



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

THAMIRYS ALINE SILVA FARO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DO PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES p15^{INK4B}
E p16^{INK4A} E SEUS REGULADORES BMI-1, MYC E TBX2 EM TUMORES
MAMÁRIOS CANINOS**

**BELÉM
2016**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

THAMIRYS ALINE SILVA FARO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DO PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES p15^{INK4B}
E p16^{INK4A} E SEUS REGULADORES BMI-1, MYC E TBX2 EM TUMORES
MAMÁRIOS CANINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Bárbara do Nascimento Borges

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Danielle Queiroz Calcagno

**BELÉM
2016**

Faro, Thamirys Aline Silva

Análise da expressão e do padrão de metilação dos genes p15^{INK4B} e p16^{INK4A} e seus reguladores BMI-1, MYC e TXB2 em tumores mamários caninos / Thamirys Aline Silva. – Belém, 2016.

67 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde Animal/Saúde e Meio Ambiente) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2016.

Orientador: Dra. Bárbara do Nascimento Borges.

1. Cães - Câncer 2. Fêmeas caninas - Mama - Câncer 3. Tumores mamários - Cães 4. Fêmeas caninas - Neoplasia I. Borges, Bárbara do Nascimento (Orient.) II. Título.

CDD – 636.70896994



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

Thamirys Aline Silva Faro

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DO PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES p15^{INK4B}
E p16^{INK4A} E SEUS REGULADORES BMI-1, MYC E TBX2 EM TUMORES
MAMÁRIOS CANINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Saúde e Meio Ambiente.

Data da aprovação: 29/02/2016

Banca Examinadora

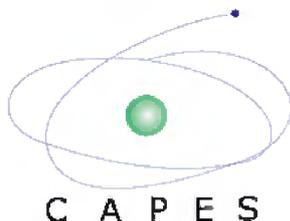
Prof^ª. Dr^ª. Bárbara do Nascimento Borges (Orientadora)
UFRA- UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Lúcia Harada (1º Examinador)
ICB - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira (2º Examinador)
IEC – INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

Prof^ª. Dr^ª. Janaína Mota de Vasconcelos (3º Examinador)
IEC – INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES



Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará - FAPESPA



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq



Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia - PPGSPAA

À minha vó querida, **Alzira** (in memoriam), que foi exemplo de mulher, de garra e força.
Deixou uma saudade em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pelo dom da vida e pela força adquirida ao longo desses dois anos de mestrado;

À **UFRA** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro fundamental para o desenvolvimento desse trabalho;

À **Pós Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia**, de onde eu tiro o título de Mestre, obrigada por todo aprendizado oferecido;

Ao *Laboratório de Biologia Molecular “Francisco Mauro Salzano”* da Universidade Federal do Pará, pelo apoio e concessão do espaço para o desenvolvimento da pesquisa;

À minha orientadora **Profª. Drª. Bárbara Borges**, pelo seu tempo dedicado a mim e competência profissional. Todo conhecimento que eu obtive para desenvolver essa pesquisa foi com ajuda dela. Toda a confiança passada em mais dois anos de trabalho foram essenciais. És uma pessoa maravilhosa e uma profissional muito dedicada e competente. Muito obrigada!!;

À minha co-orientadora **Profª. Drª. Danielle Calcagno**, pela paciência em me ensinar técnicas novas essenciais para a minha dissertação e por abrir o Núcleo de Pesquisas em Oncologia para mim;

Aos meus amigos e colegas de trabalho, que nas horas mais conturbadas conseguiram arrancar uma risada, deixando o local de trabalho extremamente prazeroso. Agradeço a todos, em especial aos meninos da Pós – Graduação, que estão nessa luta comigo, **Danilo, Francisco e Wallax**;

A todos que contribuíram para que essa pesquisa se concretizasse, em especial a equipe do Laboratório de Patologia Animal da UFRA, o meu obrigado ao **Prof. Dr. Washington Pereira e Roberta Aguirra**.

Aos meus pais, **Rita e José**, pela minha criação e pelo apoio que recebo todos os dias de minha vida. Não medem esforços para me ajudar;

Às minhas irmãs, **Flora e Mayra**, meus exemplos, meus amores;

Ao meu afilhado, **Arthur**, sinônimo de luz e alegria na minha vida;

Às minhas tias, **Conceição e Marília**, que nos ajudam nos melhores e nos não tão bons momentos de nossas vidas. Obrigada pelo apoio na minha formação complementar e pelo carinho e amor de sempre;

Ao meu namorado, **José Gabriel e sua família**, pelo apoio nas horas mais difíceis e por estar sempre ao meu lado, me alegrando e dando força,

O meu MUITO OBRIGADA!!!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Anatomia da glândula mamária canina.....	6
Figura 2- Classificação histológica dos carcinomas.....	7
Figura 3- Classificação histológica dos sarcomas.....	8
Figura 4- Formação da 5-metilcitosina.....	11
Figura 5- Metilação da região promotora do gene.....	12
Figura 6- Locus dos genes p14, p15 e p16 em cromossomo canino 11.....	13
Figura 7- Locus INK4b-ARF-INK4a.....	14
Figura 8- Regulação gênica em mamíferos – Via RB-E2F.....	15
Figura 9- Função oncogênica do gene BMI-1.....	19
Figura 10- Atuação da proteína C-MYC.....	21
Figura 11- Função oncogênica do gene TBX2.....	23
Figura 12- Reguladores negativos do Locus INK4-ARF.....	24
Figura 13A- Diagrama esquemático do padrão de metilação do gene p15INK4b.....	37
Figura 13B- Diagrama esquemático do padrão de metilação do gene p15INK4b entre as amostras pareadas.....	38
Figura 14A- Diagrama esquemático do padrão de metilação do gene TBX2.....	40
Figura 14B- Diagrama esquemático do padrão de metilação do gene TBX2 entre as amostras pareadas.....	41
Figura 15- Comparação dos dados de expressão.....	42
Figura 16- Comparação dos dados de expressão entre as amostras pareadas.....	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição racial.....	29
Gráfico 2- Incidência do câncer mamário canino de acordo com a idade.....	30
Gráfico 3- Porcentagem de animais castrados e não castrados.....	31
Gráfico 4- Porcentagem de animais castrados e não castrados com informação.....	31
Gráfico 5- Porcentagem de animais que entraram ou não em contato com hormônios.....	32
Gráfico 6- Porcentagem de animais com informação que entraram ou não em contato com hormônios.....	33
Gráfico 7- Distribuição dos animais em relação à reprodução.....	33
Gráfico 8- Distribuição dos animais com informação em relação à reprodução.....	34
Gráfico 9- Distribuição dos animais em relação à pseudociese.....	34
Gráfico 10- Distribuição dos animais com informação em relação à pseudociese.....	35
Gráfico 11- Porcentagem de animais que apresentaram metástase.....	47

RESUMO

O câncer é uma doença complexa decorrente do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas no controle e na atividade de vários genes, em especial aqueles envolvidos nos processos de diferenciação e crescimento levando a uma proliferação celular anormal. Esta doença entre os animais de companhia, principalmente os caninos, vem crescendo ao longo dos anos. A neoplasia mais frequente nas fêmeas caninas é a de mama, sendo responsável por 50% de todas as neoplasias que acometem esses animais. Dentre os genes comumente alterados, estão os reguladores do ciclo celular. Várias famílias de genes sofrem alteração, dentre elas, a família CKI, da qual fazem parte p15INK4b e p16INK4a. Sabe-se que a expressão destes dois genes é regulada negativamente pelos produtos proteicos dos genes BMI-1, MYC e TBX2, sendo que alterações nestes podem levar, então, ao câncer. Dessa forma, o objetivo do nosso trabalho, foi avaliar o padrão de metilação e expressão dos cinco genes supracitados em tumores mamários caninos de cadelas da região de Belém, Pará. Oitenta e cinco amostras de tecido neoplásico e não-neoplásico, provenientes de 40 animais, foram coletadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia. Para a análise do padrão de metilação, após a extração de DNA, as amostras foram convertidas por ação do bissulfite de sódio e submetidas à técnica de Bissulfite sequence PCR para detecção das possíveis áreas metiladas. Para a análise da expressão de RNA, foi feita a conversão a cDNA e posterior quantificação dos transcritos usando a técnica de PCR quantitativa. A emissão da fluorescência foi captada com o auxílio do ABI PRISM 7500 Sequence Detection System. BMI-1, MYC e p16INK4a não apresentaram alteração no padrão de metilação nem na expressão. TBX2 apresentou uma leve diminuição nos dados de expressão, enquanto que p15INK4b apresentou um aumento, porém, em ambos os casos, tais alterações não apresentaram correlações estatisticamente significativas com os dados clinicopatológicos analisados. Dessa forma, os genes MYC, BMI-1 e p16INK4a parecem não ser essenciais para o desencadeamento do câncer de mama em caninos, sugerindo que p15INK4b e TBX2 podem ser regulados por outros mecanismos genéticos e epigenéticos, necessitando de mais estudos para confirmação.

Palavras-chave: Metilação, Expressão, Tumor de mama, Cães.

ABSTRACT

Cancer is a complex disease resulting from the accumulation of genetic and epigenetic changes in control and in the activity of several genes, especially those involved in the differentiation and growth processes leading to abnormal cell proliferation. This disease among pets, especially dogs, has been growing over the years. The most common cancer in female dogs is the breast, accounting for 50% of all cancers that affect these animals. Among the commonly altered genes, are regulators of the cell cycle. Several families of genes undergo change, among them the CKI family, which includes p15INK4b and p16INK4a. It is known that the expression of these two genes is negatively regulated by protein products of genes BMI-1, MYC and TXB2, and these changes may lead then to cancer. Thus, the aim of our study was to evaluate the pattern of methylation and expression of above five genes in canine mammary tumors in dogs from the Belém, Pará. Eighty-five samples of tumor tissue and non-neoplastic, from 40 animals were collected at the Veterinary Hospital of the Universidade Federal Rural da Amazônia. For the methylation pattern analysis, after DNA extraction, samples were converted by action of sodium bisulfite and subjected to sequence PCR Bisulfite technique for the detection of methylated possible areas. For the analysis of RNA expression, conversion to cDNA was taken and subsequent quantification of the transcripts using quantitative PCR. The emission of fluorescence was captured with the help of the ABI PRISM 7500 Sequence Detection System. BMI-1, MYC and p16INK4a showed no change in methylation pattern or the expression. TXB2 showed a slight decrease in expression data, while p15INK4b showed an increase, however, in both cases, these changes were not statistically significant correlations with clinicopathological data analyzed. Thus, genes MYC, BMI-1 and p16INK4a do not seem to be essential for triggering breast cancer in canines, suggesting that p15INK4b and TXB2 may be regulated by other genetic and epigenetic mechanisms, requiring further study for confirmation.

Key-words: Methylation, Expression, Breast cancer, Dogs.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer	1
1.2 Neoplasias da glândula mamária	2
1.3 Epigenética e câncer	9
1.3.1 Metilação do DNA	10
1.4 Locus INK4/ARF	13
1.4.1 Gene p15INK4b	15
1.4.2 Gene p16INK4a	16
1.5 Reguladores negativos do locus INK4/ARF	18
1.5.1 Gene BMI-1	18
1.5.2 Gene MYC	20
1.5.3 Gene TBX2.....	22
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Coleta das amostras	26
3.2 Extração de DNA	26
3.3 Análise do padrão de metilação	27
3.4 Sequenciamento dos fragmentos amplificados	28
3.5 Análise da expressão gênica	28
3.6 Análise estatística	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.2 Caracterização da população estudada	29
4.2 Análises da metilação e expressão dos genes estudados	35
5. CONCLUSÕES	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO 1	63
ANEXO 2	66
ANEXO 3	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma doença complexa decorrente do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas no controle e na atividade de vários genes, em especial aqueles envolvidos nos processos de diferenciação e crescimento celular, levando a uma proliferação anormal (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004; LEA et al., 2007; SADIKOVIC et al., 2008; ALI; SJÖBLOM, 2009).

Dentre os tipos de genes mais mutados nesta doença, estão os supressores tumorais e os oncogenes (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004). Em células normais, esses genes estão em equilíbrio fisiológico, mantendo a homeostase e bloqueando o crescimento e proliferação de células que apresentam DNA mutado (BERGER; KNUDSON; PANDOLFO, 2011).

Alterações em oncogenes podem gerar a ativação constitutiva dos mesmos, ou ainda a ativação em condições nas quais eles normalmente estariam inativos (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004). Já alterações nos genes supressores tumorais levam a inativação das suas funções, como o reparo do DNA e prevenção do crescimento celular descontrolado (OLIVEIRA; ROSS; FLETCHER, 2005; LEE; MULLER, 2010).

Conceitualmente, os genes supressores tumorais podem ser subdivididos em duas categorias: gatekeepers, que inibem diretamente o crescimento tumoral, induzindo à morte celular ou bloqueando o ciclo em células com potencial tumoral; e caretakers, que atuam indiretamente no crescimento tumoral, sendo responsáveis por assegurar a integridade do DNA por meio do reparo de danos ou prevenindo a instabilidade genômica (MACLEOD, 2000; LEVITT; HICKSON, 2002; OLIVEIRA; ROSS; FLETCHER, 2005; VAN HEEMST; DEN REIJER; WESTENDORP, 2007; COWIN et al., 2010).

Vários mecanismos podem desencadear essas alterações, sendo os mais frequentes o acúmulo de mutações (mutações de ponto, deleções, inserções, ampliações e translocações) e as alterações epigenéticas nos genes que comandam vias celulares, sendo estas últimas responsáveis por modificar a expressão gênica sem alterar a sequência de DNA (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004; TOYOTA et al., 2009).

O resultado desse processo é a transformação neoplásica celular que evolui metabólica e fenotipicamente ao longo do tempo, resultando em um quadro no qual a expansão clonal das células alteradas destrói e são capazes de erodir o tecido normal adjacente, levando assim, ao aparecimento do câncer (DIAZ- CANO, 2008).

Com o estabelecimento do fenótipo maligno, a célula tumoral adquire características próprias e comuns a todos os tumores, independente do tecido de origem: auto-suficiência dos sinais de crescimento, perda de inibição do crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese e inflamação do seu microambiente, dentre outras (COLOTTA et al., 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os estudos sobre os genes que atuam no controle do ciclo celular serviram de ponto de partida para identificação de outros genes (e suas funções bioquímicas), envolvidos em diferentes vias, e relacionados com o processo da tumorigênese (EVAN; VOUDSEN, 2001; VOGELSTEIN; KINZLER, 2004). Dentre os genes comumente alterados, estão os reguladores do ciclo celular, especialmente os genes que codificam as enzimas chamadas cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e seus inibidores (inibidores de cinases dependentes de ciclinas – CKIs) (PARK; LEE, 2003). Durante o ciclo celular, as CDKs são ativadas de maneira orquestrada, permitindo a transição apropriada entre as diferentes fases do ciclo, levando à progressão deste (WESIERSKA-GADEK et al., 2004). Um dos pontos de controle das CDKs ocorre pela ação dos CKIs, reguladores negativos do ciclo celular, que se associam às CDKs, impedindo sua atividade (PARK; LEE, 2003; MALUMBRES; BARBACID, 2009).

Das diversas famílias de CKIs, duas são frequentemente alteradas em tumores: a família INK4, que inclui p15 (INK4B), p16 (INK4A), p18 (INK4C) e p19 (INK4D), localizada em humanos no cromossomo 9p21 e é inibidora da formação do complexo Cdk4/Cdk6/Ciclina D; e a família CIP/KIP, composta por p21 (CIP1/WAF1), p27 (KIP1) e p57 (KIP2), que inibe diversos complexos CDKs-ciclina, tais como CDK2-ciclina E e CDK4-ciclina D1 (SANDAL, 2002; PARK; LEE, 2003).

1.2 Neoplasias da glândula mamária

Tumores mamários são os processos neoplásicos mais frequentes em cadelas e representam um problema de grande impacto na medicina veterinária. Neste contexto, muitos

esforços estão sendo dirigidos para adoção de critérios para padronização do diagnóstico, compreensão do comportamento e evolução do tumor e avaliação de fatores prognósticos e preditivos, tais como: morfologia, expressão de oncogenes e alterações genéticas. O conhecimento e a adoção desses parâmetros são de fundamental importância para a escolha e sucesso de terapias que promovem a redução de recidiva tumoral e aumento da sobrevida global (CASSALI, 2013).

A pesquisa em câncer mamário canino é de extrema importância, pois estes tumores são ótimos modelos para o estudo do câncer comparado entre cadelas e mulheres, já que: I) o câncer mamário em cães é espontâneo e heterogêneo, assim como no humano, capturando a sua essência; II) os cães, por serem animais de companhia, acabam por compartilhar o mesmo ambiente que seus donos, entrando também em contato com os mesmos agentes carcinógenos; III) os cães, diferente dos camundongos, apresentam atividades biológicas semelhantes a do humano, como por exemplo, a atividade da telomerase; e IV) há diversas similaridades clínicas e anatômicas entre os cânceres das duas espécies, assim como o tratamento utilizado (ROWELL; MCCARTHY; ALVAREZ, 2011; LIU, et al., 2014).

A doença é responsável por cerca de 50% de todas as neoplasias que acometem essa espécie (SORENMO, 2003; DE NARDI et al., 2002; MERLO, 2008; GREEN et al., 2009). Em relação à incidência desse tipo de câncer, a espécie canina apresenta uma maior frequência quando comparada a outras espécies de mamíferos, inclusive à espécie humana (cerca de três vezes mais tumores mamários que a mulher) (CASSALI, 2003). Um fator anatômico e fisiológico que pode favorecer esse número elevado, é que a fêmea canina apresenta cinco pares de mama (ZUCCARI et al., 2005).

Por conta da elevada incidência desta patologia, devido aos diversos fatores que aumentam a longevidade do animal (dietas balanceadas, vacinações contra doenças infectocontagiosas, diagnósticos mais precisos e protocolos terapêuticos mais eficazes) o seu estudo em cadelas vem crescendo cada vez mais, dada a importância desta espécie como animal de companhia e também por representar um modelo experimental de grande viabilidade técnica nas pesquisas de câncer humano, devido às similaridades histológicas entre os tumores, além da facilidade de realização de mastectomias parciais ou totais das mamas afetadas (RUTTEMAN et al., 2001; LUIZ; MIGLINO; SANTOS, 2002).

Os tumores mamários são quase que exclusividade das fêmeas, podendo afetar menos de 1% de machos, sendo que geralmente estes apresentam anormalidades hormonais, como

tumores testiculares de células de Sertoli secretoras de estrógenos (MISDORP, 2002), provocando ginecomastia (MISDORP et al., 1999; MACLACHALAN; KENNEDY, 2002; CASSALI, 2003).

Quanto às raças acometidas por neoplasia mamária, na literatura não há um consenso. Alguns autores afirmam que essa predisposição racial não existe (CASSALI, 2003). No entanto, há indicação de algumas raças com maior risco de apresentarem neoplasia mamária, como Pastor alemão (17%), Labrador (13%), Spitz Alemão (11%), Spitz Alemão Anão e Doberman (5%), Cocker Spaniel (3%), Dacshund e Dálmata (1%) e os animais sem raça definida (SRD) são os que apresentam maior risco de apresentarem essa doença, de acordo com Gupta et al. (2012).

O índice de risco de desenvolvimento das neoplasias mamárias varia entre cadelas castradas e não-castradas e depende da fase que a castração é efetuada (FONSECA; DALECK, 2000). A ovariário-salpingo-histerectomia (OSH), quando realizada antes do primeiro estro reduz o risco de desenvolvimento da neoplasia para 0,5%, ao passo que esse risco aumenta significativamente nas fêmeas esterilizadas após o primeiro (8%) e segundo (26%) ciclos estrais (SOARES; SILVA, 1998; ZUCCARI; SANTANA; ROCHA, 2001; RUTTEMAN et al., 2001; FOSSUM et al., 2002; QUEIROGA et al., 2005).

Os ciclos reprodutivos são fenômenos rítmicos observados em todos os mamíferos. Um intervalo de ciclo é definido como o tempo desde o início do período de receptividade sexual até o período seguinte, ou como o intervalo entre sucessivas ovulações. Em cadelas, o ciclo estral é dividido em quatro etapas, sendo elas, proestro, estro, metaestro e diestro. E em cada fase, a cadela é exposta a diferentes níveis hormonais, assim como a citologia vaginal varia (COSTA; LÉGAS; NEVES, 2009; SONREMO et al., 2011).

Estudos comparativos foram realizados entre cadelas não castradas, cadelas previamente castradas e cadelas que foram castradas no momento da excisão do tumor maligno de mama, indicam que não há efeito benéfico da OSH nestas últimas, no que diz respeito ao prognóstico (YAMAGAMI et al., 1996; MORRIS et al., 1998). Entretanto, o valor da supressão hormonal através da OSH como tratamento adjuvante do tumor de mama em cadelas permanece controverso (FONSECA; DALECK, 2000).

Em relação à pseudociese, termo técnico para falsa gestação, em um levantamento feito no Brasil, foi observado que cadelas que apresentaram pseudociese obtiveram, mesmo

que com uma diferença muito pequena, um número maior de tumores malignos mamários do que aquelas que não apresentaram pseudociese (OLIVEIRA et al., 2003). Já Morris et al. (1998) não observaram nenhuma correlação da pseudociese com o desenvolvimento de neoplasias mamárias, resultado corroborado pelo trabalho de Souza (2006).

