential expression of miR-18a-5p, miR-17-5p, and miR-20a-5p. **Tumor Biology**, v. 35, n. 8, p. 7733–7741, 2014.

CAO, J. The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics. **Biological Procedures Online**, v. 16, n. 1, p. 11, 2014.

CARROLL, J. S. et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. **Nat Genet**, v. 38, n. 11, p. 1289–1297, 2006.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the Diagnosis , Prognosis and Treatment

of Canine Mammary Tumors - 2013. v. 7, n. 2, p. 38–69, 2014.

CLARK, S. J. et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 15, p. 2990–2997, 1994.

DE LAS MULAS, J. M.; MILLÁN, Y.; DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Veterinary pathology**, v. 42, n. 2, p. 200–212, 2005.

DI LEVA, G. et al. MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor  $\alpha$  interactions in breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 10, p. 706–721, 2010.

DONNAY, I. et al. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 9, p. 1188–1194, 1995.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403–410, 1991.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143–153, 2004.

FILHO, J. C. O. et al. Estudo retrospectivo de 1 . 647 tumores mamários em cães. **Pesq. Vet. Bras**, v. 30, n. 2, p. 177–185, 2010.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **Journal of molecular biology**, v. 196, n. 2, p. 261–282, 1987.

GENINI, S. et al. Altered miRNA expression in canine retinas during normal development and in models of retinal degeneration. **BMC genomics**, v. 15, p. 172, 2014.

GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011.

HAN, L.; ZHAO, Z. Contrast features of CpG islands in the promoter and other regions in the dog genome. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 117–124, 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HERVOUET, E. et al. Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. **Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society**, v. 8, n. 3, p. 237–45, 2013.

ILLINGWORTH, R. S. et al. Orphan CpG Islands Identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 9, 2010.

INGTHORSSON, S.; HILMARSDOTTIR, B.; KRICKER, J. Context-Dependent Function of Myoepithelial Cells in Breast Morphogenesis and Neoplasia. p. 168–174, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.  
**INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016.** [s.l: s.n.].

IWAO, K. et al. Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- alpha and - beta Messenger RNA Expression in Breast Carcinoma by Real-Time Polymerase Chain Reaction. v. 89, n. 8, p. 1732–1738, 2000.

JEFFREY, S. S. Cancer biomarker profiling with microRNAs. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 400–401, 2008.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484–492, 2012.

KARAYANNOPOULOU, M.; LAFIONIATIS, S. Recent advances on canine mammary cancer chemotherapy : A review of studies from 2000 to date. p. 7–8, 2016.

KHAN, D.; ANSAR AHMED, S. The immune system is a natural target for estrogen action: Opposing effects of estrogen in two prototypical autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, p. 1–8, 2016.

KIM, N. H. et al. Evaluation of clinicopathological characteristics and oestrogen receptor gene expression in oestrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 151, n. 1, p. 42–50, 2014.

KLOPFLEISCH, R.; KLOSE, P.; GRUBER, A. D. The Combined Expression Pattern of BMP2, LTBP4, and DERL1 Discriminates Malignant From Benign Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology Online**, v. 47, n. 3, p. 446–454, 2010.

KOSTI, I. et al. Cross-tissue analysis of gene and protein expression in normal and cancer tissues. **Scientific reports**, v. 6, n. May, p. 24799, 2016.

KRÓLIK, M.; MILNEROWICZ, H. **The effect of using estrogens in the light of scientific research** *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2012.

KUIPER, G. G. et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 5925–30, 1996.

KUMAR, V. et al. Functional domains of the human estrogen receptor. **Cell**, v. 51, p. 941–951, 1987.

LAMP, O. et al. The metastatic potential of canine mammary tumours can be assessed by mRNA expression analysis of connective tissue modulators. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 1, p. 70–85, 2013.

LAO, V. V.; GRADY, W. M. Epigenetics and colorectal cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 12, p. 686–700, 2011.

LEE, R. C. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. v. 75, p. 843–854, 1993.

LEE, S.-M. et al. HBx induces hypomethylation of distal intragenic CpG islands required for active expression of developmental regulators. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 26, p. 9555–60, 2014.

LEV MAOR, G.; YEARIM, A.; AST, G. The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 5, p. 274–280, 2015.

LI, S.; RONG, M.; IACOPETTA, B. DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. **Cancer Letters**, v. 237, n. 2, p. 272–280, 2006.

LIN, S.; GREGORY, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nature Review Cancer**, v. 15, n. 6, p. 321–333, 2015.

LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, n. June, p. 834–838, 2005.

LUBAHN, D. B. et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 23, p. 11162–6, 1993.