Outro fator que tem se dado muita atenção como relacionado ao aparecimento de tumores mamários em cadelas, é a administração de anticoncepcionais (MISDORP, 2002). Estes hormônios afetam o desenvolvimento normal da glândula mamária, estimulando a proliferação do epitélio, e aumentando a chance de ocorrer erros genéticos (DICKON; STANCEL, 1999; SORENMO, 2003).

Além desses fatores, a nutrição pode desencadear a neoplasia. Vários estudos têm avaliado o efeito da obesidade e fatores dietéticos sobre o risco de desenvolvimento de tumores na glândula mamária em cães (SORENMO, 2003). Experimentos em animais e estudos epidemiológicos em humanos têm sugerido que dietas ricas em gordura e a obesidade aumentam o risco de desenvolvimento de tumores mamários (MISDORP, 2002). Os fatores pelos quais a obesidade influencia a tumorigênese em mulheres ainda permanecem desconhecidos. Mas o que é relatado é que os adipócitos conseguem secretar uma quantidade maior de diversas proteínas e hormônios, dentre eles, estrógeno, leptina, fator de crescimento semelhante à insulina tipo I, aromatase e adiponectina (LIM et al., 2015).

De acordo com Sonremo (2011), quando a obesidade afeta os animais mais jovens, o risco de aparecimento da doença é consideravelmente maior, já que há uma maior produção de estrógenos, expondo assim o tecido mamário a altos níveis hormonais. Além disso, a leptina, que é a principal proteína que tem sua concentração elevada na obesidade, também tem um papel importante no aparecimento de tumores mamários, através da interação com os receptores de leptina. Esta proteína afeta diretamente a proliferação das células epiteliais nas glândulas mamárias normais e também nas células tumorais, tendo um papel importante também na angiogênese e invasão tumoral (JARDÉ et al., 2011; LIM et al., 2015).

Os cães apresentam geralmente cinco pares de mama, sendo, dois pares torácicos, dois pares abdominais e um par inguinal. Os três primeiros pares são interligados por uma rede linfática comum, que se estende aos linfonodos axilares direito e esquerdo, já os dois últimos pares se estendem aos linfonodos inguinais direito e esquerdo (FONSECA, 2010) (Figura 1).

Os componentes epiteliais da glândula mamária tem como suporte o tecido mesenquimal, que se desenvolve a partir do mesoderma embrionário. Isto inclui o tecido conjuntivo fibroso, tecido adiposo, vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos. Ocasionalmente também pode conter dentro do estroma, histiócitos, mastócitos e células linfóides (SONREMO et al., 2011).

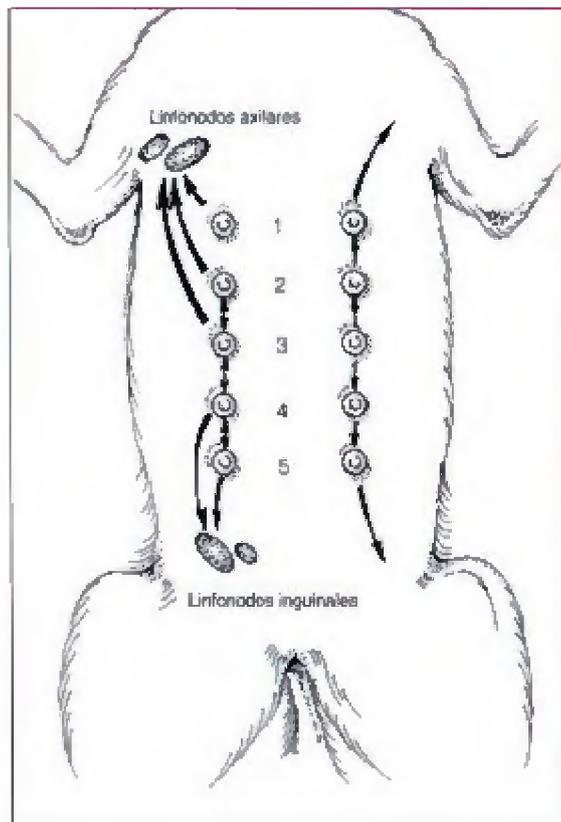


Figura 1: Anatomia da glândula mamária canina. Número 1 e 2 representam os pares torácicos, sendo 1 torácico cranial e 2 torácico caudal; 3 e 4 representam os pares abdominais, sendo 3 abdominal cranial e 4 abdominal caudal; e 5 representa o par inguinal. Adaptado de Fonseca (2010).

As neoplasias mamárias em cadelas podem se originar das células de revestimento epitelial, ductal ou alveolar, das células mioepiteliais periféricas e ainda do tecido conectivo intersticial (CARRUIDO et al., 2003). As neoplasias que se originam das células epiteliais são denominadas de carcinomas e as que possuem origem do tecido conjuntivo ou muscular são denominadas de sarcomas (ALBERTS et al., 1997).

Em cães, os carcinomas mamários podem ser carcinoma in situ, carcinoma complexo, carcinomas simples e carcinomas especiais. Carcinomas simples têm três variantes distintas histomorfologicamente diferentes: o carcinoma túbulo-papilar, sólido e anaplásico. Além disso, entre os tipos especiais de carcinomas estão o carcinoma micropapilar, carcinoma de células escamosas, carcinoma mucinoso, carcinoma secretório, carcinoma rico em lipídios e carcinoma de células fusiformes (CASSALI et al., 2011) (Figura 2).

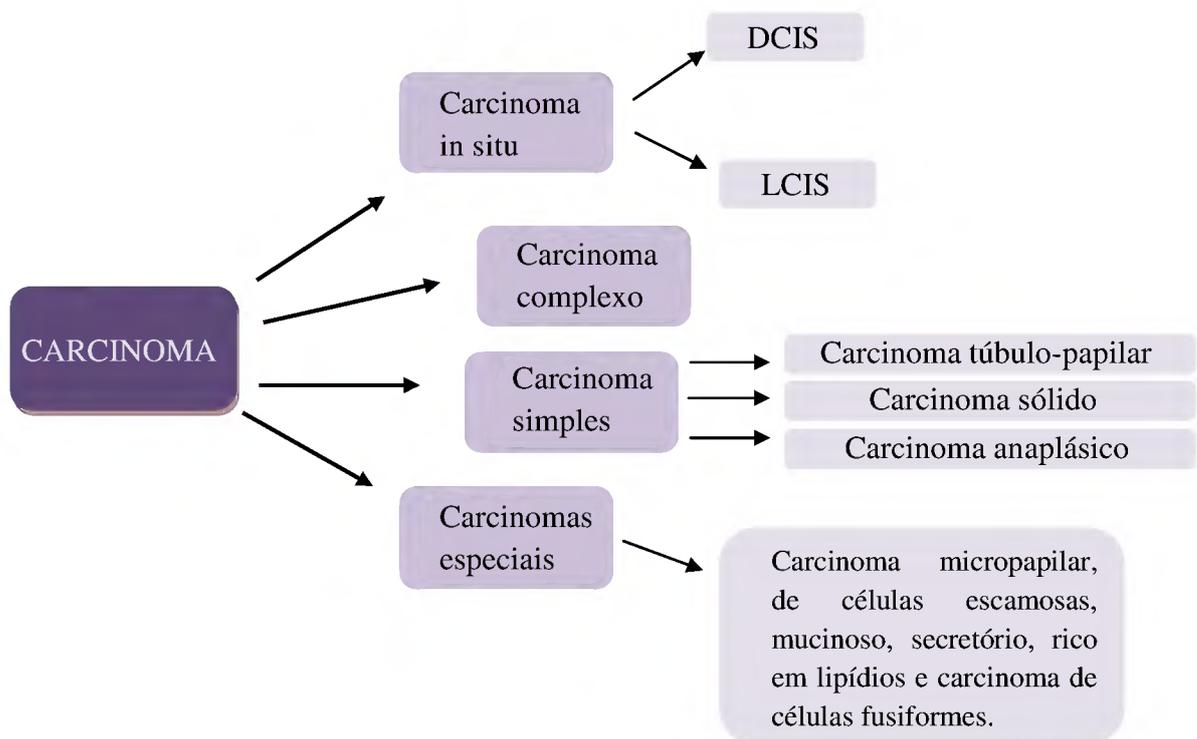


Figura 2: Classificação histológica dos carcinomas em cães. DCIS = Carcinoma ductal in situ. LCIS = Carcinomas lobulares in situ. Cassali et al. (2011).

Os carcinomas in situ são os únicos reconhecidos como lesões precursoras de transformação maligna na glândula mamária canina, semelhante ao da mama humana (ANTUOFERMO et al., 2007; MOUSER et al., 2010), podendo ser caracterizado como uma proliferação de células epiteliais malignas nas unidades ductais extralobulares (carcinoma ductal in situ) ou unidades lobulares terminais da glândula mamária (carcinoma lobular in situ) (CASSALI et al., 2011).

O carcinoma ductal in situ (DCIS) é o mais comum carcinoma in situ, sendo muitas vezes observado em associação com carcinomas mamários invasivos (carcinomas sólidos, papilar, carcinomas em tumores mistos). DCIS se desenvolve nos ductos intra - ou extra - lobulares, e é caracterizado por proliferações epiteliais que afetam mais do que duas unidades

ductal na mesma seção histológica. Pode ser associado com outros tipos de lesões não-neoplásicas (hiperplasia e lesões de células colunares) e neoplasias malignas, sendo que há uma correlação direta entre a presença de carcinoma ductal in situ, lesões de células colunares atípicas e carcinomas mamários invasores em cães (FERREIRA et al., 2010). Os carcinomas lobulares in situ (LCIS) são denominados como lesões lobulares devido à proliferação de células epiteliais que leva ao enchimento e expansão das unidades lobulares terminais (HANBY; HUGHES, 2008). A forma da célula é invariável, os núcleos são pequenos e esféricos, e os nucléolos são uniformes e discretos. Existe um único vacúolo citoplasmático em torno do núcleo, representado por uma invaginação da membrana citoplasmática (CASSALI et al., 2011).

Além dos carcinomas, há também os sarcomas, que são classificados, basicamente, em quatro tipos, como apresentado na Figura 3.

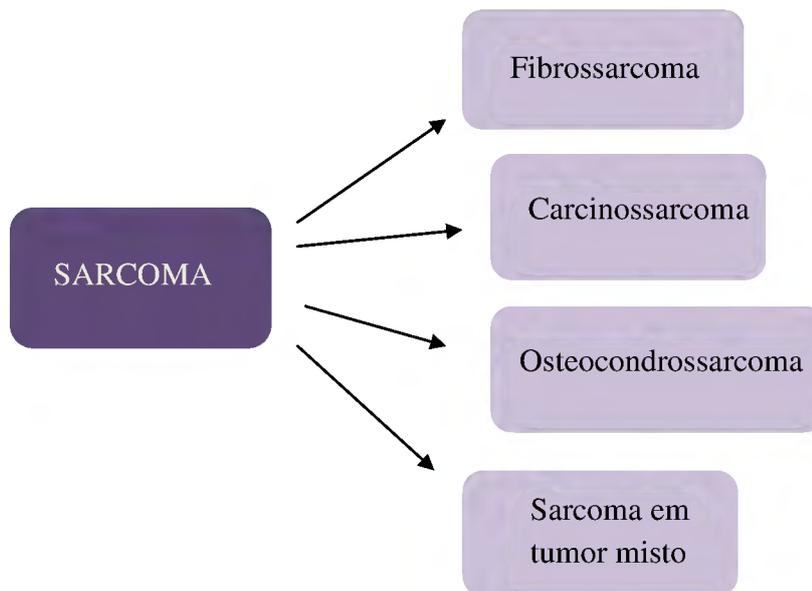


Figura 3: Classificação histológica dos sarcomas em cães. Cassali et al. (2011).

Fibrossarcomas são tumores malignos de células de fibroblastos com quantidades variáveis de colágeno. Tais tumores são compostos por células fusiformes, dispostas como fibras reticulares em paralelo ou desorganizadas. Já o osteosarcoma é caracterizado pela presença de osteóide e/ou a formação óssea por células neoplásicas. Podem ser não-combinados (puros) ou combinados, sendo este últimos compostos de tecidos malignos ósseos

e cartilagenosos. Os fibrossarcomas e osteossarcomas são os mais frequentes sarcomas mamários encontrados no cão (CASSALI, 2002).

Carcinossarcomas são tumores raros em mulheres e têm um prognóstico pobre em comparação com outros tipos de carcinomas (TOKUDOME et al., 2005). No cão, as características clínicas e patológicas são semelhantes aos descritos em seres humanos (MISDORP et al., 1973). São tumores de crescimento rápido, macroscopicamente são bem delineados com uma de superfície de corte ósseo e microscopicamente compostos de células que se assemelham morfológicamente as células epiteliais (epitélio luminal e/ou mioepitelial) (MISDORP et al., 1973; MISDORP, 2002).

Os sarcomas em tumor misto são os tumores com focos de células malignas mesenquimais ou nódulos distintos em tumores mistos benignos. Os critérios de avaliação de malignidade do componente mesenquimal de tumores mistos são os mesmos para sarcomas, que levam em conta a celularidade, atipia citológica e índice mitótico (EVANS; AYALA; ROMSDAHL, 1977).

1.3 Epigenética e câncer

A epigenética é definida como um estudo das alterações do DNA e das histonas que são herdáveis e não alteram a sequência das bases do DNA (VIRANI et al.; 2012). Na década de 90 a maioria dos cientistas acreditava que todas as doenças humanas estavam relacionadas à variação da sequência das bases do DNA. No entanto, hoje se sabe que várias doenças são melhor explicadas nos termos de mudanças epigenéticas do que por meio da genética clássica (DENNIS, 2003).

Os mecanismos epigenéticos regulam vários processos celulares direta ou indiretamente e são críticos na resposta da célula ao ambiente e aos estímulos endógenos (SAWAN et al., 2008). O ambiente como um todo é capaz de alterar a expressão de genes e consequentemente o fenótipo, em parte por mudanças no epigenoma, que é composto pelos padrões globais epigenéticos, dentre eles, a metilação do DNA, modificações de histonas e cromatinas e os microRNAs (JIRTLE; SKINNER, 2007).

Existe uma interação entre os diferentes tipos de informação molecular, sendo que este processo é proposto como o “código epigenético” que modula o “código genético” em resposta a estímulos endógenos e ambientais. O código epigenético é importante por manter o

perfil de expressão gênica durante muitas gerações e o funcionamento normal do organismo (SAWAN et al., 2008).

Desequilíbrios nos mecanismos epigenéticos promovem o desenvolvimento de fenótipo anormal e o aparecimento de eventos genéticos como, por exemplo, quebras do DNA, mutações e instabilidade cromossômica, contribuindo para o desenvolvimento de inúmeras doenças, como o câncer (SAWAN et al., 2008).

Em mamíferos, diversos eventos são controlados pela epigenética, tais como o imprinting genômico, plasticidade de células-tronco, o envelhecimento e a inativação do cromossomo X. Esta regulação ocorre também na expressão de genes tecido-específicos, silenciando elementos repetitivos, e inibindo, portanto, sua replicação e transposição, prevenindo assim a mutagênese por inserção (JIRTLE; SKINNER, 2007; HATZIAPOSTOULOU; ILIOPOULOS, 2011).

1.3.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma modificação química encontrada ao longo do genoma, que ocorre em diversos seres vivos, dentre eles, bactérias, plantas, fungos, vertebrados e invertebrados (SCARANO et al., 2005; KLOSE; BIRD, 2006).

Esse evento é uma modificação covalente que ocorre como resultado da atividade de uma família enzimática chamada DNA-metiltransferases (DNMT). Essas enzimas catalisam a adição de um grupamento metil de um doador, a S-adenosilmetionina, para o carbono 5 (C5) do anel pirimídico de um resíduo de citosina (Figura 4), e são divididas em duas categorias: as DNA metiltransferases de novo (DNMT3A e DNMT3B) e a de manutenção (DNMT1) (UMER; HERCEG, 2013; VANDIVER et al.; 2015). Este processo ocorre frequentemente em segmentos ricos em dinucleotídeos CpG, conhecidos como ilhas CpG, que são regiões de 500 a 4.000 pares de base (pb), com conteúdo GC maior que 55%, localizadas nas regiões promotoras de cerca de 40% dos genes de mamíferos (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009; TABY; ISSA, 2010).

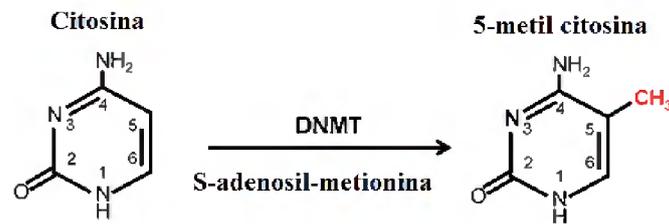


Figura 4: Formação da 5-metil-citosina, a partir da atuação da DNA-metiltransferase (DNMT). Adaptado de Fukushima;Horii (2013).

Porém, trabalhos recentes sugeriram que a maior parte da metilação do DNA ocorre nas chamadas “margens das Ilhas CpG”, que são regiões próximas as ilhas CpGs (<2kb de distância) mas com uma densidade de CpG comparativamente menor (DOI; PARK; WEN, 2009; VANDIVER et al.; 2015).

A metilação é um processo importante no controle da expressão gênica durante a diferenciação celular, visto que a mesma requer o silenciamento e ativação de genes específicos, inibindo a ligação de fatores de transcrição aos dinucleotídeos CpG (Ilhas CpG) na região promotora dos genes (LOTEM; SACHS, 2002). Proteínas chamadas Methyl Binding Proteins (MBPs), com afinidade pelo grupo metil, se ligam aos dinucleotídeos CpG que estão presentes nas regiões promotoras e impedem que os fatores de transcrição tenham acesso aos seus sítios, impossibilitando que o gene seja expresso. Essas proteínas promovem a condensação da cromatina deixando-a na forma inativa, ou na forma ativa, quando não ocorre essa condensação (ATTWOOD; YUNG; RICHARDSON, 2002; TABY; ISSA, 2010).

Portanto esses mecanismos são de vital importância para o funcionamento normal de todos os genes em um determinado tecido, mantendo assim, o seu comportamento adequado (TOST, 2009; ESTELLER, 2011). Logo, quando estes mecanismos são alterados, processos patogênicos podem ser gerados. Atualmente, diversos tipos de desregulações epigenéticas têm sido observadas em doenças, incluindo o câncer, sendo a metilação aberrante de ilhas CpG a alteração mais estudada em neoplasias humanas (SADIKOVIC et al., 2008; IACOBUZIO-DONAHUE, 2009; TOST, 2009; ESTELLER, 2011).

Em tumores a perda da metilação, ou seja, a hipometilação do genoma ou hipometilação global é observada e sugere-se que esta inicie e propague a carcinogênese

através da indução da instabilidade cromossômica e ativação transcricional de oncogenes (TOST, 2009). Além da hipometilação, no câncer pode ocorrer também a hipermetilação pontual em ilhas CpG, localizadas na região promotora de genes supressores tumorais, o que leva ao silenciamento destes (ESTELLER, 2006) (Figura 5).

Estes dois padrões de metilação associados com a progressão e formação tumoral estão relacionados com regiões distintas do genoma, sendo a hipometilação global associada principalmente com regiões de DNA repetitivo e elementos transponíveis, mas também podendo ocorrer nas regiões promotoras de genes normalmente silenciados. Já a hipermetilação afeta frequentemente os promotores dos genes supressores tumorais (GOPALAKRISHNAN; VAN EMBURGH; ROBERTSON, 2008).

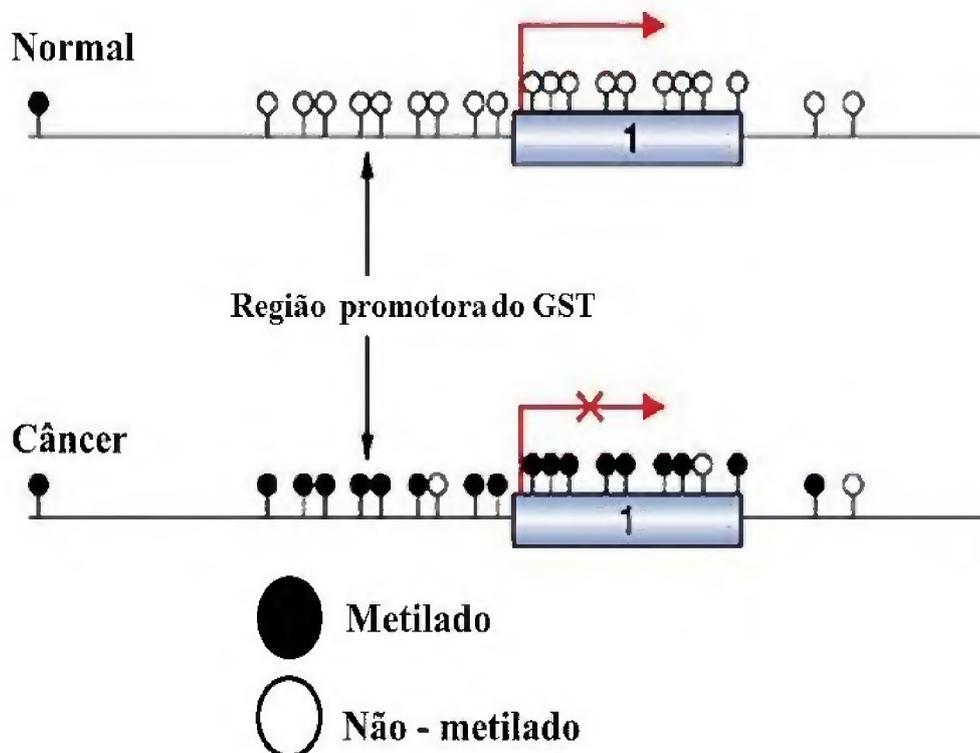


Figura 5: Metilação da região promotora de um gene supressor tumoral. Quando a região promotora dos genes supressores tumorais (GST) está hipometilada (A), o mesmo é transcrito normalmente. Porém, ao estar hipermetilada (B), o GST é então silenciado, sua função é comprometida, iniciando o processo de tumorigênese. Adaptado de Baylin (2005).