MAINENTI, M. et al. Oestrogen- $\alpha$  and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. **Veterinary Journal**, 2014.

MARTÍNEZ-GALÁN, J. et al. ESR1 gene promoter region methylation in free circulating DNA and its correlation with estrogen receptor protein expression in tumor tissue in breast cancer patients. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2014.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Human molecular genetics**, v. 15 Spec No, n. 1, p. 17–29, 2006.

MCGHEE, J. D.; FELSENFELD, G. The number of charge-charge interactions stabilizing the ends of nucleosome DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 12, p. 2751–2770, 1980.

MICELI, M. et al. Natural compounds in epigenetics: A current view. **Food and Chemical Toxicology**, v. 73, p. 71–83, 2014.

MILLANTA, F. et al. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. **Research in Veterinary Science**, v. 79, n. 3, p. 225–232, 2005.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271–89, 2016.

MOHR, A. et al. Hormone Receptor Expression Analyses in Neoplastic and Non-Neoplastic Canine Mammary Tissue by a Bead Based Multiplex Branched DNA Assay: A Gene Expression Study in Fresh Frozen and Formalin-Fixed ., **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–15, 2016.

MORAS, D.; GRONEMEYER, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. **Current opinion in cell biology**, v. 10, n. 3, p. 384–391, 1998.

NGUYEN, C. et al. Susceptibility of nonpromoter CpG islands to de novo methylation in normal and neoplastic cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 19, p. 1465–1472, 2001.

NIETO, A. et al. Immunohistologic Detection of Estrogen Receptor Alpha in

Canine Mammary Tumors: Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 3, p. 239–247, 2000.

OTTAVIANO, Y. L. et al. Methylation of the Estrogen Receptor Gene CpG Island Marks Loss of Estrogen Receptor Expression in Human Breast Cancer Cells. p. 2552–2555, 1994.

PANDEY, D. P.; PICARD, D. miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor alpha mRNA. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 13, p. 3783–3790, 2009.

PENA, L. et al. Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 1, p. 127–145, 2014.

PETROVIC, N. et al. Changes in miR-221/222 Levels in Invasive and In Situ Carcinomas of the Breast: Differences in Association with Estrogen Receptor and TIMP3 Expression Levels. **Molecular Diagnosis & Therapy**, 2016.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PRABHU, J. S. et al. The epigenetic silencing of the estrogen receptor (ER) by hypermethylation of the ESR1 promoter is seen predominantly in triple-negative breast cancers in Indian women. **Tumor Biology**, v. 33, n. 2, p. 315–323, 2012.

PRESS, M. F. et al. Estrogen receptor localization in the female genital tract. **The American journal of pathology**, v. 123, n. 2, p. 280–92, 1986.

QIN, H. et al. The altered expression profile of microRNAs in cardiopulmonary bypass canine models and the effects of mir-499 on myocardial ischemic reperfusion injury. **Journal of translational medicine**, v. 11, n. 1, p. 154, 2013.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos – Novas perspectivas [Canine mammary tumors- New perspectives ] Congresso de Ciências Veterinárias [Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, 2002], SPCV. **Tumores mamários caninos – Novas perspectivas [Canine mammary tumors- New perspectives]**, v. 3, p. 183–190, 2002.

RAMOS, E. A. S. et al. Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. **BMC cancer**, v. 10, p. 23, 2010.

RASOTTO, R. et al. A Retrospective Study of Those Histopathologic Parameters Predictive of Invasion of the Lymphatic System by Canine Mammary Carcinomas. 2012.

RAZANDI, M. et al. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 13, n. 2, p. 307–319, 1999.

RAZIN, A; RIGGS, A D. DNA methylation and gene function. **Science (New York, N.Y.)**, v. 210, n. 4470, p. 604–610, 1980.

RICCARDO, F. et al. The importance of comparative oncology in translational medicine Australian College of Veterinary Scientists American College of Veterinary Radiology United States Department of Agriculture. v. 64, p. 137–148, 2015.

ROWELL, J. L.; MCCARTHY, D. O.; ALVAREZ, C. E. Dog models of naturally occurring cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 7, p. 380–388, 2011.

SAKAMOTO, A. et al. DNA Methylation in the Exon 1 Region and Complex Regulation of Twist1 Expression in Gastric Cancer Cells. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. e0145630, 2015.

SALAS, Y. et al. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–15, 2015.

SCHULER, S. L. et al. Hepatic and Thymic Alterations in Newborn Offspring of Malnourished Rat Dams. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 184–189, 2008.

SHANN, Y. J. et al. Genome-wide mapping and characterization of hypomethylated sites in human tissues and breast cancer cell lines. **Genome research**, v. 18, n. 5, p. 791–801, 2008.