O estado de metilação dos genes envolvidos no processo carcinogênico é de extrema importância, pois pode auxiliar na caracterização e classificação dos tumores, além de ser utilizado como ponto de partida para o tratamento do câncer, já que a metilação do DNA não envolve mutação e é uma modificação reversível (TOST, 2009).

1.4 Locus INK4/ARF

O locus INK4/ARF localiza-se no cromossomo 11 em cães e corresponde ao cromossomo 9p21 em humanos. É considerado um regulador crítico da senescência, da apoptose induzida por estresse e inibe o ciclo celular (GIL; PETERS, 2006). Devido a diferentes matrizes de leitura esse locus codifica três proteínas supressoras de tumor reguladoras do ciclo celular, sendo duas inibidoras de cinases dependentes de ciclinas (CKIs), denominadas p16 (INK4a) e p15 (INK4b), e outra conhecida como p14 (ARF) (SANDAL, 2002; GIL; PETERS, 2006; FUJIWARA-IGARASHI et al, 2013) (Figura 6).

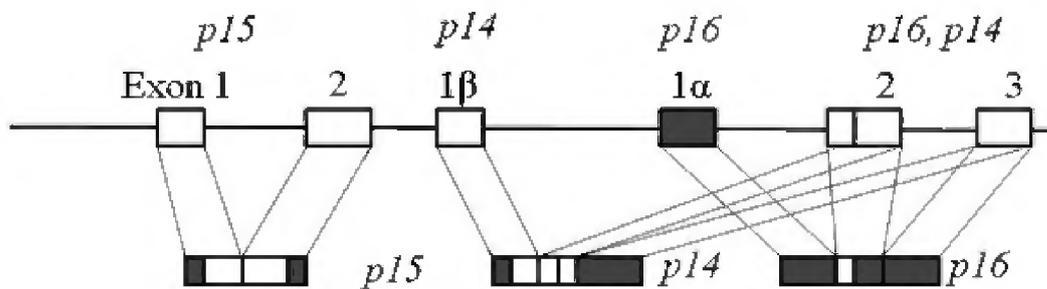


Figura 6: Locus INK4b-ARF-INK4a em cromossomo 11 canino deduzida a partir do locus do gene em humanos (cromossomo 9). Os éxons de p16, p15 e p14 são indicados por quadrados brancos e pretos. Gene p16 e p14, compartilham éxons 2 e 3. Adaptado de Fujiwara-Igarashi et al. (2013).

A proteína ARF (Alternate Reading Frame) foi inicialmente identificada como transcrito alternativo do locus INK4b-ARF-INK4a. É importante ressaltar que os primeiros éxons de INK4 e ARF são diferentes, por isso, não são consideradas isoformas, não possuem homologia de aminoácidos e por terem promotores separados, podem ser reguladas independentemente, mutadas ou silenciadas (OZENNE et al., 2010) (Figura 7). A função mais definida da p14, na via ARF-p53-MDM2, é suprimir a proliferação celular em resposta à ativação oncogênica pela ativação do fator de transcrição p53, onde participa da via ARF-p53-MDM2, (GIL; PETERS, 2006).

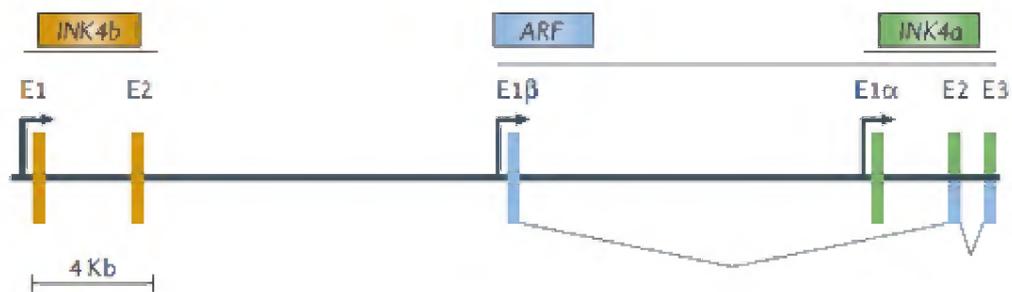


Figura 7: Locus INK4b-ARF-INK4a. Éxons representados em retângulos coloridos (E) e os promotores indicados por setas. INK4a e INK4b codificam inibidores das ciclinas dependente de cinases (CDK4 e CDK6). Sherr (2006).

Dessa forma, os membros do locus INK4/ARF também são considerados componentes chaves na senescência induzida por oncogene (SIO) e são induzidos durante o envelhecimento e em lesões pré-malignas, limitando assim a progressão tumoral (AGUILO; ZHOU; WALSH, 2011).

Os primeiros genes a serem identificados no locus INK4-ARF foram p15INK4b e p16INK4a, os quais codificam proteínas conservadas e funcionalmente relacionadas (SHARPLESS, 2005). Ambos são supressores tumorais que interagem com o complexo CDK4/6-ciclina D suprimindo a fosforilação da proteína retinoblastoma (RB), impedindo a progressão do ciclo celular (SHERR; ROBERTS, 1995), agindo como reguladores negativos do ciclo ao participar da via RB/E2F (PARK; LEE, 2003; GIL; PETERS, 2006) (Figura 8).

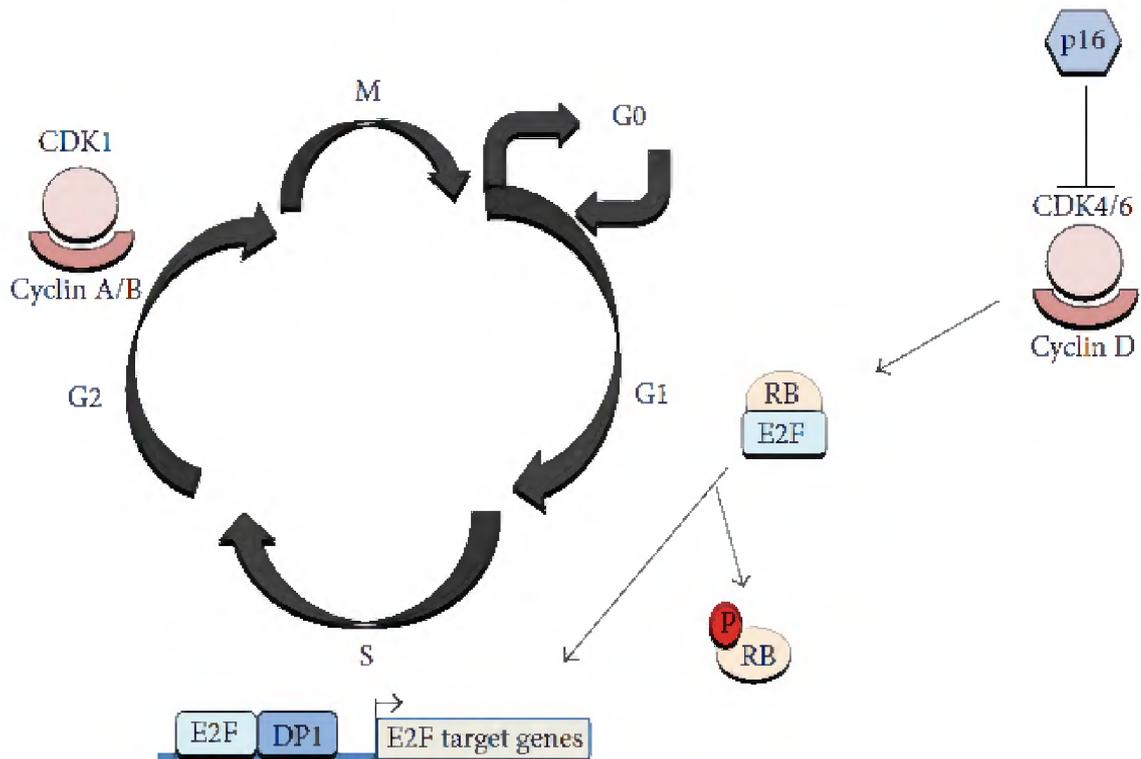


Figura 8: p16INK4a assim como p15INK4b se ligam às cinases CDK4 e CDK6, inibindo assim a ligação entre as ciclinas D e as cinases. Uma vez ligada ao gene supressor tumoral (p15INK4b ou p16INK4a), não ocorre a fosforilação da proteína Rb, fazendo com que o ciclo celular não prossiga, o que seja possível o reparo de danos no DNA. Se um dos genes supressores tumorais apresentar alguma alteração, não ocorrerá o bloqueio do complexo Ciclina – CDK, e o ciclo sempre estará progredindo. Adaptado de Salas et al. (2014).

1.4.1 Gene p15INK4b

O gene p15INK4b, como já citado, está localizado no cromossomo 11 em cão e está frequentemente inativo em um grande número de cânceres (TEOFILI et al., 2003; BUESO-RAMOS et al., 2005). A sua inativação pode ser uma consequência da perda de heterozigossidade, deleção homozigota, mutação de ponto e hipermetilação do promotor (SAKELLARIOU et al., 2008).

Por razões desconhecidas, as mutações em p15INK4b em vários tumores humanos são incomuns (GIL; PETERS, 2006; KIM; SHARPLESS, 2006). No adenocarcinoma gástrico, mutações raramente são identificadas, enquanto que a hipermetilação da região promotora desse gene é o mecanismo predominante para a inativação (SAKELLARIOU et al., 2008).

A perda da expressão do gene p15INK4b e a alteração no padrão de metilação deste gene tem sido relatada em diversos tipos de tumores em humanos, como leucemia e câncer de

colo retal (BODOOR et al., 2014; CHAAR et al., 2014). Na leucemia mielóide aguda o promotor desse gene está hipermetilado em mais de 70% dos casos (GEYER, 2010).

Este gene se encontra pouco metilado em tumores sólidos, como demonstra o trabalho de Zemlyakova et al. (2003) que encontrou somente dois tumores de mama com o promotor do gene metilado.

1.4.2 Gene p16INK4a

O gene p16INK4a é um dos genes mais estudados das últimas décadas, devido a sua importância vital na progressão do ciclo e da senescência celular e seu envolvimento em vários tipos de cânceres humano (LI et al., 2011).

É considerado o segundo gene mais mutado em todos os cânceres, (ESTELLER et al., 2011; ORTEGA; MALUMBRES; BARBACID, 2002; GONZALEZ; SERRANO, 2006) sendo mais frequente em carcinomas pancreáticos (85% dos casos), câncer de cabeça e pescoço (70% dos casos), melanoma (60% dos casos), leucemia (60% dos casos) e câncer de esôfago (60% dos casos) (LI; POI; TSAI, 2011).

Este gene pode ser inativado por deleção homozigota, hipermetilação da região promotora, perda de heterozigosidade e mutações de ponto (FORBES et al., 2006; ORTEGA; MALUMBRES; BARBACID, 2002). Enquanto deleções homozigotas e hipermetilação do promotor constituem a maioria das alterações encontradas, em alguns tumores é possível observar certas tendências por alterações específicas em p16INK4a (SANCHEZ-BEATO; SANCHEZ-AGUILERA; PIRIS et al., 2003).

Em adenocarcinoma gástrico primário, por exemplo, a hipermetilação da região promotora de p16INK4a é a alteração predominante (34% dos casos), enquanto que deleções ou mutações são eventos mais raros (0-2%) (ROCCO; DIDRANSKY, 2001). De modo similar, a hipermetilação da região promotora de p16INK4a é predominante em carcinoma hepatocelular (73% dos casos) (KANETO et al., 2001), em adenocarcinoma ductal do pâncreas (52% dos casos) (ATTRI et al., 2005) e em tumores do pulmão (52.5% dos casos) (LIU et al., 2006).

Um estudo feito em linhagens de tumor mamário canino mostrou que as alterações ocorridas neste gene promovem certa malignidade para as células. E os defeitos que estavam presentes neste gene, apareceram também no gene p15INK4b (LUTFUL KABIR et al., 2013).

Em linfoma canino, foi evidenciado que a inativação do gene p16INK4a pode ocorrer pela metilação do DNA ou deleção, e estes tem sido relatado às malignidades linfóides em cães. Além disso, a inativação do gene p16NK4a foi correlacionada com mau prognóstico em cães com linfoma de células T de alto grau (FOSMIRE et al, 2007; MODIANO et al, 2007).

A inativação das vias da p53 e da Rb/E2F pode ocorrer por vários mecanismos e em diversos cânceres humanos, incluindo glioblastoma, melanoma, adenocarcinoma pancreático, carcinoma da bexiga, entre outros (GIL; PETERS, 2006; KIM; SHARPLESS, 2006). Embora ambas as vias desempenhem papéis importantes na diferenciação, desenvolvimento embrionário e no reparo do DNA, os membros do locus INK4-ARF respondem de maneira enérgica contra o crescimento celular desenfreado ou ao estresse oncogênico. Portanto, o locus parece funcionar como um freio com duas “vertentes” contra o crescimento maligno (SHARPLESS, 2005).

A complexidade de funções em que esse locus está envolvido torna-o extremamente vulnerável a alterações genéticas, pois um único evento genético, como uma deleção, poderia influenciar simultaneamente múltiplos supressores tumorais (KIM; SHARPLESS, 2006). Além disso, algumas mutações de ponto e pequenas deleções no éxon 2 relacionadas com o câncer podem prejudicar tanto p16INK4a quanto p14ARF (KRESTY et al., 2008).

Estudos afirmam que a superexpressão de cada gene do locus leva à parada do ciclo celular no limite G1-G0, apoiando fortemente a ideia de que p16INK4a, p15INK4b e p14ARF constituem uma das defesas antitumorais primárias em humanos, os quais podem agir individualmente e/ou sinergicamente (LI; POI; TSAI, 2011).

Além dos mecanismos supracitados, outras alterações genéticas e epigenéticas são observadas no locus INK4/ARF, especialmente deleções, perda de heterozigosidade, mutações de ponto e mudanças no padrão de metilação, principalmente em tumores humanos, mas pouca informação existe a respeito destes genes e seus padrões de expressão em tumores caninos (FUJIWARA-IGARASHI et al, 2013).

1.5 Reguladores negativos do locus INK4/ARF

1.5.1 Gene BMI-1

O gene BMI-1 está localizado no cromossomo 2 em cães e é membro do complexo repressivo Polcomb 1 (PRC1), atuando como repressor transcricional de vários genes por meio da acetilação, metilação e mono-ubiquitinação das histonas e metilação da cromatina (SAUVAGEAU; SAUVAGEAU, 2010; SCHURINGA; VELLENGA, 2010).

Em relação às proteínas do grupo Polcomb, estas formam grandes complexos proteicos que estão envolvidos na repressão de genes através de modificações da organização da cromatina (SPARMANN; VAN, 2006).

Vários estudos demonstram que as proteínas pertencentes aos grupos PRC1 e PRC2 se ligam e reprimem diretamente o locus INK4-ARF (BANITO et al., 2009; MAERTENS et al., 2009), sendo que alterações genéticas e epigenéticas em qualquer proteína pertencente a ambos grupos podem causar diferentes neoplasias (LI; POI; TSAI, 2011).

O padrão de expressão de BMI-1 é ubíquo e os seus níveis de expressão são mais elevados no cérebro, esôfago, glândulas salivares, timo, rim, pulmões, gônadas, placenta, sangue e medula óssea (HUBER et al., 2011).

Desde a descoberta do envolvimento de BMI-1 no desenvolvimento de vários cânceres, a modulação da expressão de BMI-1 tem atraído a atenção como uma nova abordagem para a terapia do câncer. Crescentes evidências indicam que BMI-1 está superexpresso em vários cânceres, incluindo o câncer de mama (CHIBA et al., 2008; HE et al., 2009).

Em vários modelos de câncer, a BMI-1 mostra ser uma oncoproteína pré-requisito para a transformação, migração metastática e manutenção da malignidade (BRUGGEMAN et al., 2007; DOVEY et al., 2008; GLINSKY; BEREZOVSKA; GLINSKII, 2005).

Uma das vias mais estudadas da BMI-1 associada com o câncer é a repressão do locus INK4/ARF. A BMI-1 reprime direta ou indiretamente a transcrição de p16INK4a e/ou p14ARF por meio de uma dose-dependente, que como consequência, promove o aumento da proliferação celular (LIANGXIAN et al., 2011) (Figura 9). O silenciamento do promotor e a consequente perda da expressão do locus INK4/ARF tem sido importante tanto para a

Estudos evidenciaram uma elevada expressão do gene BMI-1 em células de câncer de mama, especialmente em células metastáticas. Essa correlação mostra que este gene há um papel extremamente importante no aparecimento de metástase em câncer de mama (LI et al., 2014).

O gene BMI-1 induz a transição epitélio-mesenquimal (EMT) em câncer de mama induzindo a migração e invasão celular e metástase, evidenciando assim, a hiperexpressão deste gene em câncer mamário (LI et al., 2014).

1.5.2 Gene MYC

O oncogene MYC está localizado no cromossomo 13 nos cães e está envolvido em várias funções celulares, como regulação do ciclo celular, parada do crescimento celular, adesão, metabolismo, síntese de ribossomos, de proteínas e função mitocondrial. Logo, tem sido apontado como um elemento chave em vários processos de carcinogênese em humanos, sendo o aumento de sua expressão amplamente encontrado em diversos tumores humanos (OSTER et al., 2002; CALCAGNO et al., 2008).

A expressão de MYC afeta diversos genes envolvidos em funções importantes na célula. Acredita-se que MYC tenha um efeito em cerca de 15% dos genes em um genoma, de moscas a humanos (OSTER et al., 2002; FERNANDEZ et al., 2003; ZELLER et al., 2006). Portanto, é reconhecido que desregulação na expressão deste gene é um evento importante para a patogênese e progressão do câncer, sendo a alteração de apenas um alelo, suficiente para conduzir a transformação celular *in vitro* e *in vivo* (CHUNG; LEVENS, 2005; GREGORY; QI; RANN, 2005).

A desregulação do gene MYC em neoplasias humanas é geralmente associada com o aumento da sua expressão, principalmente por amplificação gênica e translocação cromossômica (VITA; HENRIKSSON, 2006). Além disso, alguns estudos tem associado superexpressão de MYC com a hipometilação de seu promotor, especialmente em condições na qual há deficiência de radicais metil (CHEN et al., 2001; DU et al., 2009).

O gene MYC regula vários genes que codificam reguladores do ciclo celular, dentre eles, ciclinas do tipo D, ciclinas dependentes de quinase (CDK) 4 e ciclinas do tipo E, que regulam a progressão da fase G1, assim como também regulam as proteínas E2F, que são

essenciais para a iniciação da síntese de DNA. Este gene também regula os genes inibidores de CDK, dentre eles p21CIP, p27KIP e p15INK4b, inibindo essa progressão da fase G1 para fase S do ciclo celular. Por conta disso, as proteínas MYC regulam as taxas de crescimento celular e a progressão da fase G1-S através de efeitos coordenados de vários genes (HIPFNER; COHEN, 2004) (Figura 10).

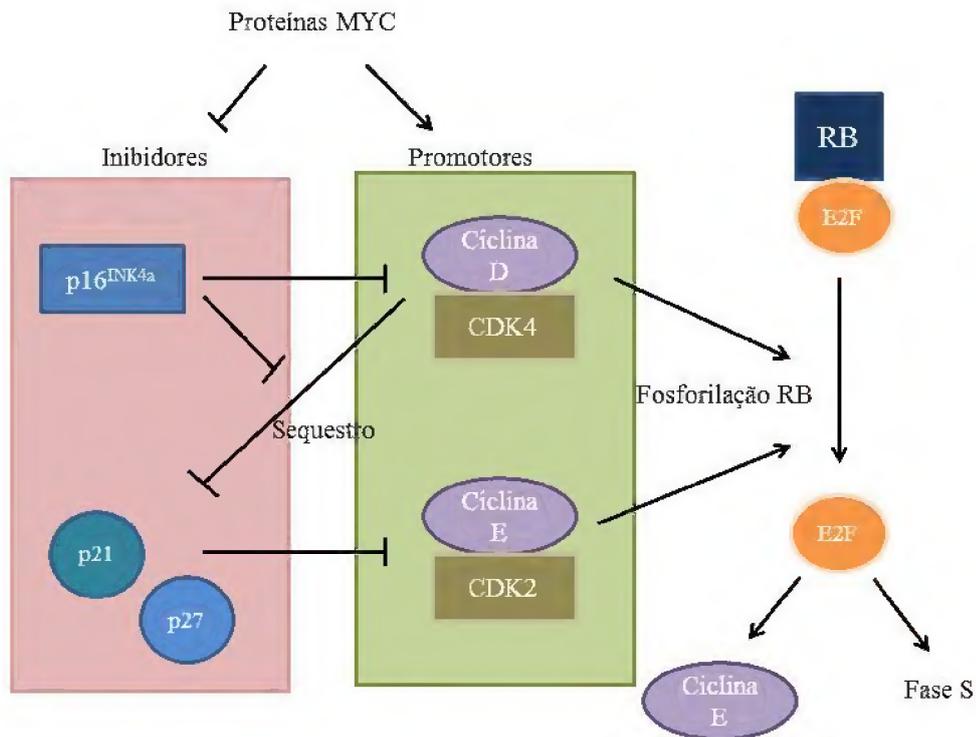


Figura 10: A proteína MYC atua nos dois lados do ciclo celular, tanto bloqueando p16^{INK4a} quanto induzindo a formação do complexo CDK4-ciclina D. Além disso, o complexo CDK4-ciclina D tem a habilidade de sequestrar genes da família CIP/KIP favorecendo ainda mais a fosforilação da proteína RB e a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Adaptado de HIPFNER; COHEN (2004).

A hiperexpressão de MYC está evidenciada em diversos tipos de câncer, como em melanoma, astrocitomas, carcinoma de colo de útero e 45% dos carcinomas mamários apresentaram essa hiperexpressão do gene (SCHMITT; REIS FILHO, 2003; BLANCATO et al.; 2004).

1.5.3 Gene TBX2

Baseado em estudos filogenéticos e de expressão, a família foi dividida em cinco subfamílias, nomeadamente T, TBX1, TBX2, TBX6 e T-brain1. São caracterizados por um domínio de ligação de DNA altamente conservado, denominado T-box, o qual se liga a sequência GGTGTGA, referida como o elemento-T. Fatores T-box tem se mostrado como ativadores transcricionais ou repressores, embora existam alguns que parecem ser capazes de ambos (WANSLEBEN, et al., 2014).

Em humanos, o gene T-box fator de transcrição 2 (TBX2) é amplamente expresso e está envolvido na morfogênese de uma variedade de tecidos e órgãos, incluindo coração, pulmões, rins, glândulas mamárias, testículo e estruturas cranianas (SINCLAIR et al., 2002; FAN et al., 2004; WANSLEBEN et al., 2014). Em cães, TBX2 está localizado no cromossomo 9 e desempenha papéis críticos no desenvolvimento embrionário (ZHANG et al., 2014).

Este gene está envolvido no desenvolvimento normal da mama, e estudos tem mostrados que a sua expressão alterada pode ser importante para a patogênese do câncer mamário (JACOBS et al., 2000; SINCLAIR et al., 2002).

A hiperexpressão de TBX2 no câncer foi demonstrado pela primeira vez em uma variedade de tecidos de câncer de mama e linhagens celulares (JACOBS et al., 2000; SINCLAIR et al., 2002) sendo que essa hiperexpressão correlaciona-se com um mau prognóstico (WANG et al., 2012). Posteriormente, este gene foi observado hiperexpresso em diversos cânceres, como em câncer pancreático, coloretal, melanoma, endométrio, ovário e câncer de colo do útero e recentemente em rabdomiossarcomas (WANSLEBEN, et al., 2014). Evidências sugerem que esta superexpressão promove desregulação nos pontos chaves da proliferação celular (PERES et al. 2010; ABRAHAMS et al., 2010).

O gene TBX2 apresenta uma função oncogênica através do bloqueio dos genes p21 e p19, e isso promove uma proliferação descontrolada das células levando ao processo de tumorigênese. Além disso, a sua hiperexpressão favorece o aparecimento de defeitos no DNA e confere às células uma resistência às drogas quimioterápicas (ABRAHAMS et al., 2010) (Figura 11).

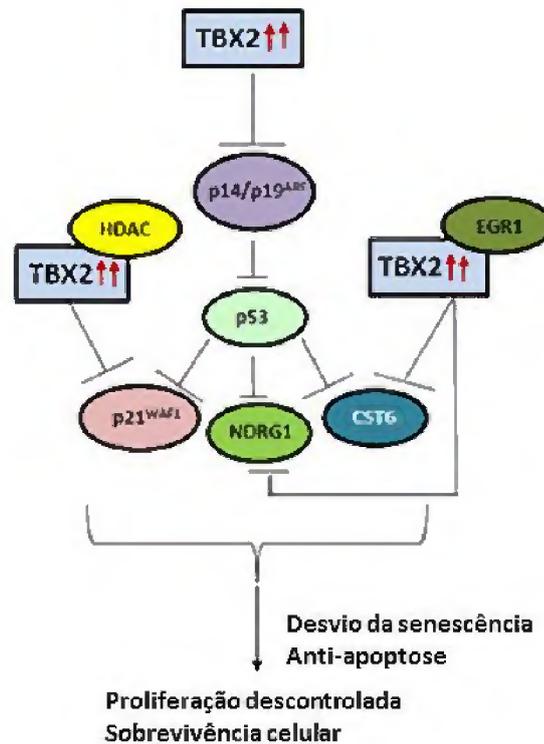


Figura 11: Função oncogênica do gene TBX2 através do bloqueio de p14ARF fazendo com que as células anormais desviem da senescência. Além disso, TBX2 tem a capacidade de recrutar histonas desacetilases (HDAC) para o promotor do gene p21, inibindo sua ação e facilitando o processo de sobrevivência celular. Adaptado de Wansleben et al. (2014).

Estudos realizados em células de melanoma de camundongos, evidenciaram que o gene TBX2 hiperexpresso silenciava o gene p21 através da sua capacidade de recrutar histonas desacetilases 1 (HDAC1) para o promotor do gene, silenciando o mesmo e favorecendo então, a proliferação descontrolada das células tumorais (WANSLEBEN et al., 2014).

Há uma hipótese em que o TBX2 regula a proliferação celular através a repressão transcricional de genes como p19ARF, p16INK4a , p15INK4b e p21 (JACOBS et al, 2000;. LINGBEEK et al, 2002;. PRINCE et al., 2004). Jacobs e colaboradores (2000) evidenciaram em suas pesquisas que fibroblastos que expressaram TBX2 apresentaram redução na transcrição de p16INK4a e p15INK4b. Trabalhos posteriores mostraram que o promotores de p19ARF contém um elemento T-box de ligação funcional (LINGBEEK et al., 2002). Outros pesquisadores demonstraram que TBX2 pode regular especificamente a transcrição de p21 (PRINCE et al., 2004).

Estes resultados, em combinação com a observação de que TBX2 está amplificado, e, por vezes, hiperexpresso, num subconjunto de tumores de mama primário, linhagens de tumor

de mama e pâncreas levou à hipótese de que TBX2 regula a proliferação celular ou apoptose através de p21, p15INK4b, p16INK4a, e / ou p19ARF e p53.

De uma forma geral, o que podemos observar é que os genes do Locus INK4/ARF podem ser regulados negativamente por vários genes, dentre eles BMI-1, MYC e TBX2 (Figura 12), e isso então pode ser um dos fatores que influencie o aparecimento do câncer mamário em canino.

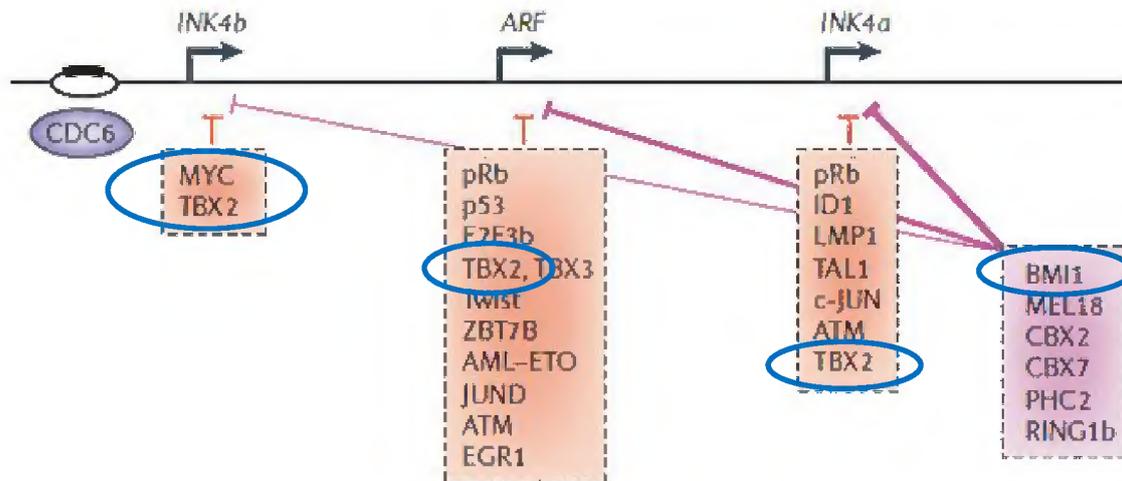


Figura 12: Tanto gene TBX2 quanto gene BMI-1, tem a capacidade de bloquear os três genes do Locus, enquanto que o gene MYC, tem função de bloqueio sobre o gene p15INK4b.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a expressão e o padrão de metilação de genes do locus INK4, p15INK4b e p16INK4a, e seus reguladores, BMI-1, MYC e TBX2, em tumores mamários caninos no estado do Pará.

Objetivos específicos:

- i. Avaliar o padrão de metilação dos genes p15INK4b e p16INK4a, e seus reguladores, BMI-1, MYC e TBX2 pela técnica de BSP, em tumores mamários caninos;
- ii. Avaliar a expressão dos genes supracitados por RT-PCR (Real Time - PCR), exceto o gene p16INK4a, pois não há sonda comercial disponível, em tumores mamários de cadelas atendidas no Hospital Veterinário (HOVET) da UFRA;
- iii. Correlacionar os resultados encontrados e avaliar a existência de associação dos mesmos com o diagnóstico histopatológico, características clínicas e sobrevida dos pacientes analisados, visando o patenteamento de kits de diagnóstico e prognóstico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Foram analisadas 85 amostras coletadas provenientes de 40 animais submetidos à mastectomia no Hospital Veterinário da UFRA (HOVET), além de duas amostras controles de animais totalmente sadios (Anexo 1). Foram coletados fragmentos de tecido neoplásico e não-neoplásico do mesmo animal, sendo os mesmos armazenados em microtubos contendo solução de RNA Later® (Ambion Inc.) até a extração de ácidos nucléicos. O diagnóstico histopatológico, bem como o auxílio na coleta das amostras, foi feito pela equipe do Dr. Washington Pereira (ISPA-UFRA). Ressalta-se que este estudo possui aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal Rural da Amazônia (Protocolo 001/2013 CEUA – 23084.000265/2013-53 UFRA) (Anexo 2) e que os donos dos animais assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de doação das amostras (TCLE) (Anexo 3).

3.2 Extração de DNA

Parte do tecido coletado foi utilizado para extração de DNA, pelo método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), com algumas modificações:

- Transferir cerca de 20 mg do tecido para um microtubo estéril de 1,5ml.
- Adicionar 300 µl de tampão de homogeneização, 300 µl de tampão de lise e 20 µl de Proteinase K (10 mg/ml). Misturar por inversão e incubar em banho-maria por 30 minutos a 55°C.
- Adicionar 700 µl de fenol-clorofórmio à mistura para a precipitação de proteínas. Homogeneizar por inversão por 10 minutos, e centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos. Transferir o sobrenadante para outro microtubo.
- Adicionar 700 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e repetir o procedimento de homogeneização e centrifugação da etapa anterior. Transferir o sobrenadante para outro microtubo, e adicionar 70 µl de acetato de sódio (AcNa) 3M pH 4,8 e 700 µl de isopropanol para a precipitação do DNA.
- Centrifugar a amostra por 10 minutos a 14.000 rpm e descartar o sobrenadante. Adicionar 300 µl de etanol 70%, centrifugar por 5 minutos a 14.000 rpm e o descartar cuidadosamente o sobrenadante para não haver perdas do precipitado de DNA (pellet). O DNA será, então, secado a 37°C na estufa e dissolvido em tampão TE pH 8,0.

3.3 Análise do padrão de metilação

Para análise do padrão de metilação da região desejada, o DNA obtido foi submetido à modificação utilizando o kit comercial EZ DNA Methylation-Lightning (Zymo Research). Tal reação se baseia no fato do bissulfito promover uma modificação química em citosinas não metiladas, convertendo-as em uracilas, sendo que as citosinas metiladas (5- metilcitosinas) permanecem como citosinas. Foram desenhados iniciadores utilizando o software Methyl Primer Express v. 1.0 (Applied Biosystems) para os fragmentos dos cinco genes utilizados na amplificação do DNA modificado via PCR (Tabela 1). Foram consideradas metiladas, amostras que apresentaram uma porcentagem maior ou igual a 20% de sítios metilados, de acordo com Akiyama (2009) e Schug e Overton (2009). A análise da metilação foi feita no software BiQ Analyzer (BOCK et al., 2008).

Tabela 1: Sequências de iniciadores utilizadas para realização da análise epigenética com suas respectivas temperaturas de anelamento.

Primer	T.A. (°C)	Sequência 5' – 3'	Tamanho do fragmento	Quantidade de Ilhas CpG
p15 Met F	59	GTGAGGTTGTGGGGTTTAG	354pb	15
p15 Met R		AACCTCCCAATACAAATAATTCA		
p16 Met F	59	GTAGTAGAATAGAGGAGGGGTGA	295pb	37
p16 Met R		ACCTAATCCCACATCCTCTATTA		
BMI-1 Met F	52	GTAAAATTTTTTTATGGATTTT	334pb	28
BMI-1 Met R		AATATAAATTACTATAAAAACCCC		
MYC Met F	55	GGAGAAGTTGGTTTTTTATTAG	444pb	37
MYC Met R		TTTCCCTTCCTAAAACATAAAA		
TBX2 Met F	59	TGGTGTGGTGTTTATTGTGT	328pb	26
TBX2 Met R		TTACATACCAAATCCAAATATACAAC		

3.4 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

O produto amplificado purificado foi sequenciado pelo método didesoxiterminal, de acordo com a metodologia descrita por Sanger et al. (1977). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standard (Life Technologies) versão 3.1, e submetida à eletroforese capilar, no sequenciador automático ABI 3130 (Life Technologies). As sequências foram obtidas na forma de eletroferograma e analisadas utilizando o programa BioEdit v. 7.2.5 (HALL, 1999).

3.5 Análise da expressão gênica

O RNA total das amostras foi obtido utilizando o kit comercial All Prep (Quiagen), seguindo as instruções do fabricante. A conversão a cDNA foi realizada com o auxílio do kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies) usando a detecção por sonda Taqman. Para a detecção dos níveis de RNA mensageiros de cada gene, foram escolhidas sondas comerciais (Life Technologies), enquanto que a emissão da fluorescência foi captada com o auxílio do ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Life Technologies).

Os valores de expressão dos cDNA obtidos foram normalizados em relação ao nível correspondente de expressão dos genes HPRT canino (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) e RPL32 canino (Ribosomal protein L32), utilizados como controles constitutivos.

3.6 Análise estatística

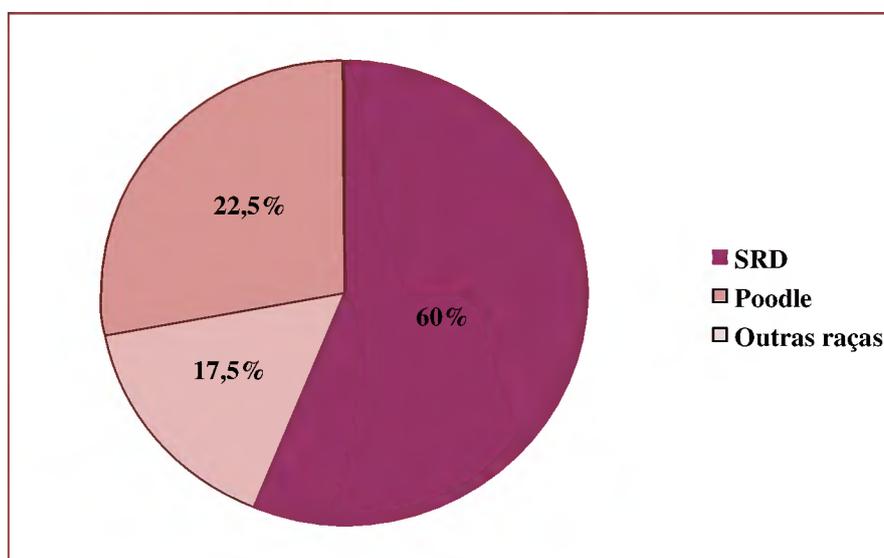
A análise de significância estatística, para avaliar as associações dos padrões de metilação com os níveis de expressão, e destes com progressão tumoral e demais características clinicopatológicas, foi realizada no programa GraphPad Prism versão 5.01 (www.graphpad.com) através dos testes estatísticos Qui-quadrado (com correção de Yates) (χ^2) e Odds Ratio (OR), sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2 Caracterização da população estudada

Nosso banco de dados contém 85 amostras provenientes de 40 animais, sendo 46 de tecidos neoplásicos e 39 de tecidos adjacentes do mesmo animal. Em relação às raças, 24 animais são sem raça definida (SRD), o que representa 60%. Nove animais são da raça Poodle (22,5%) e sete animais (17,5%) são de outras raças (Gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição racial.



Algumas raças são apontadas com maior incidência ao desenvolvimento de tumores mamários como Boxer, English Springer Spaniel, Poodle, Cocker Spaniel, Dachshund, English Setter and Fox Terrier (ARNESEN et al., 2001; RIVERA et al., 2009; BORGE et al., 2010). Ainda, segundo Daleck (2008), no Brasil, há uma incidência alta de pacientes sem raça definida (SRD) diagnosticados com tumores mamários.

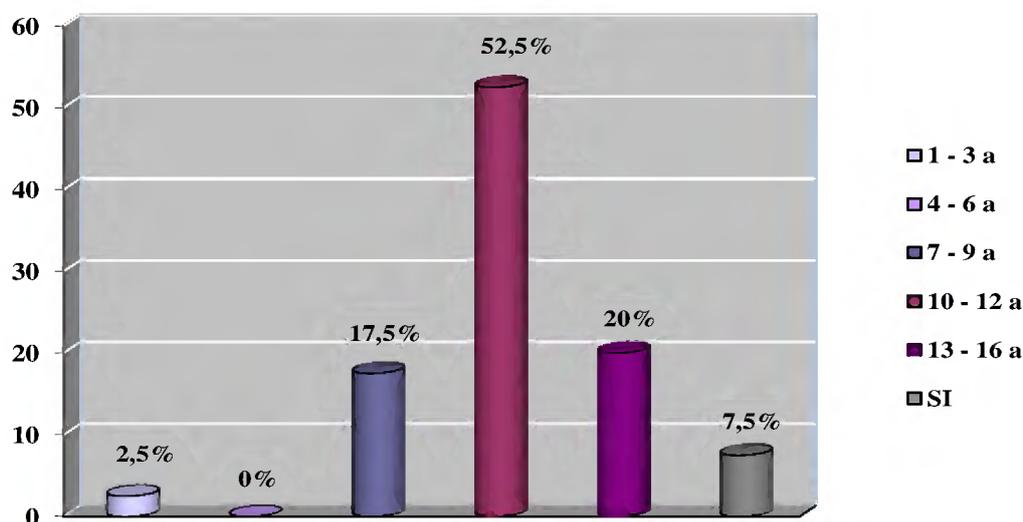
Neste estudo houve uma maior prevalência de câncer em pacientes SRDs, seguidos da raça Poodle, não estando de acordo com os estudos de Arnesen et al. (2001), Rivera et al. (2009) e Borge et al. (2010), que afirma que esta doença acomete mais cães de raça, porém corroborando com os achados de Daleck et al. (2008). DIZER QUE É NO HOVET E ISSO PODE INFLUENCIAR NO NÚMERO DE SRD

Com a relação à origem histopatológica, 34 amostras são de origem epitelial, caracterizando-se como carcinomas (74%) e 12 são de origem do tecido conjuntivo,

caracterizando os sarcomas (26%). Dados similares foram encontrados por Filho et al. (2010), em que também encontrou uma porcentagem de carcinomas maior que sarcomas.