SHARMA, D. et al. Release of methyl CpG binding proteins and histone deacetylase 1 from the Estrogen receptor alpha (ER) promoter upon reactivation in ER-negative human breast cancer cells. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 19, n. 7, p. 1740–1751, 2005.

SHIMIZU, D. et al. Identification of intragenic methylation in the TUSC1 gene as a novel prognostic marker of hepatocellular carcinoma. **Oncology Reports**, v. 31, n. 3, p. 1305–1313, 2014.

SHIMIZU, R. et al. Possible role of intragenic DNA hypermethylation in gene silencing of the tumor suppressor gene NR4A3 in acute myeloid leukemia. **Leukemia research**, v. 50, p. 85–94, 2016.

SLEECKX, N. et al. Canine mammary tumours, an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1112–1131, 2011.

SORENMO, K. U. et al. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011.

SORENMO, K. U.; DEANNA, R.; GOLDSCHMIDT, R. Withrow & MacEwen`s small animal clinical oncology. In: **Withrow & MacEwen`s small animal clinical oncology**. 5. ed. [s.l.] Philadelphia: W. B. Saunders Company., 2013. p. 553–571.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869–74, 2001.

SPOERRI, M. et al. Endocrine control of canine mammary neoplasms: serum reproductive hormone levels and tissue expression of steroid hormone, prolactin and growth hormone receptors. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 235, 2015.

STUART-HARRIS, R.; DAVIS, A. Optimal adjuvant endocrine therapy for early breast cancer. **Women's health (London, England)**, v. 6, n. 3, p. 383–98, 2010.

TAVARES, W. L. F. et al. Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, p. 67, 2010.

THEODOROU, V. et al. GATA3 acts upstream of FOXA1 in mediating ESR1 binding by shaping enhancer accessibility. **Genome Research**, v. 23, n. 1, p. 12–22, 2013.

THOMAS, C.; GUSTAFSSON, J.-Å. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 8, p. 597–608, 2011.

TONITI, W. et al. Binding capacity of ER-alpha, ligands and SERMs: Comparison of the human, dog and cat. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, n. 11, p. 2875–2879, 2011.

UVA, P. et al. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC genomics**, v. 10, p. 135, 2009.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT - PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. p. 1–12, 2002.

VASCELLARI, M. et al. Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region ( Northeastern Italy ): Risk factors and similarities to human breast cancer. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 126, p. 183–189, 2016.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. 1942. **Endeavour**, p. 18–20, 1942.

WEIGELT, B. et al. Metaplastic breast carcinoma: more than a special type. **Nature Publishing Group**, n. January, 2014.

XIONG, J. et al. An estrogen receptor alpha suppressor, microRNA-22, is downregulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer cell lines and clinical samples. **The FEBS journal**, v. 277, n. 7, p. 1684–1694, 2010.

YAGER, J. D.; PH, D.; DAVIDSON, N. E. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer Hormonal Risk Factors for the Development of Breast. p. 1–16, 2006.

YOULDEN, D. R. et al. The descriptive epidemiology of female breast cancer: An international comparison of screening, incidence, survival and mortality. **Cancer Epidemiology**, v. 36, n. 3, p. 237–248, 2012.

YUE, W. et al. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. **Steroids**, v. 78, n. 2, p. 161–170, 2013.

## ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 048/2015, referente ao projeto "Avaliação do perfil epigenético do gene **ESR1 em câncer de mama de cadelas**", sob a responsabilidade de **Giseli Klassen** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, em reunião de 17/06/2015

Vigência do projeto	Junho de 2015 a Março de 2017
Espécie/Linhagem	Tecido mamário de Cadelas
Número de animais	20 (vinte) amostras de tecidos mamários
Peso/Idade	Variado / 05 a 13 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Tecido mamário proveniente de peças cirúrgicas oriundas de cadelas

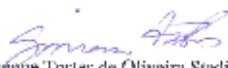
### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 048/2015, regarding the project "Epigenetic profile of **ESR1 gene in canine mammary tumor**", under **Giseli Klassen** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), in session of 06/17/2015.

Duration of the project	June 2015 to March 2017
Species/Line	Breast tissue female dogs
Number of animals	20 (twenty) breast tissue samples
Weight/Age	Miscellaneous / 05 to 13 years
Sex	Females
Origin	Breast tissue from surgical specimens originating from female dogs

Curitiba, 17 de Junho de 2015

  
Aranda Portella Félix  
Presidente CEUA-SCA

  
Simone Tostes de Oliveira Suedile  
Vice-Presidente CEUA-SCA