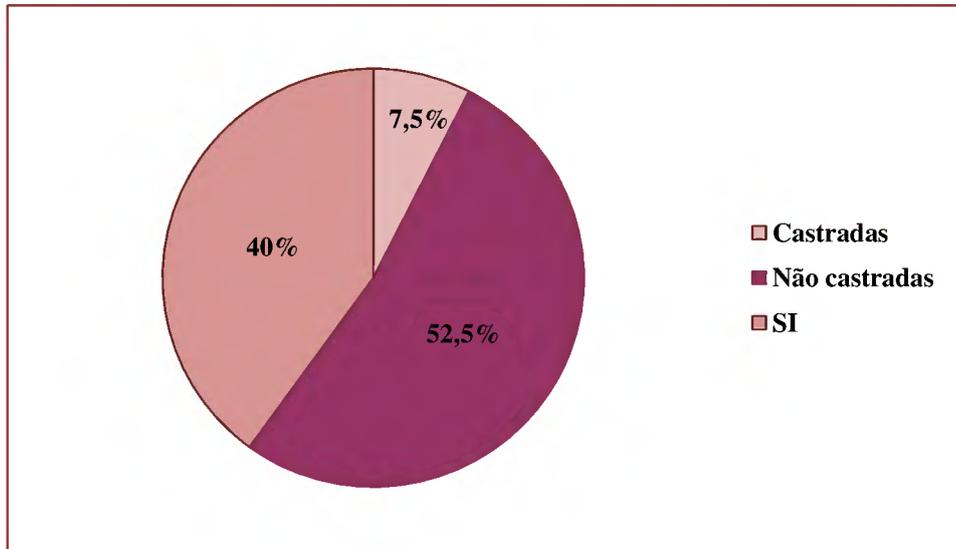
A idade dos animais acometidos pelo câncer de mama variou de 1 a 16 anos, com uma média de 10,6 anos. Segundo Dalek (2008), o câncer de mama em caninos, geralmente é detectado em pacientes de meia idade a idosos (7 -12 anos), corroborando com a média de idade encontrada neste estudo, já que 37 animais (92,5%) apresentaram idade maior ou igual a 7 anos, demonstrando a importância do fator idade para o aparecimento dessa doença (MUTO et al., 2000; SOUZA, 2006). A maior frequência dos tumores em animais mais velhos pode ser decorrente destes terem passado por mais ciclos estrais, sendo submetidos a mudanças hormonais cíclicas fisiológicas, e, portanto, mais propensos à carcinogênese (SILVA et al., 2004). Também foi observada uma maior frequência de animais com a doença na faixa etária entre 10 a 12 anos, representando 52,5% (Gráfico 2), dados corroborados pelo estudo de Gupta et al. (2012), que encontraram uma maior incidência nessa faixa etária (31%).

Gráfico 2: Incidência de câncer mamário canino de acordo com a idade em anos. SI= Sem Informação.



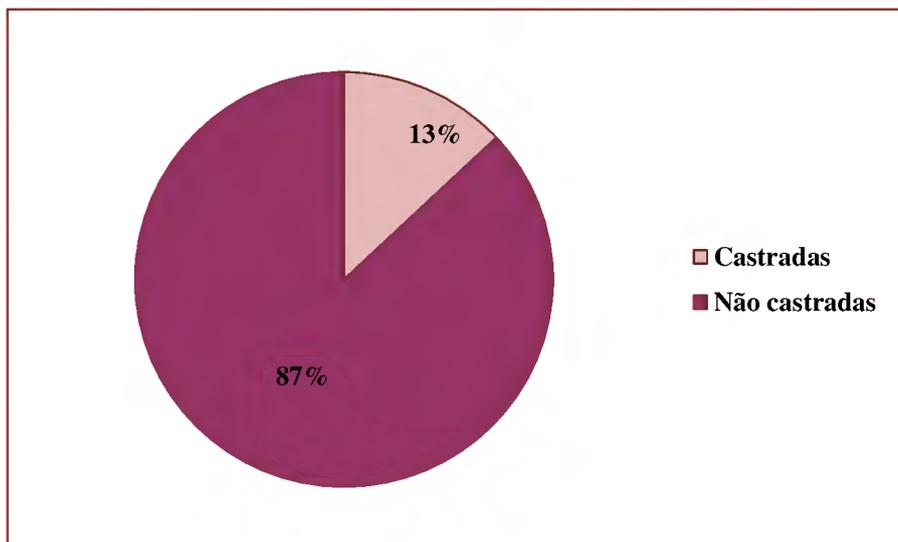
Em relação à castração destes animais, 52,5% deles não eram castrados (Gráfico 3). Segundo Rivera et al. (2009) e Sorenmo et al. (2011), a castração quando realizada antes do primeiro estro, diminui o risco de desenvolvimento da neoplasia mamária para 0,5%, sendo este tipo de câncer o mais relatado em cadelas não castradas, o que pode indicar que o tipo de status reprodutivo possa ter favorecido o desenvolvimento tumor.

Gráfico 3: Porcentagem de animais castrados e não castrados. SI= Sem Informação.



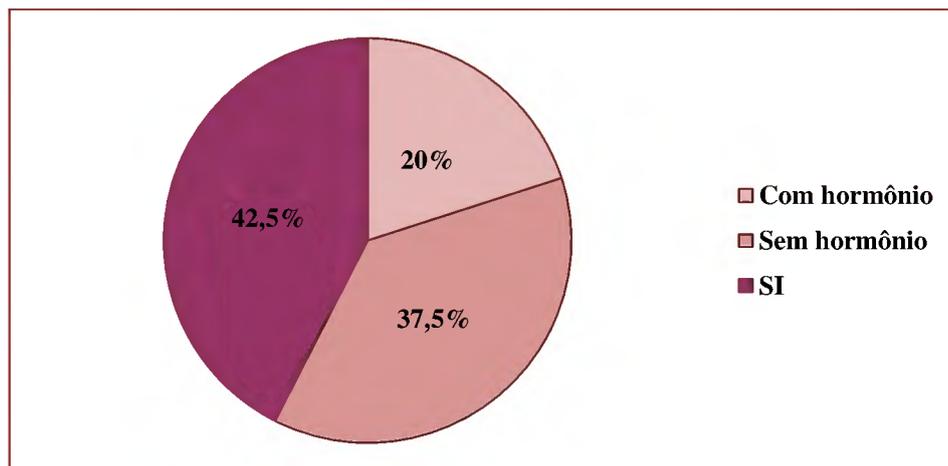
Em outra análise feita somente com os animais que apresentam a informação, observamos que a porcentagem de cadelas não castradas é bem maior que as castradas, o que pode influenciar no aparecimento da doença, já que o animal acaba entrando em mais ciclos reprodutivos (Gráfico 4).

Gráfico 4: Porcentagem de animais castrados e não castrados com informação.



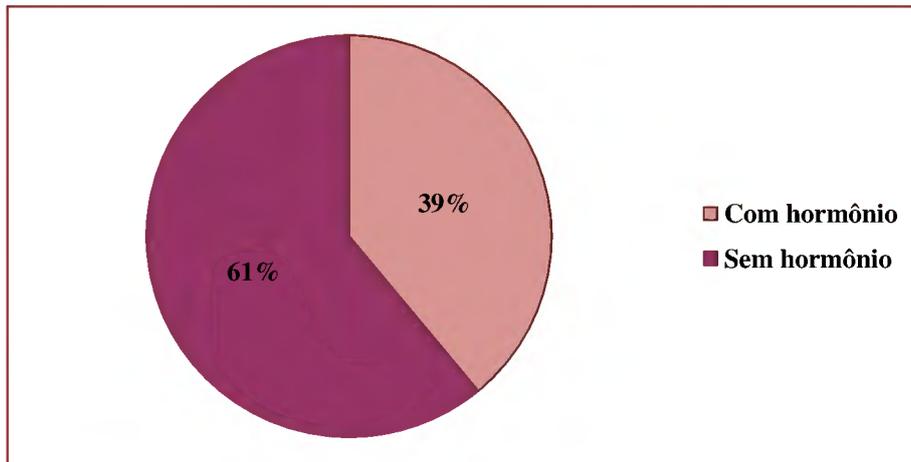
Do total de animais, 37,5% não foram expostos ao uso de anticoncepcionais pelos proprietários e 20% foram submetidos ao uso de hormônios, sendo os demais animais sem essas informações. Segundo Sorenmo (2003), o desenvolvimento de tumores mamários em cadelas é dependente da exposição dos ovários a hormônios, sugerindo que a exposição cumulativa ao estrógeno possa favorecer a formação tumoral. Além disso, pacientes expostos à administração prolongada de progestágenos sintéticos tiveram um aumento na incidência de tumores benignos, assim como, um aumento na incidência tardia de tumores malignos (Daleck et al., 2008). Mais da metade dos animais não entraram em contato com hormônios exógenos, sugerindo então, que estes achados não estejam contribuindo para o desenvolvimento neoplásico em metade da população estudada (Gráfico 5).

Gráfico 5: Porcentagem de animais que entraram ou não em contato com hormônios exógenos. SI= Sem Informação.



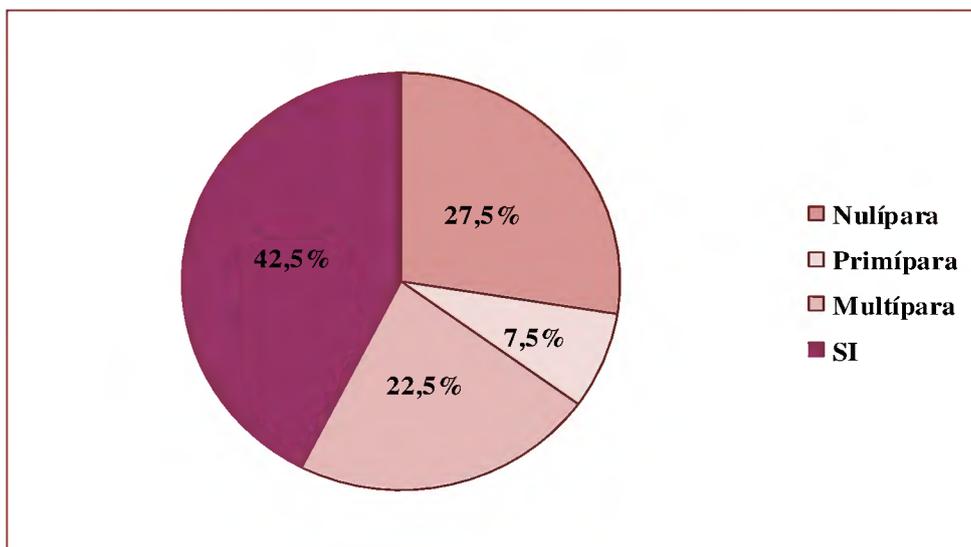
Para os animais com informação, mais da metade dos animais não entraram em contato com hormônios exógenos (Gráfico 6).

Gráfico 6: Porcentagem de animais com informação que entraram ou não em contato com hormônios exógenos.



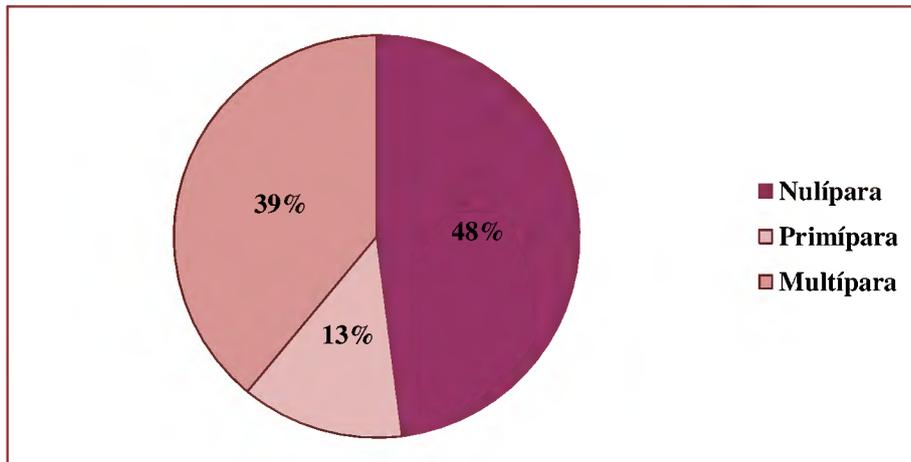
Em relação à prenhez destas fêmeas, 27,5% nunca gestacionaram, 7,5% gestacionaram uma vez e 22,5% gestacionaram pelo menos duas vezes (Gráfico 7). Segundo Daleck (2008), em caninos, o efeito gestacional protetor observado em mulheres não está bem definido e, portanto, não se pode afirmar se esta característica possui influência no desenvolvimento tumoral em cadelas.

Gráfico 7: Distribuição dos animais em relação à reprodução. SI- Sem Informação.



Excluindo as animais que não tinham informação sobre o status reprodutivo, observamos que o número de animais nulíparas também prevaleceu (Gráfico 8).

Gráfico 8: Distribuição dos animais com informação em relação à reprodução.



Já em relação à pseudociese, 27,5% não tiveram gestações psicológicas, o que não teve uma discrepância com as fêmeas que apresentaram a gestação psicológica (25%) (Gráfico 9), assim como a análise feita somente com animais que tinham a informação (Gráfico 10).

Gráfico 9: Distribuição dos animais com relação à pseudociese. SI= Sem Informação.

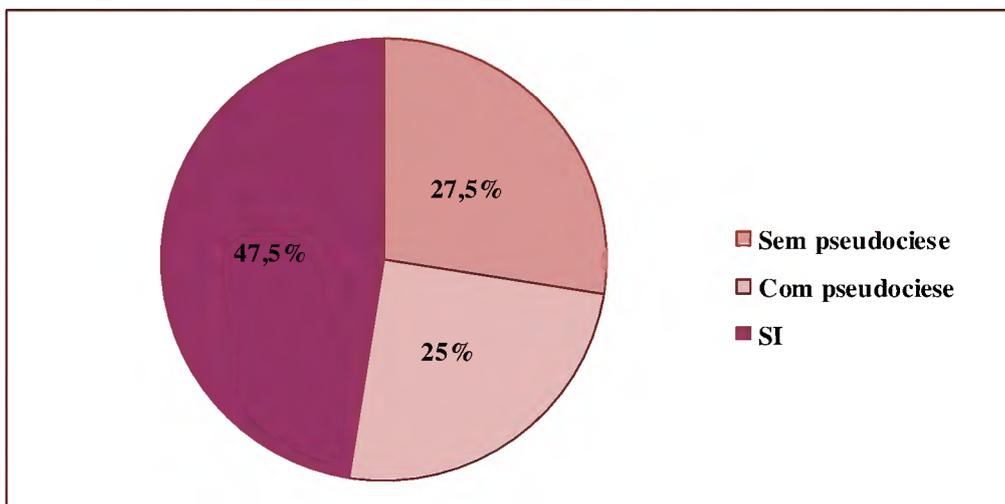
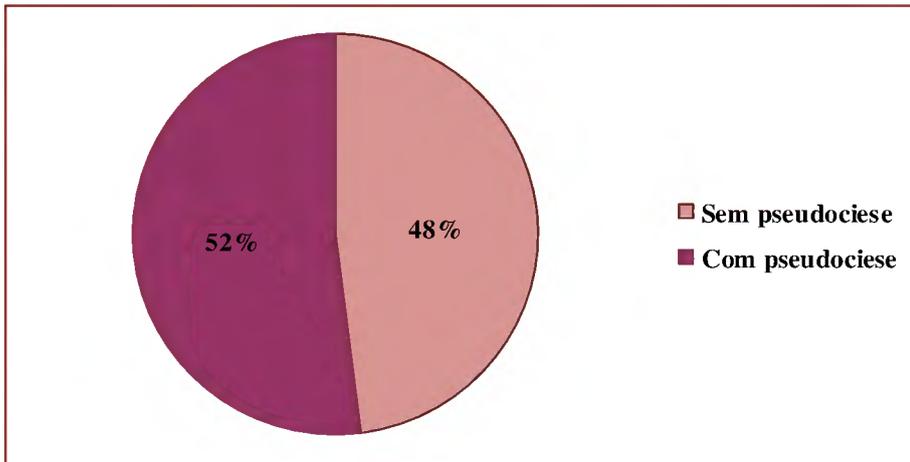


Gráfico 10: Distribuição dos animais com informação em relação à pseudociese.



4.2 Análises da metilação e expressão dos genes estudados

Para análise da metilação, das 85 amostras totais, foram analisadas 75 amostras para o gene p15INK4b, 68 amostras para o gene p16INK4a, 78 amostras para o gene BMI-1, 64 amostras para o gene MYC e 78 amostras para o gene TBX2, além de duas amostras de animais sem histórico de tumor utilizadas como controles (Tabelas 2, 3).

Tabela 2: Total de amostras com padrão de metilação analisado para cada gene.

	p15INK4b	p16INK4a	BMI-1	MYC	TBX2
Amostras analisadas	75 amostras + 2 controles	68 amostras + 2 controles	78 amostras + 2 controles	64 amostras + 2 controles	78 amostras + 2 controles

Tabela 3: Amostras analisadas para metilação e expressão.

Amostras	Animais	Cód BioMol	HOVET	Raça	Idade	p15	p16	BMI-1	MYC	TBX2	X	p15	BMI-1	MYC	TBX2
1	1	BNB 331 (N)		Poodle	9m	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
2	2	BNB 337 (N)		?	7	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
1	1	BNB 01 (NT)	10881	SRD	15	Ok	Ok	Ok							
2		BNB 02 (T)	10881			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
3	2	BNB 03 (NT)	11072	SRD	10	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
4		BNB 04 (T)	11072			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok					
5	3	BNB 05 (NT)	10702	SRD	7	Ok		Ok	Ok			Ok	Ok	Ok	Ok
6		BNB 06 (T)	10702			Ok	Ok	Ok	Ok						
7	4	BNB 07 (NT)	8963	Poodle	10	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
8		BNB 08 (T)	8963			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok					
9	5	BNB 10 (NT)	11352	SRD	12	Ok	Ok	Ok	Ok			Ok	Ok	Ok	Ok
10		BNB 11 (T)	11352			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
11	6	BNB 12 (NT)	11440	SRD	12	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
12		BNB 13 (T)	11440			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
13	7	BNB 15 (NT)	11756	Pincher	10	Ok		Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
14		BNB 16 (T)	11756			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok					
15	8	BNB 17 (NT)	11841	SRD	10	Ok		Ok	Ok			Ok	Ok	Ok	Ok
16		BNB 18 (T)	11841									Ok	Ok	Ok	Ok
17	9	BNB 21 (NT)	11876	SRD	15	Ok		Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
18		BNB 22 (T)	11876			Ok		Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
19	10	BNB 23 (NT)	12102	SRD	15	Ok	Ok	Ok	Ok			Ok	Ok	Ok	Ok
20		BNB 24 (T)	12102			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
21	11	BNB 45 (NT)	12606	SRD	15	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok					
22		BNB 46 (T)	12606			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok					
23	12	BNB 50 (NT)	13411	SRD	8	Ok	Ok		Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
24		N71 (T)	13411			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
25	13	BNB 175 (NT)	-	Poodle	?	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok					

26		BNB 176 (T)	-			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	
27	14	BNB 217 C (T)	17366	Poodle	13			Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
28		BNB 218 (NT)	17366			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	
29	15	BNB 229 (T)	7351	SRD	11	Ok	Ok				Ok					
30		BNB 231 (NT)	7351			Ok	Ok	Ok			Ok					
31	16	BNB 234 (NT)	17989	Cocker Spaniel	?	Ok			Ok		Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
32		BNB 235 (T)	17989			Ok			Ok		Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
33	17	BNB 240 (T)	18088	Poodle	12	Ok			Ok		Ok					
34		BNB 241 (NT)	18088						Ok		Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
35	18	BNB 257 (NT)	19000	Doberman	12				Ok		Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
36		BNB 258 (T)	19000			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
37	19	BNB 262 (NT)	-	SRD	14	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok						
38		BNB 263 (T)	-			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
39	20	BNB 264 (NT)	17980	Dachshund	12	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
40		BNB 265 (T)	17980			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
41	21	BNB 266 (NT)	20362	SRD	10	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok						
42		BNB267 (T)	20362			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
43	22	BNB 273 (NT)	10177	SRD	?				Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok
44		BNB 274 (T)	10177				Ok		Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
45		BNB 275 (T)	10177			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
46	23	BNB 278 (NT)	20362	SRD	10	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok						
47		BNB 279 (T)	20362				Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
48		BNB 280 (T)	20362					Ok	Ok	Ok						
49	24	BNB 281 (NT)	15556	SRD	9	Ok	Ok		Ok	Ok						
50		BNB 282 (T)	15556				Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
51	25	BNB 300 (NT)	13501	SRD	12	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
52		BNB 301 (T)	13501			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
53	26	BNB 302 (NT)	21834	Poodle	12	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
54		BNB 303 (T)	21834				Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
55	27	BNB 308 (NT)	21712	SRD	10	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok

Dos cinco genes analisados, MYC e p16INK4a não apresentaram nenhuma alteração no padrão de metilação, encontrando-se desmetilados. O gene BMI-1, apresentou somente uma amostra hipermetilada (BNB 46), quando comparada com sua contraparte não tumoral (BNB 45), sendo essa amostra um carcinossarcoma grau II, proveniente de um animal sem raça definida com 15 anos de idade.

Os genes p15INK5b e TBX2 foram os que apresentaram uma porcentagem maior de metilação (Figuras 13A, 13B, 14A e 14B).

O gene p15INK4b apresentou-se metilado em 48 amostras (48/75), representando 58%, com o sítio 2 o de maior frequência de metilação. No entanto, quatro pares (BNB 03/BNB 04; BNB 05/BNB 06; BNB 50/N 71; BNB 333/BNB 335) apresentaram diferença no seu padrão de metilação, com as amostras tumorais apresentando hipermetilação comparado com a contraparte não tumoral, sendo dois carcinomas e somente um sarcoma e provenientes de animais com mais de sete anos, sendo dois sem raça definida e um da raça Poodle, enquanto a amostra N 71 apresentou-se hipometilada, quando comparada com a sua contraparte não tumoral. Essa amostra também é um carcinoma, proveniente de um animal SRD.

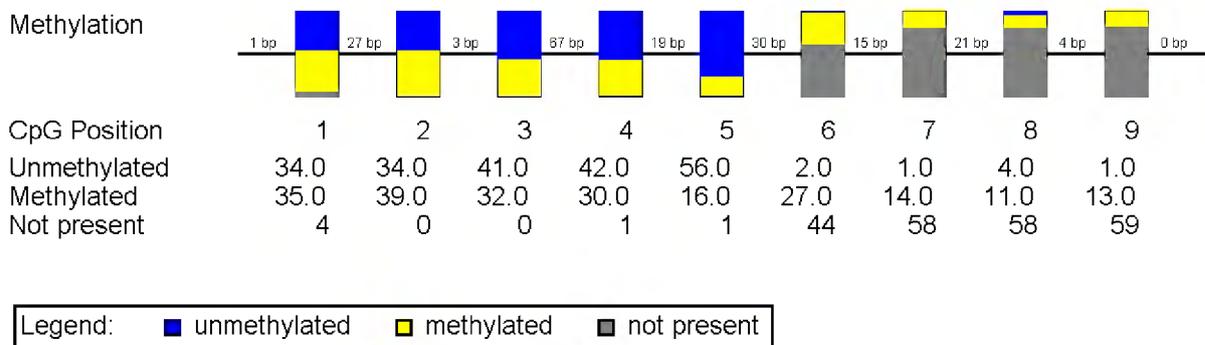


Figura 13A: Diagrama esquemático mostrando o padrão de metilação para cada sítio CpG na região promotora do gene p15INK4b.

[74]N77NT.txt	○	○	○	○	○
[73]N78T.txt	○	○	○	○	○
[72]N76T.txt	○	○	○	○	○
[71]N75NT.txt	○	○	○	○	○
[70]N73NT.txt	○	○	○	○	○
[69]N72T.txt	○	○	○	○	○
[68]N71T.txt	○	○	○	○	○
[67]BNB50NT.txt	●	●	●	●	●
[65]BNB45NT.txt	○	○	○	○	○
[64]BNB341NT.txt	○	○	○	○	○
[63]BNB340T.txt	○	○	○	○	○
[62]BNB339NT.txt	○	○	○	○	○
[61]BNB338T.txt	○	○	○	○	○
[59]BNB335NT.txt	○	○	○	○	○
[58]BNB334T.txt	○	○	○	○	○
[57]BNB333T.txt	●	●	●	●	○
[55]BNB330T.txt	●	●	●	○	○
[54]BNB328T.txt	●	●	○	○	○
[53]BNB327T.txt	○	○	○	○	○
[52]BNB321T.txt	○	○	○	○	○
[51]BNB320T.txt	●	●	○	○	○
[50]BNB319NT.txt	○	○	○	○	○
[49]BNB318T.txt	●	●	●	○	○
[48]BNB317T.txt	●	●	●	●	○
[47]BNB316NT.txt	●	●	●	●	○
[46]BNB315T.txt	○	○	○	○	○
[45]BNB314NT.txt	○	○	○	○	○
[44]BNB313T.txt	●	○	○	○	○
[43]BNB312NT.txt	●	●	●	○	○
[42]BNB310NT.txt	●	●	●	●	○
[41]BNB309T.txt	●	●	○	●	○

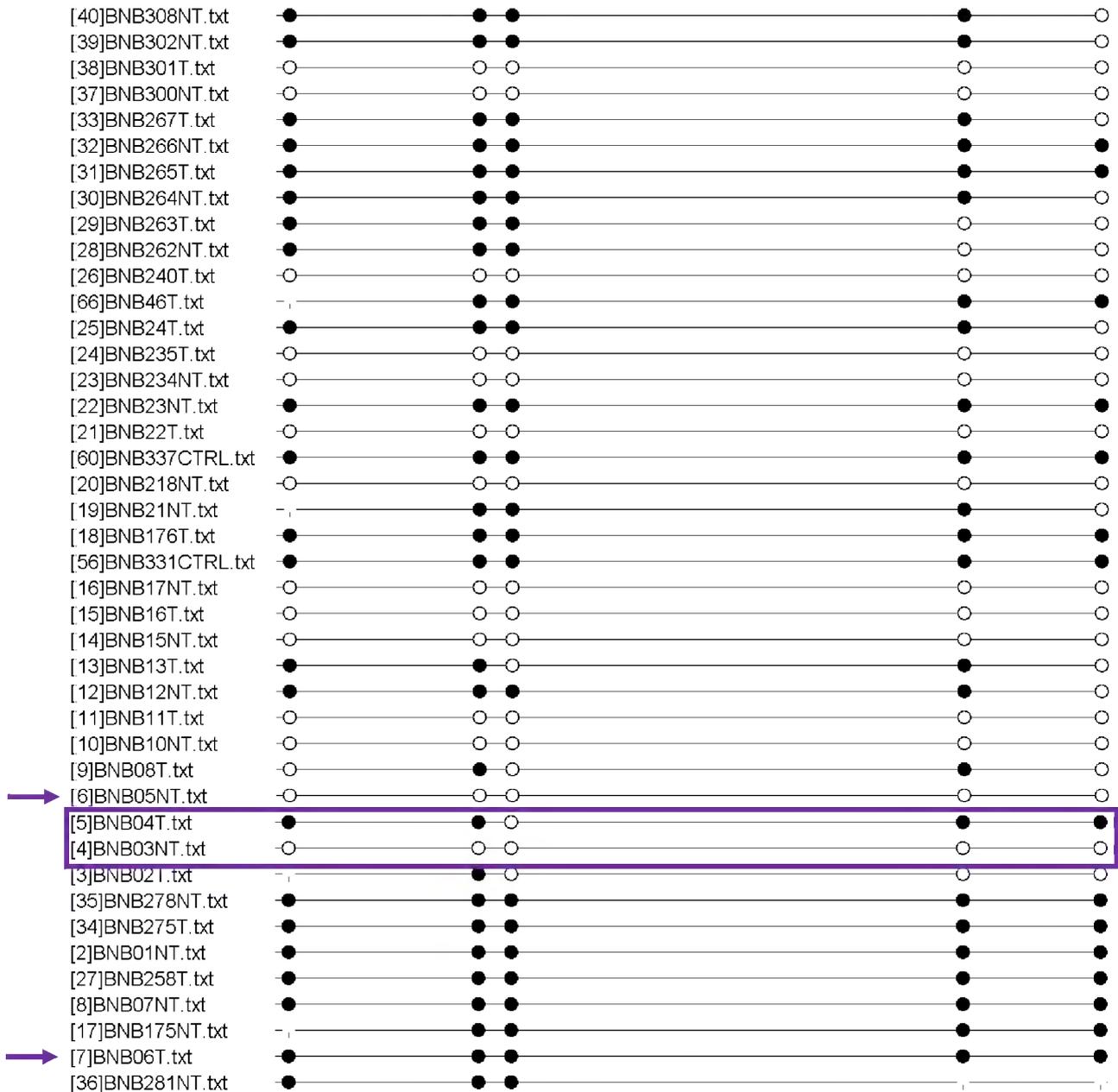


Figura 13B: Diagrama esquemático mostrando a diferença do padrão de metilação entre as amostras pareadas hipermetiladas do gene p15INK4b (retângulos e setas).

Para o gene TBX2, observamos que somente uma amostra mostrou-se hipometilada (BNB 24) quando comparada com sua contraparte não tumoral (BNB 23), sendo essa amostra um osteocondrossarcoma, proveniente de um animal sem raça definida de 15 anos de idade. Este animal não apresentou pseudociese nem entrou em contato com progestágenos exógenos, no decorrer de sua vida. O animal não era castrado e nunca gestacionou.

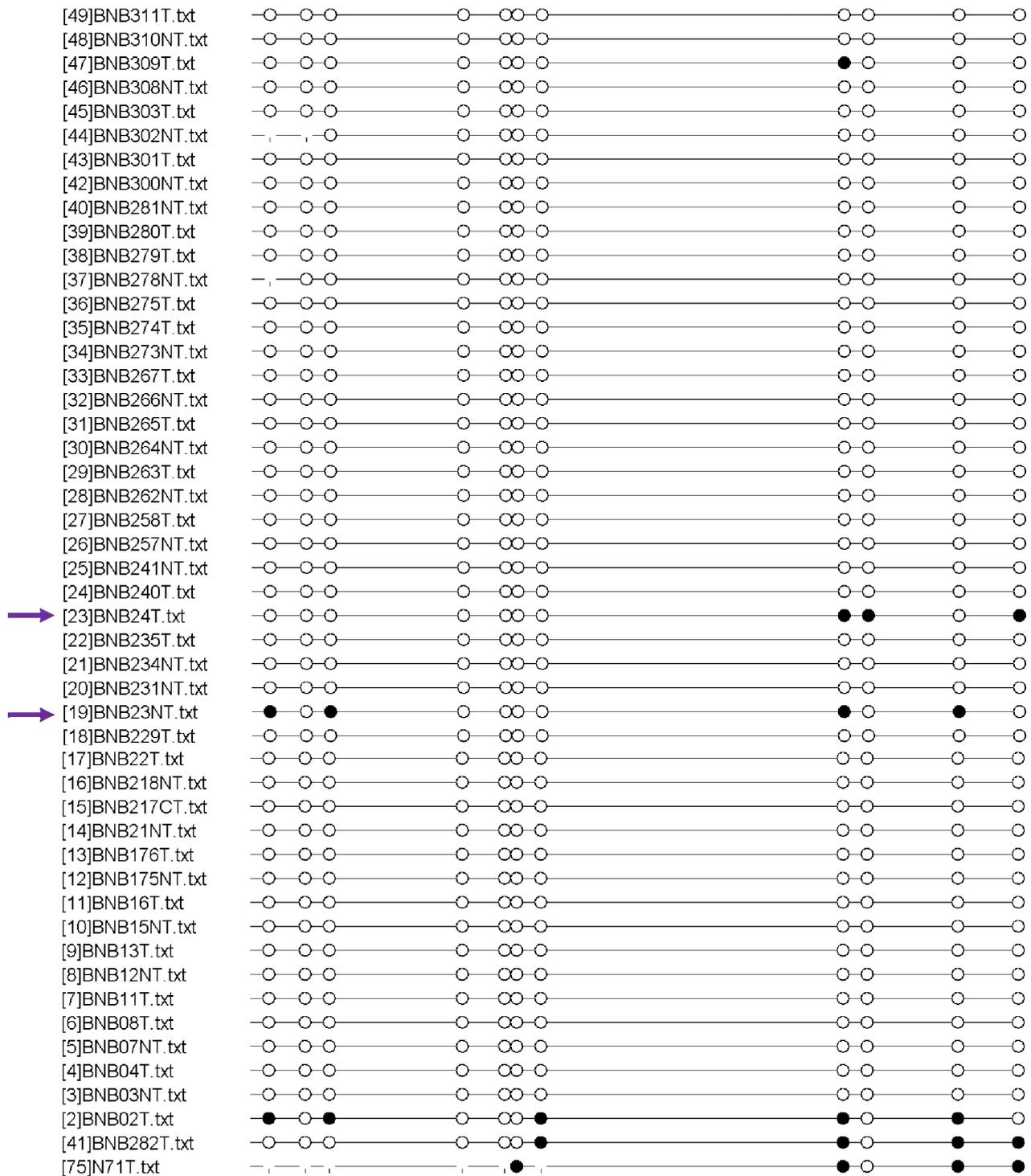


Figura 14B: Diagrama esquemático mostrando a diferença do padrão de metilação entre as amostras pareadas do gene TBX2 (setas).

Sobre a expressão dos genes, com exceção do gene p16INK4a, que não possui sonda comercial disponível, todos os genes alvos foram avaliados. Foram analisadas 66 amostras, dentre elas 49 pareadas e 17 não pareadas (Tabela 3). Quando todas as amostras foram avaliadas, observou-se que a expressão entre os genes comparada com as amostras normais

não variou com muita discrepância, exceto o gene p15INK4b que apresentou-se hiperexpresso, com um valor de RQ de 6,29 em carcinomas e 4,94 em sarcomas quando comparado ao tecido normal (RQ= 1,00) e TBX2 que teve uma diminuição da sua expressão, com valor RQ= 0,43 para carcinomas e RQ= 0,70 em sarcomas, quando comparados com tecido normal (RQ= 1,00) (Figura 15).

Para uma melhor análise, as amostras foram subdivididas em quatro grupos, sendo eles 1) Normal, composto de amostras controles; 2) Não tumoral, onde se encontram todas as amostras não tumorais pareadas e não pareadas; 3) Carcinoma e 4) Sarcoma.

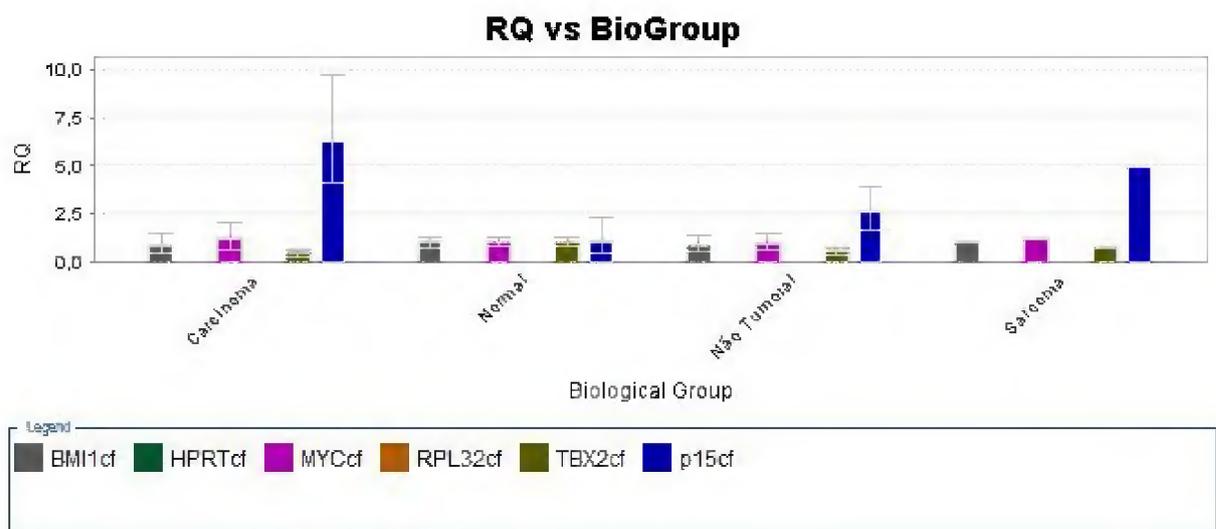


Figura 15: Comparação dos dados de expressão de todas as amostras avaliadas.

Em uma segunda análise, foram avaliadas somente as amostras pareadas, observamos uma diferença de quase 6 vezes na expressão de p15INK4b em carcinomas (RQ= 5,43) e em sarcomas uma diferença de quase 3 vezes (RQ= 2,59) quando comparados ao tecido normal (RQ= 1,00) (Figura 16). Para o gene TBX2, em carcinomas observamos um valor de RQ= 0,38 e em sarcomas RQ= 0,47.

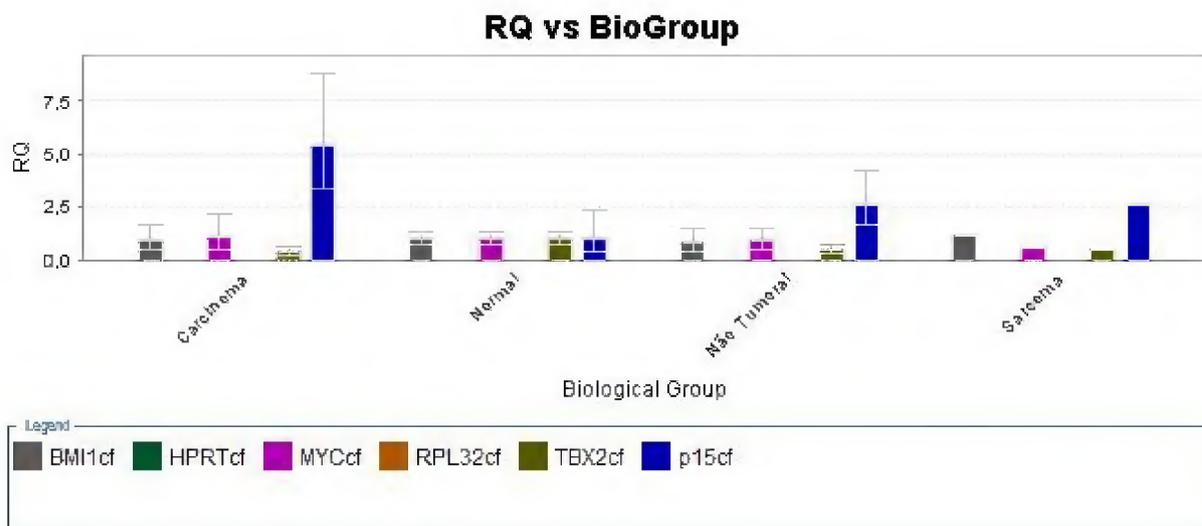


Figura 16: Comparação dos dados de expressão entre as amostras pareadas.

Em relação às análises estatísticas, pode-se observar que, apesar de alterada, o aumento da expressão do gene p15INK4b não favorece, no geral, o aparecimento de tumor mamário (OR= 3,15; p= 0,1464; IC95%= 0,8495-11,68) e nem em animais sem raça definida, apesar de um aumento de 11 vezes no risco de aparecimento da doença (OR= 11,33; IC95%= 1,047-122,6; p= 0,0775). Foi observado também que este aumento da expressão não favorece o aparecimento de tumores do tipo carcinoma (OR= 0,3400; IC95%= 0,03459-3,342; p= 0,6321), nem de sarcomas (OR= 2,941; IC95%= 0,2993-2891; p= 0,6321).

Resultado similar foi observado em relação a diminuição da expressão do gene TBX2, em que o risco de aparecimento da doença nas amostras em geral (OR= 1,827; p= 0,4574; IC95%= 0,597-5,766), bem como em SRD também não são estatisticamente significativos (OR= 1,733; p= 0,8093; IC95%= 0,3387- 8,871). A diminuição da expressão do gene TBX2 também não favorece o aparecimento de tumores do tipo carcinoma (OR= 2,333; p= 0,7786; IC95%= 0,3137-17,36).

Bisogna et al. (2001), ao estudarem linhagens de tumor mamário humano, não encontraram nenhuma alteração no padrão epigenético do gene p15INK4b, diferente dos nossos resultados, no qual encontramos um alto nível de metilação e ainda três amostras hipermetiladas. Estes autores, ainda afirmam que os genes p15INK4b e p16INK4a não são afetados simultaneamente, o que está de acordo com nossa pesquisa, já que p16INK4a não apresentou nenhuma alteração no padrão de metilação, diferentemente de p15INK4b.

Em um estudo em leucemia linfóide aguda de células T, Minamisawa et al. (2000) encontraram um nível de metilação nesse tipo tumoral muito baixo, afirmando que a hipermetilação do promotor do gene p16INK4a não é frequente. Além disso, esses mesmos autores observaram uma ausência de expressão do gene p15INK4b, apesar do gene não está metilado, resultado inverso aos nossos achados, em que p15INK4b está metilado na maioria das amostras e hipermetilado em quatro delas, e a expressão está aumentada, sugerindo então que este gene seja regulado por outros mecanismos epigenéticos, como por exemplo, micro RNA (LUTFUL KABIR ; DEINNOCENTES; BIRD, 2015).

Já em relação à baixa expressão de TBX2, um dos mecanismos de regulação que podem explicar estes achados é sugerido por Li et al. (2014a), que postulam que TBX2 e TBX3 desempenham papéis distintos na carcinogênese, sendo que TBX2 tem função pró-proliferativa e TBX3 inibe a proliferação, porém promove a migração e invasão tumoral. Apesar dos poucos estudos sobre os mecanismos regulatórios de TBX2 e TBX3, sabe-se que a via de sinalização TGF- β 1 reprime TBX2 transcricionalmente por um mecanismo mediado por TBX3. Esta via também acaba inibindo a expressão do gene MYC, o que explicaria a ausência de hiperexpressão de MYC.

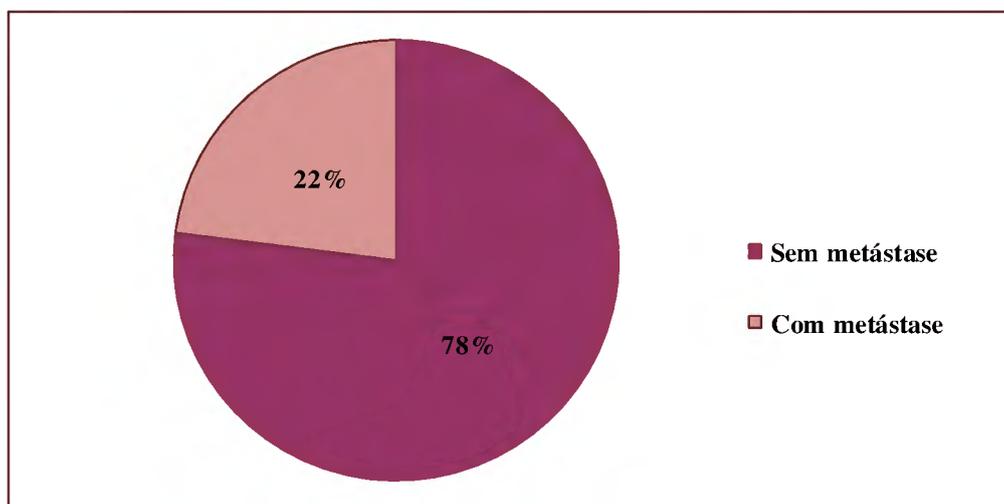
Outra relação interessante envolvendo a sinalização TGF- β 1, é que esta via, quando ativada, inibe a proliferação celular induzindo a parada do ciclo na fase G1 pela sua habilidade de regular positivamente a expressão de p15INK4b e p21 (WANSLEBEN et al., 2014). Tais mecanismos regulatórios poderiam explicar a baixa expressão de TBX2 e a alta expressão de p15INK4b.

Já em relação aos dados de metilação e expressão, os genes MYC e BMI-1 não apresentaram nenhuma alteração que indique mudança no padrão de metilação (hiper ou hipometilado) e os dados da expressão não variam em relação às amostras normais.

O gene BMI-1 está associado à transição epitélio-mesenquimal (EMT), um processo complexo que ocorre de forma fisiológica e também patológica em várias etapas, dentre elas, fase embrionária, progressão tumoral e também fibrose tecidual. Durante a EMT, as células epiteliais perdem suas funções e formas e aderem às características mesenquimais, aumentando assim sua motilidade e poder de invasão (THIERY et al., 2009; LI et al, 2014). Li et al. (2014b) encontraram em sua pesquisa uma hiperexpressão de BMI-1 em câncer de mama metastático em mulheres, afirmando que o gene tem um papel crucial no aparecimento dessas metástases. No nosso estudo, 78% dos animais que apresentavam a informação (18/23)

não apresentaram metástase, podendo estar relacionado a não alteração do padrão de metilação e expressão do gene BMI-1 (Gráfico 11).

Gráfico 7: Porcentagem dos animais que apresentaram ou não metástase.



Estudos realizados em linhagens tumorais mamárias inferem que a regulação do gene BMI-1 pode ser realizada por outros fatores além da metilação, dentre eles, a diminuição da ligação de histona acetilase no promotor do gene, resultando na compactação da cromatina, levando a repressão gênica (BOMMI et al., 2010).

Um dado interessante é que BMI-1 além de ser regulado transcricionalmente por MYC, pode ser ainda ativado direta ou indiretamente por ele mesmo, formando uma retroregulação positiva e mantendo seu nível de expressão nas células. Essa auto-ativação é dependente do elemento E-box que está localizado no seu promotor onde, então, MYC se liga. BMI-1, então, ativa a via canônica WNT, que tem como alvo MYC, resultando na ativação deste gene (CHO; DIMRI; DIMRI, 2013). Dessa forma, sem o aumento de expressão de MYC, não haveria indução da expressão de BMI-1.

Segundo Aulmann et al. (2006) e Chen e Olopade (2011), no câncer de mama em mulheres, o gene MYC está hiperexpresso principalmente em carcinomas mais invasivos e em carcinoma ductal in situ (DCIS) com grau mais elevado, o que não corrobora com nossos resultados já que o gene MYC não apresentou alteração na sua expressão. Essa expressão gênica pode variar de acordo com o subtipo tumoral. No geral, o gene MYC está hiperexpresso

em tumores tipo-basal e triplo negativo, enquanto que nos tipos luminais tem sua expressão mais baixa (HAIKALA et al., 2016).

Além do mecanismo regulatório influenciado por TGF- β 1, previamente relatado e que poderia explicar a ausência de alteração na expressão de MYC, já foi relatado que a expressão de MYC também varia de acordo com o padrão de metilação de alguns genes, como exemplo, BRCA1. O gene BRCA1 age como gene supressor tumoral inibindo a atividade oncogênica do gene MYC. Em 57% dos casos em que MYC está hiperexpresso, o gene BRCA1 está inativo, devido ao aumento do padrão de metilação no promotor, o que infere que a amplificação do gene MYC ocorra depois da perda da atividade de BRCA1 durante o processo de tumorigênese (XU; CHEN; OLOPADE, 2010). No entanto, um estudo feito pelo nosso grupo, evidenciou que o gene BRCA1 não teve alteração no padrão de metilação em câncer mamário canino (FERREIRA et al., 2015), o que poderia, também, explicar a ausência de alteração na expressão de MYC neste estudo.

5. CONCLUSÕES

Com todo o exposto, podemos concluir que:

- Os genes MYC, BMI-1 e p16INK4a apresentam ausência de metilação e de hiperexpressão gênica e sugerem que não sejam essenciais para o desencadeamento do câncer de mama em caninos;
- A hipossupressão do gene TBX2 não se dá por conta da alteração do padrão epigenético de metilação, porém pode ser resultado de outros mecanismos regulatórios, como da ativação da via TGF- β 1;
- A hiperexpressão do gene p15INK4b em conjunto com seu padrão de metilação acentuado, sugerem que este gene seja regulado por outros mecanismos epigenéticos, como por exemplo micro RNAs;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMAS, A.; PARKER, I.; PRINCE, S. The T-box transcription factor Tbx2: Its role in development and possible implication in cancer. **IUBMB Life**, v.62, p. 93–102, 2010.
- AGUILO, F.; ZHOU, M.M.; WALSH, M.J. Long Noncoding RNA, Polycomb, and the ghost haunting INK4b-ARF-INK4a expression. **Cancer Research**, v.71, p.5365-5369, 2011.
- AKIYAMA, Y. TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites, 1998. Available from: <http://www.rwcp.or.jp/papia>. Acesso em: 9 dezembro 2015.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. A mecânica da divisão celular. In: **Biologia molecular da célula**. São Paulo: Artes Médicas Sul, p. 911-946, 1997.
- ALI, M.A.; SJÖBLOM, T. Molecular pathways in tumor progression: from discovery to functional understanding. **Molecular Biosystems**, v. 5, p.902-908, 2009.
- AMATI, B.; ALEVIZOPOULOS, K.; VLACH, J. Myc and the cell cycle. **Bioscience**, v.3, p.250-68, 1998.
- ANTUOFERMO, E.; MILLER, M.A.; PIRINO, S.; XIE, J.; BADVE, S.; MOHAMMED, S.I. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs - a model of breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.16, p.2247-2256, 2007.
- ATTWOOD, J.T ; YUNG, R.L. ; RICHARDSON, B.C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.59, n. 2, p. 241-57, 2002.
- AULMANN, S.; ADLER, N.; ROM, J.; HELMCHEN, B.; SCHIRMACHER, P.; SINN, H.P. c-myc amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences. **Journal of Clinical Pathology**, v.59, n.4, p.424–428, 2006.
- AYRES, M.; AYRES, JR.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **BioEstat. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**, v. 5.0. Belém, Brasil, Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2007.
- BANITO, A.; RASHID, S.T.; ACOSTA, J.C.; LI, S.; PEREIRA, C.F.; GETI, I.; PINHO, S.; SILVA, J.C.; AZUARA, V.; WALSH, M.; VALLIER, L.; GIL, J. Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. **Genes Development**, v.23, p.2134-2139, 2009.
- BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nature Clinical Practice Oncology**, v.2 Suppl 1, p.S4-11, 2005.
- BERGER, A.H.; KNUDSON, A.G.; PANDOLFO, P.P.A. continuum model for tumour suppression. **Nature**, v.7359, p. 163-169, 2011.
- BISOGNA, M.; CALVANO, J.E.; HO, G.H.; ORLOW, I.; CORDÓN-CARDÓ, C.; BORGÉN, P.I.; VAN ZEE, K.J. Molecular analysis of the INK4A and INK4B gene loci in human breast cancer cell lines and primary carcinomas. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 125, n.2, p. 131-138, 2001.

BLANCATO, J.; SINGH, B.; LIU, A.; LIAO, D.J.; DICKSON, R.B. Correlation of amplification and overexpression of the C-MYC oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridization and immunohistochemical analyses. **British Journal of Cancer**, v.90, p.1612-9, 2004.

BODOOR, K.; HADDAD, Y.; ALKHATEEB, A.; AL-ABBADI, A.; DOWAIRI, M.; MAGABLEH, A.; BSOUL, N.; GHABKARI, A. DNA hypermethylation of cell cycle (p15 and p16) and apoptotic (p14, p53, DAPK and TMS1) genes in peripheral blood of leukemia patients. **Asian Pacific Organization for Cancer Prevention**, v.15, p. 75-84, 2014.

BOMMI, P.V.; DIMRI, M.; SAHASRABUDDHE, A.A.; KHANDEKAR, J.D.; DIMRI, G.P. The polycomb group protein BMI1 is a transcriptional target of HDAC inhibitors **Cell Cycle**, v.9, n.13, p. 2663-2673, 2010.

BRACKEN, A.P.; KOHLBRECHER, D.K.; DIETRICH, N.; PASINI, D.; GARGIULO, G.; BEEKMAN, C.; THEILGAARD-MÖNCH, K.; MINUCCI, S.; PORSE, B.T.; MARINE, J.C.; HANSEN, K.H.; HELIN, K. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. **Genes & Development**, v.21, p.525-530, 2007.

BRUGGEMAN, S.W.; HULSMAN, D.; TANGER, E.; BUCKLE, T.; BLOM, M.; ZEVENHOVEN, J.; VAN TELLINGEN, O.; VAN LOHUIZEN, M. Bmi1 controls tumor development in an Ink4a/Arf-independent manner in a mouse model for glioma. **Cancer Cell**, v.12, n.4, p.328-41, 2007.

BUESO-RAMOS, C.; XU, Y.; MCDONNELL, T.J.; BRISBAY, S.; PIERCE, S.; KANTARJIAN, H.; ROSNER, G.; GARCIA-MANERO, G. Protein expression of a triad of frequently methylated genes, p73, p57Kip2, and p15, has prognostic value in adult acute lymphocytic leukemia independently of its methylation status. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v.23, p. 3932-3939, 2005.

CALCAGNO, D.Q.; LEAL, M.F.; ASSUMPCAO, P.P.; SMITH, M.A.; BURBANO R.R. MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v.14, p. 5962-5968, 2008.

CARRUIDO, A. C. C.; SALAS, Y.; ORLANDO, E.; MENDEZ, D. COLMENAREZ, V. Incidencia de las neoplasias de glándula mamaria en caninos diagnosticadas por histopatología en el hospital veterinario "Dr. Humberto Ramírez Daza" desde 1983 hasta 2003. **Disponível em: <<http://www.monografias.com/trabajos15/tumores-caninos/tumores-caninos.html>, 2003>. Acesso em : 20/11/2013.**

CASSALI, G. D. Patologia da glândula mamária. In: NASCIMENTO, E. F.; SANTOS R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 119-133.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.B.; FERREIRA E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, A. C.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C.; CAVALCANTI, M. F.; FONTELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E.

M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRIL, J. E.; FREHSE, M. S.; PAES DE ALMEIDA, E. C.; CAMPOS, C. B. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CASSALI, G.D. Comparative mammary oncology: canine model. **Biomed Central Proceedings**, v.7(Suppl 1188 2):K6, 2013.

CHAAR, I.; AMARA, S.; ELAMINE, O.E.; KHIARI, M.; OUNISSI, D.; KHALFALLAH, T.; BEN HMIDA, A.; MZABI, S.; BOURAOUI, S. Biological significance of promoter hypermethylation of p14/ARF gene: relationships to p53 mutational status in Tunisian population with colorectal carcinoma. **Tumour Biology**, v.35, p. 1439-1449, 2014.

CHEN, H.; LIU, J.; ZHAO, C.Q.; DIWAN, B.A.; MERRICK, B.A.; WAALKES, M.P. Association of c-myc overexpression and hyperproliferation with arsenite-induced malignant transformation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.175, p. 260-268, 2001.

CHEN, Y.; OLOPADE, O.I. MYC in breast tumor progression. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 8, n.10, p. 1689–1698, 2011.

CHIBA, T.; MIYAGI, S.; SARAYA, A.; AOKI, R.; SEKI, A.; MORITA, Y.; YONEMITSU, Y.; YOKOSUKA, O.; TANIGUCHI, H.; NAKAUCHI, H.; IWAMA, A. The Polycomb Gene Product BMI1 Contributes to the Maintenance of Tumor-Initiating Side Population Cells in Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Research**, v.68, n.19, p.7742-7749, 2008.

CHO, J.H.; DIMRI, M.; DIMRI, G.P. A positive feedback loop regulates the expression of polycomb group protein BMI1 via WNT signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, n.5, p. 3406-3418, 2013.

CHUNG, H.J.; LEVENS, D. c-myc expression: keep the noise down! **Molecules and Cells**, v.20, p. 157-166, 2005.

COSTA, E.C.F.; LÉGA, E.; NEVES, L. Estimativa da fase do ciclo estral por citologia vaginal em cadelas (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758) da região de Ituverava- SP. **Nucleus Animalium**, v.1, n.2, 2009.

COLOTTA, F.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v.30, p.1073-1081, 2009.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, S.L. Robbins- Patologia estrutural e funcional. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

COWIN, P.A.; ANGLESIO, M.; ETEMADMOGHADAM, D.; BOWTELL, D.D. Profiling the cancer genome. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.11. p. 133-159, 2010.

CUI, H.; HU, B.; LI, T.; MA, J.; ALAM, G.; GUNNING, W. T.; DING, H. F. BMI-1 is essential for the tumorigenicity of neuroblastoma cells. **American Journal of Pathology**, v.170, p.1370–1378, 2007.

DAHL, C.; GULDBERG, P. DNA methylation analysis techniques, **Biogerontology**, v.10, n.5, p.233-250, 2003.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 2, p.15-26, 2002.

DENNIS, C. Changes to the genome that don't affect DNA sequence may help to explain differences between genetically identical twins. **Nature**, v. 42, p. 686-688, 2003.

DIAZ-CANO, S.J. General morphological and biological features of neoplasms: integration of molecular findings. **Histopathology**, v.53, p.1-19, 2008.

DICKON, R. B.; STANCEL, M.S. Estrogen Receptor-Mediated Processes in Normal and Cancer Cells. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, Washington, n. 27, cap. 8, p.135-145, 1999.

DOI, A.; PARK, I.H.; WEN, B. et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. **Nature Genetics**, v.41, p.1350-1353, 2009.

DOVEY, J.S.; ZACHAREK, S.J.; KIM, C.F.; LEES, J.Á. Bmi1 is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v.105, p.11857-11862, 2008.

DU, Y.P.; PENG, J.S.; SUN, A.; TANG, Z.; LING, W.H.; ZHU, H.L. Assessment of the effect of betaine on p16 and c-myc DNA methylation and mRNA expression in a chemical induced rat liver cancer model. **BMC Cancer**, v.30, p. 261-269, 2009.

ESTELLER, M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. **British Journal of Cancer**, v. 94, n.2, p. 179-183, 2006.

ESTELLER, M.; CORN, P.G.; BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Research**, v.61, p. 3225-3229, 2001.

EVAN, G.I.; VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v.411, p.342-348, 2001.

EVANS, H.L.; AYALA, A.G.; ROMSDAHL, M.M. Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. **Cancer**, v.40, n.2, p.818-831, 1977.

FAN, W., HUANG, X., CHEN, C., GRAY, J., AND HUANG, T. TBX3 and its isoform TBX3 + 2a are functionally distinctive in inhibition of senescence and are overexpressed in a subset of breast cancer cell lines. **Cancer Research**, v.64, p.5132-5139, 2004.

FERNANDEZ, P.C.; FRANK, S.R.; WANG, L.; SCHROEDER, M.; LIU, S.; GREENE, J.; COCITO, A.; AMATI, B. Genomic targets of the human c-Myc protein. **Genes Development**, v.17, p. 1115-1129, 2003.

FERREIRA, C.; ROCHA, J. **Oncologia Molecular**. Editora Atheneu, São Paulo, 2010.

FILHO, J.C.O.; KOMMERS, G.D.; MASUDA, E.K.; MARQUES, B.M.F.P.P.; FIGHERA, R.R.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n.2, p.177-185, 2010.

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

FORBES, S.; CLEMENTS, J.; DAWSON, E.; BAMFORD, S.; WEBB, T.; DOGAN, A.; FLANAGAN, A.; TEAGUE, J.; WOOSTER, R.; FUTREAL, P.A.; STRATTON, M.R. COSMIC 2005. **British Journal of Cancer**, v.94, n.2, p.318-322, 2006.

FOSMIRE, S.P.; THOMAS, R.; JUBALA, C.M.; WOJCIESZYN, J.W.; VALLI, V.E.; GETZY, D.M.; SMITH, T.L.; GARDNER, L.A.; RITT, M.G.; BELL, J.S.; FREEMAN, K.P.; GREENFIELD, B.E.; LANA, S.E.; KISSEBERTH, W.C.; HELFAND, S.C.; CUTTER, G.R.; BREEN, M.; MODIANO, J.F. Inactivation of the p16 cyclin-dependent kinase inhibitor in high-grade canine non-Hodgkin's T-cell lymphoma. **Veterinary Pathology**, v.44, p.467-478, 2007.

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

FUKUSHIGE, S.; HORII, A. Dna methylation in Cancer: A Gene Silencing Mechanism and the Clinical Potential of Its Biomarkers. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v.229, p. 173-185, 2013.

FUJIWARA-IGARASHI, A.; GOTO-KOSHINO, Y.; MOCHIZUKI, H.; MAEDA, S.; FUJINO, Y.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Simultaneous inactivation of the p16, p15 and p14 genes encoding cyclin-dependent kinase inhibitors in canine T-lymphoid tumor cells. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.75, n.6, p. 733-742, 2013.

GEYER, C.R. Strategies to re-express epigenetically silenced p15(INK4b) and p21(WAF1) genes in acute myeloid leukemia. **Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society**, v. 5, p.696-703, 2010.

GIL, J.; PETERS, G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. **Nature reviews Molecular cell biology**, v.7, p. 667-77, 2006.

GLINSKY, G.V.; BEREZOVSKA, O.; GLINSKII, A.B. 2005. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v.115, p.1503-1521, 2005.

GONZALEZ, S.; SERRANO, M. A new mechanism of inactivation of the INK4/ARF locus. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v.5, p.1382-4, 2006.

GOPALAKRISHNAN, S.; VAN EMBURGH, B. O.; ROBERTSON, K. D. DNA methylation in development and human disease. **Mutation Research**, v. 647, n.1-2, p.30-8, 2008.

GREEN, K.T.; FRANCIOSI, A.; SANTOS, M.B.F.; GUÉRIOS, S.D. 2009. Incidência de neoplasia mamária em fêmeas caninas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná – Curitiba. **VI Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar**. Disponível em: <

http://www.cesumar.br/epcc2009/anais/kerriel_thandile_green.pdf> Acesso em: 30 outubro 2013.

GREGORY, M.A.; QI, Y.; HANN, S.R. The ARF tumor suppressor: keeping Myc on a leash. *Cell Cycle*, n.4, p. 249-252, 2005.

GUPTA, K.; SOOD, N.K.; UPPAL, S.K; MOHINDROO, J.; MAHAJAN, S.; RAGHUNATH, M.; SINGH, K. Epidemiological Studies on Canine Mammary Tumour and its Relevance for Breast Cancer Studies. *Journal of Pharmacy*, v. 2, n.2, p. 322-333, 2012.

HAIKALA, H.M.; KLEFSTRÖM, J.; EILERS, M.; WIESE, K.E. MYC-induced apoptosis in mammary epithelial cells is associated with repression of lineage-specific gene signatures *Cell Cycle*, v.15, n.3, p.316-323, 2016.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98, 1999.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v.144, p. 646-74, 2011.

HANBY, A.M.; HUGHES, T.A. In situ and invasive lobular neoplasia of the breast. *Histopathology*., v.52, p.58-66, 2008.

HATZIAPOSTOULOU, M.; ILIOPOULOS, D. Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.68, p.1681-1702, 2011.

HE, S.; IWASHITA, T.; BUCHSTALLER, J.; MOLOFSKY, A.V.; THOMAS D.; MORRISON, S.J. Bmi-1 overexpression in neural stem/progenitor cells increases proliferation and neurogenesis in culture but has little effect on these functions in vivo. *Developmental Biology*, v.328, p.257-272, 2009.

HIPFNER, D.R.; COHEN, S.M. Connecting proliferation and Apoptosis in development and disease. *Molecular Cell Biology*, v. 5, p.805-815, 2004.

HOSEN, N.; YAMANE, T.; MUIJTJENS, M.; PHAM, K.; CLARKE, M.F.; WEISSMAN, I.L. Bmi-1-green fluorescent protein-knock-in mice reveal the dynamic regulation of bmi-1 expression in normal and leukemic hematopoietic cells. *Stem Cells*, v.25,p.1635-1644, 2007.

HUBER, G.F.; ALBINGER-HEGYI, A.; SOLTERMANN, A.; ROESSLE, M.; GRAF, N.; HAERLE, S.K.; HOLZMANN, D.; MOCH, H.; HEGYI, I. Expression patterns of BMI1 and p16 significantly correlate with overall, disease-specific, and recurrence-free survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*, v.117, n.20, p.4659-70, 2011.

IACOBUIZIO-DONAHUE, C.A. Epigenetic changes in cancer. *Annual Review of Pathology*, v.4, p.229-249, 2009.

JACOBS, J.J.; KIEBOOM, K.; MARINO, S.; DEPINHO, R.A.; VAN, L.M. The oncogene and Polycomb- group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the Ink4a locus. *Nature*, v.397, p.164- 168, 1999.

JACOBS, J. J. L.; KEBLUSEK, P.; ROBANUS-MAANDAG, E.; KRISTEL, P.; LINGBEEK, M.; NEDERLOF, P. M.; VAN WELSEME, T.; VAN DE VIJVER, M. J.; KOH, E. Y.; DALEY, G. Q.; AND VAN LOHUIZEN, M. Senescence bypass screen identifies

TBX2, which represses Cdkn2a (p19ARF) and is amplified in a subset of human breast cancers. **Nature Genetics**, v. 26, p. 291–299, 2000.

JARDÉ, T.; PERRIER, S.; VASSON, M.-P.; CALDEFIE-CHEZET, F. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. **European Journal of Cancer** 47, 33–43, 2011.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 253–262, 2007.

KANETO, H.; SASAKI, S.; YAMAMOTO, H.; ITOH, F.; TOYOTA, M.; SUZUKI, H.; OZEKI, I.; IWATA, N.; OHMURA, T.; SATOH, T.; KARINO, Y.; SATOH, T.; TOYOTA, J.; SATOH, M.; ENDO, T.; OMATA, M.; IMAI, K. Detection of hypermethylation of the p16(INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. **Gut**, v.48, p.372–377, 2001.

KIM, W.Y.; SHARPLESS, N.E. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. **Cell**, v.127, p.265–75, 2006.

KLOSE, R.J.; BIRD, A.P. Genomic DNA methylation : the marker and its mediators. **Trends in Biochemical Sciences**, v.31, p.89–97, 2006.

KRESTY, L.A.; MALLERY, S.R.; KNOBLOCH, T.J.; LI, J.; LLOYD, M.; CASTO, B.C.; WEGHORST, C.M. Frequent alterations of p16INK4a and p14ARF in oral proliferative verrucous leukoplakia. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.17, p.3179–3187, 2008.

LEA, I.A.; JACKSON, M.A.; LI, X.; BAILEY, S.; PEDDADA, S.D.; DUNNICK, J.K. Genetic pathways and mutation profiles of human cancers: site- and exposure-specific patterns. **Carcinogenesis**, v.28, p. 1851–1858, 2007.

LEE, E.Y.; MULLER, W.J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.2, n.10, p.1–18, 2010.

LESSARD, J.; SAUVAGEAU, G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. **Nature**, v.423, p.255–260, 2003.

LEVITT, N.C.; HICKSON, I.D. Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. **Trends in Molecular Medicine**, v.8, p. 179–186, 2002.

LI, G.; REINBERG, D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. **Current opinion in genetics & development**, v.21, p.175–86, 2011.

LI, J.; POI, M.J.; TSAI, M.D. Regulatory mechanisms of tumor suppressor p16(ink4a) and their relevance to Cancer. **Biochemistry**, v.50, p.5566–82, 2011.

LI, H.; SONG, F.; CHEN, X.; LI, Y.; FAN, J.; WU, X. Bmi-1 regulates epithelial-to-mesenchymal transition to promote migration and invasion of breast cancer cells. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v.7, n.6, p.3057–3064, 2014.

LI, J.; BALLIM, D.; RODRIGUEZ, M.; CUI, R.; GODING, C.R.; TENG, H.; PRINCE, S. The Anti-proliferative Function of the TGF- β 1 Signaling Pathway Involves the Repression of

the Oncogenic TBX2 by Its Homologue TBX3. **The Journal of Biological Chemistry**, v.289, n.51, p.35633-35643, 2014.

LIM, H.Y.; IM, K.S.; KIM, N.H.; KIM, H.W.; SHIN, J.I.; SUR, J.H. Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. **The Veterinary Journal**, v.203, p.326–331, 2015.

LINGBEEK, M. E.; JACOBS, J. J. L.; VAN LOHUIZEN, M. (2002). The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.26120-26127, 2002.

LIU, Y.; LAN, Q.; SIEGFRIED, J.M.; LUKETICH, J.D.; KEOHAVONG, P. Aberrant promoter methylation of p16 and MGMT genes in lung tumors from smoking and never-smoking lung cancer patients. **Neoplasia**, v.8, n.1, p.46–51, 2006.

LIU, D.; XIONG, H.; ELLIS, A.E.; NORTHRUP, N.C.; RODRIGUEZ JR, C.O.; O'REGAN, R.M.; DALTON, S.; ZHAO, S. Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. **Cancer Research**, v.74, n.18, p.5045-5056, 2014.

LOTEM, J.; SACHS, L. Epigenetics wins over genetics: induction of differentiation in tumor cells. **Seminars in Cancer Biology**, v.12, n.5, p.339-346, 2002.

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

LUTFUL KABIR, F.M.; AGARWAL, P.; DEINNOCENTES, P.; ZAMAN, J.; BIRD, A.C.; BIRD, R.C. Novel Frameshift Mutation in the p16/INK4A Tumor Suppressor Gene in Canine Breast Cancer Alters Expression From the p16/INK4A/p14ARF Locus. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.114, p.56–66, 2013.

LUTZ, W.; LEON, J.; EILERS, M. Contributions of Myc to tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1602, p.61-71, 2002.

MACLACHALAN, N.J.; KENNEDY, P.C. Tumors of the genital systems. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Ames: Iowa State, 2002, p. 547-573.

MACLEOD, K. Tumor suppressor genes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.1, p. 81-93, 2000.

MAERTENS, G.N.; EL MESSAOUDI-AUBERT, S.; RACEK, T.; STOCK, J.K.; NICHOLLS, J.; RODRIGUEZ-NIEDENFÜHR, M.; GIL, J.; PETERS, G. Several distinct polycomb complexes regulate and co-localize on the INK4a tumor suppressor locus. **PLoS One**, 4:e6380, 2009.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v.9, p.153-166, 2009.

MENG, S.; LUO, M.; SUN, H.; YU, X.; SHEN, M.; ZHANG, Q.; ZHOU, R.; JU, X.; TAO, W.; LIU, D.; DENG, H.; LU, Z. Identification and Characterization of Bmi-1-responding

element within the Human p16 Promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 43, p. 33219–33229, 2010.

MERLO, D.F. Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 22, n.4, p.976-984, 2008.

MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J.F.; JABARA, A.G.; VON SANDERSLEBEN, J. Canine malignant mammary tumors III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. *Veterinary Pathology*, v.10, p.241–256, 1973.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, E. Definitions and explanatory notes. **Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p.18-27. 1999.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Ames : Iowa State, p.575-606, 2002.

MODIANO, J.F.; BREEN, M.; VALLI, V.E.; WOJCIESZYN, J.W.; CUTTER, G.R. Predictive value of p16 or Rb inactivation in a model of naturally occurring canine non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, v.21, p.184–187, 2007.

MORRIS, J. S.; DOBSON, J.M.; BOSTOCK, D.E.; O'FARRELL, E. Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. *Veterinary Record*, London, v. 142, p. 656-658, 1998.

MOUSER, P.; MILLER, M.A.; ANTUOFERMO, E.; BADVE, S.S.; MOHAMMED, S.I. Prevalence and classification of spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs without clinical mammary disease. *Veterinary Pathology*, v.47, p. 265-274, 2010.

OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R.T.; LORETTI, A.P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v.31, n. 2, p. 105-110, 2003.

OLIVEIRA, A.M.; ROSS, J.S.; FLETCHER, J.A. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *American Journal of Clinical Pathology*, 124S, p.16-28, 2005.

ORTEGA, S.; MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1602, p. 73–87, 2002.

OSTER, S.K.; HO, C.S.; SOUCIE, E.L.; PENN, L.Z. The MYC oncogene: Marvelous Y Complex. *Advances in Cancer Research*, v.84, p. 81-154, 2002.

OZENNE, P.; EYMIN, B.; BRAMBILLA, E.; GRAZERI, S. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. *International Journal of Cancer*, v.127, n.10, p. 2239-2247, 2010.

PARK, M.T.; LEE, S.J. Cell cycle and cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v.36, p.60-65, 2003.

PERES, J.; DAVIS, E.; MOWLA, S.; BENNETT, D.C.; LI, J.A.; WANSLEBEN S.; PRINCE, S. The Highly homologous T-Box transcription factors, TBX2 and TBX3, have

distinct roles in the oncogenic process. **Genes Cancer SAGE Publications**, v.1, p. 272–282, 2010.

PRINCE, S.; CARREIRA, S.; VANCE, K. W.; ABRAHAMS, A.; GODING, C. R. Tbx2 directly represses the expression of the p21WAF1 cyclindependent kinase inhibitor. **Cancer Research**, v.64, p.1669-1674, 2004.

QUEIROGA, F. L.; PÉREZ-ALENZA, M. D.; SILVAN, G.; PEÑA, L.; LOPES, C.; ILLERA, J. C. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, n. 94, p. 181-187, 2005.

ROCCO, J.W.; DIDRANSKY, D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. **Experimental Cell Research**, v. 264, p.42–55, 2001.

ROWELL, J.L.; MCCARTHY, D.O.; ALVAREZ, C.E. Dog models of naturally occurring cancer. **Trends in molecular medicine**, v.17, n.7, p. 380-8, 2011.

RUTTEMAN, G. R. et al. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 3 ed. Philadelphia: Saunders Company, 2001. p. 455-477.

SADIKOVIC, B.; AL-ROMAIH, K.; SQUIRE, J.A.; ZIELENSKA, M. Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. **Current Genomics**, v.6, p. 394- 408, 2008.

SAKELLARIOU, S.; LIAKAKOS, T.; GHICONTI, I.; HADJIKOKOLIS, S.; NAKOPOULOU, L.; PAVLAKIS, K. Immunohistochemical expression of P15 (INK4B) and SMAD4 in advanced gastric cancer. **Anticancer research**, v. 28, p.1079–83, 2008.

SALAS, E.; RABHI, N.; FROGUEL, P.; ANNICOTTE, J.S. Role of Ink4a/Arf Locus in Beta Cell Mass Expansion under Physiological and Pathological Conditions. **Journal of Diabetes Research**, vol. 2014, Article ID 873679, 7 pages, 2014. doi:10.1155/2014/873679.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. 1989.

SANCHEZ-BEATO, M.; SANCHEZ-AGUILERA, A.; PIRIS, M.A. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. **Blood**, v.101, p.1220–1235, 2003.

SANDAL, T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. **Oncologist**, v.7, p.73-81, 2002.

SAUVAGEAU, M.; SAUVAGEAU, G. Polycomb Group Proteins: Multi-Faceted Regulators of Somatic Stem Cells and Cancer. **Cell Stem Cel**, v. 7, p.299-313, 2010.

SAWAN, C.; VAISSIÈRE, T.; MURR, R.; HERCEG, Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutational Research**, v. 642, p. 1-13, 2008.

SCARANO, M.I.; STRAZZULLO, M.; MATARAZZO, M.R.; D'ESPOSITO, M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. **Journal of Cell Physiology**, v. 204, n,1 , p. 21-35, 2005.

SCHMITT, F.C.; REIS FILHO, J.S. C-MYC, not her-2/neu, can predict the prognosis of breast cancer patients: how novel, how accurate, and how significant? **Breast Cancer Research**, v.5, p.188-91, 2003.

SCHUG, J.; OVERTON, G.C. TESS: Transcription Element Search Software on the WWW, 1998. Available from: <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>. Accessed December 9, 2015.

SCHURINGA, J.J.; VELLENGA, E. Role of the polycomb group gene BMI1 in normal and leukemic hematopoietic stem and progenitor cells. **Current Opinion in Hematology**, v. 17, p. 294-299, 2010.

SHARPLESS, N.E. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. **Mutation research**, v.576, p. 22–38, 2005.

SHERR, C.J.; ROBERTS, J.M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin- dependent kinases. **Genes & Development**, v.9, p.1149–1163, 1995.

SHERR, C.J. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. **Nature reviews cancer**, v.6, n.9, p. 663-673, 2006.

SINCLAIR, C. S.; ADEM, C.; NADERI, A.; SODERBERG, C. L.; JOHNSON, M.; WU, K.; WADUM, L.; COUCH, V. L.; SELLERS, T. A.; SCHAID, D.; SLEZAK, J.; FREDERICKSEN, Z.; INGLE, J. N.; HARTMANN, L.; JENKINS, R. B.; AND COUCH, F. J. TBX2 is preferentially amplified in BRCA1- and BRCA2-related breast tumors. **Cancer Research**, v. 62, p. 3587–3591, 2002.

SOARES, J.A.G.; SILVA, P. A.R. Castração precoce em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 13, p. 34-40, 1998.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, p. 573–596, 2003.

SORENMO, K.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**, v.48, p. 85–97, 2011.

SOUZA, D.M.B. **Caracterização patológica e gênica (gene P53) dos tumores mamários em cadelas**. 2003. 93f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

SPARMANN, A.; VAN, L. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. **Nature Reviews**, v.6, p.846–856, 2006.

TABY, R.; ISSA, J-PJ. **Cancer Epigenetics**. *CA Cancer J Clin*, v. 60, p.376-392, 2010.

THIERY, J.P.; ACLOQUE, H.; HUANG, R.Y.J.; NIETO, M.A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. **Cell**, v. 139, p. 871-890, 2009.

TEOFILI, L.; MARTINI, M.; LUONGO, M.; DIVERIO, D.; CAPELLI, G.; BRECCIA, M.; LO, C.F.; LEONE, G.; LAROCCA, L.M. Hypermethylation of GpG islands in the promoter region of p15(INK4b) in acute promyelocytic leukemia represses p15(INK4b) expression and correlates with poor prognosis. **Leukemia**, v.17, p.919–924, 2003.

TOKUDOME, N.; SAKAMOTO, G.; SAKAI, T.; SARUMARU, S.; OKUYAMA, N.; HORI, F.; HORI, R.; AKIYAMA, F.; TANABE, M.; SAITO, K.; TAKAHASHI, K.; KASUMI, F. A Case of Carcinosarcoma of the Breast. **Breast Cancer**, v.12, p.149-153, 2005.

TOST, J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. **Molecular Biotechnology**, 2009.

TOYOTA, M.; SUZUKI, H.; YAMASHITA, T.; HIRATA, K.; IMAI, K.; TOKINO, T.; SHINOMURA, Y. Cancer epigenomics: Implications of DNA methylation in personalized cancer therapy. **Cancer Science**, v.100, p.787-791, 2009.

UMER, M.; HERCEG, Z. Deciphering the Epigenetic Code: An overview of DNA methylation analysis methods. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.18, n.15, p. 1972-1987, 2013.

VAN HEEMST, D.; DEN REIJER, P.M; WESTENDORP, R.G. Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers. **European Journal of Cancer**, v.15, p. 2144-2152, 2007.

VANDIVER, A;R.; IDRIZI, A.; RIZZARDI, L.; FEINBERG, A.P.; HANSEN. K.D. DNA methylation is stable during replication and cell cycle arrest. **Scientific Reports**: www.nature.com/scientificreports. Acesso em: 9 dezembro 2015.

VIRANI S.; COLACINO, J.A.; KIM, J.H.; ROZEK, L.S. Cancer Epigenetics: A Brief Review. Disponível em: <http://ilarjournal.oxfordjournals.org>. Acesso: 8 dezembro, 2012.

VITA, M.; HENRIKSSON, M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. **Seminars of Cancer Biology**, v.16, p. 318-330, 2006.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v. 10, p. 789-799, 2004.

VONLANTHEN, S.; HEIGHWAY, J.; ALTERMATT, H. J.; GUGGER, M.; KAPPELER, A.; BORNER, M. M.; VAN LOHUIZEN, M.; BETTICHER, D. C. The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. **British Journal of Cancer**, v. 84, p.1372–1376, 2001.

XU, J.; CHEN, Y.; OLOPADE, O.I. MYC and Breast Cancer. **Genes & Cancer**, v.1, n.6, p. 629– 640, 2010.

WANG, B.; LINDLEY, L.E.; FERNANDEZ-VEGA, V.; RIEGER, M.E.; SIMS, A.H.; BRIEGEL, K.J. The T box transcription factor TBX2 promotes epithelial–mesenchymal transition and invasion of normal and malignant breast epithelial cells, **PLoS One**, v. 7, e41355, 2012.

WANSLEBEN, S.; PERES, J.; HARE, S.; GODING, C.R.; PRINCE, S. T-box transcription factors in cancer biology, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1846, p. 380-391, 2014.

WESIERSKA-GADEK, J.; GUEORGUIEVA, M.; WOJCIECHOWSKI, J.; HORKY, M. Cell cycle arrest induced in human breast cancer cells by cyclin-dependent kinase inhibitors: a comparison of the effects exerted by roscovitine and olomoucine. **Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy**, v.56, p.635-641, 2004.

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; K.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.37, p. 462-464, 1996.

ZELLER, K.I.; ZHAO, X.; LEE, C.W.; CHIU, K.P.; YAO, F.; YUSTEIN, J.T.; OOI, H.S.; ORLOV, Y.L.; SHAHAB, A.; YONG, H.C.; FU, Y.; WENG, Z.; KUZNETSOV, V.A.; SUNG, W.K.; RUAN, Y.; DANG, C.V.; WEI, C.L. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v.103, p.17834-17839, 2006.

ZEMLYAKOVA, V.V.; ZHEVLOVA, A.I.; STRELNIKOV, V.V.; LYUBCHENKO, L.N.; SCHABANOV, M.A.; VISHNEVSKAYA, Y.V.; TRETYAKOVA, V.A.; ZALETAYEV, D.V.; NEMTSOVA, M.V. Abnormal Methylation of Several Tumor Suppressor Genes in Sporadic Breast Cancer. **Cell Molecular Biology**, v.37, n.4, 2003, p.591-597, 2003.

ZHANG, Y.; HAN, Q.; FAN, H.; LI, W.; XING, Q.; YAN, B. Genetic analysis of the TBX2 gene promoter in indirect inguinal hernia. **Hernia**, v.18, n.4, p.513-7, 2014.

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

ZUCCARI, D.; TERZIAN, A.; PEREIRA, R.; PAVAM, M.; RUIZ, C.; SUEIRO, F.; ANDRADE, J.; CORDEIRO, J. Avaliação imunohistoquímica do gene p53 nas neoplasias mamárias caninas. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, p. 344-350, 2005.

ANEXO 1

Amostras	Animais	Cód BioMol	Raça	Idade	Tipo	Horm	Pdc	Castração	Metástase	Gestações
1	1	BNB 331	Poodle	9m	CONTROLE					
2	2	BNB 337	?	7	CONTROLE					
1	1	BNB 01 NT	SRD	15	Tecido não tumoral	N	N	INTEIRO	N	NULÍPARA
2		BNB 02 T			Carcinossarcoma Diferenciado					
3	2	BNB 03 NT	SRD	10	Tecido não tumoral	N	N	CASTRADA	N	NULÍPARA
4		BNB 04 T			Adenocarcinoma Pouco diferenciado					
5	3	BNB 05 NT	SRD	7	Tecido não tumoral	S	S	INTEIRO	N	MULTÍPARA
6		BNB 06 T			Tumor Misto: Mioepiteioma/Carcinossarcoma					
7	4	BNB 07 NT	Poodle	10	Tecido não tumoral	N	N	INTEIRO	S	NULÍPARA
8		BNB 08 T			Fibroadenocarcinoma					
9	5	BNB 10 NT	SRD	12	Tecido não tumoral	S	S	INTEIRO	N	MULTÍPARA
10		BNB 11 T			Carcinossarcoma Grau III					
11	6	BNB 12 NT	SRD	12	Tecido não tumoral	S	S	INTEIRO	N	MULTÍPARA
12		BNB 13 T			Adenocarcinoma papilífero Grau III					
13	7	BNB 15 NT	Pinscher	10	Tecido não tumoral	N	-	INTEIRO	N	NULÍPARA
14		BNB 16 T			Adenocarcinoma Papilífero					
15	8	BNB 17 NT	SRD	10	Tecido não tumoral	S	N	INTEIRO	N	MULTÍPARA
16		BNB 18 T			Tumor misto: Miocondrosteóide/Carcinomatoso					
17	9	BNB 21 NT	SRD	15	Tecido não tumoral	N	N	INTEIRO	N	MULTÍPARA
18		BNB 22 T			Fibroadenocarcinoma/Adenocarcinoma papilífero					
19	10	BNB 23 NT	SRD	15	Tecido não tumoral	N	N	INTEIRO	N	NULÍPARA
20		BNB 24 T			Osteocondrossarcoma					
21	11	BNB 45 NT	SRD	15	Tecido não tumoral	N	S	INTEIRO	N	PRIMÍPARA
22		BNB 46 T			Carcinossarcoma grau II					
23	12	BNB 50 NT	SRD	8	Tecido não tumoral	N	S	INTEIRO	N	MULTÍPARA
24		N71 T			Adenoma ou adenocarcinoma grau I					
25	13	BNB 175 NT	Poodle	?	Tecido não tumoral	SI	SI	SI	SI	SI
26		BNB 176 T			Adenocarcinoma					
27	14	BNB 217C T	Poodle	13	Carcinoma mamário complexo alto grau	N	S	INTEIRO	N	PRIMÍPARA
28		BNB 218 NT			Tecido não tumoral					
29	15	BNB 229 T	SRD	11	Carcinossarcoma grau I	N	S	INTEIRO	S	NULÍPARA
30		BNB 231 NT			Tecido não tumoral					
31	16	BNB 234 NT	Cocker Spaniel	?	Tecido não tumoral	SI	SI	SI	SI	SI
32		BNB 235 T			Carcinossarcoma grau II					
33	17	BNB 240 T	Poodle	12	Carcinoma sólido grau II	N	N	INTEIRO	S	NULÍPARA
34		BNB 241 NT			Tecido não tumoral					
35	18	BNB 257 NT	Doberman	12	Tecido não tumoral	SI	SI	SI	SI	SI
36		BNB 258 T			Adenocarcinoma tubular simples grau II/III					
37	19	BNB 262 NT	SRD	14	Tecido não tumoral	SI	SI	SI	SI	SI
38		BNB 263 T			Carcinoma grau II					
39	20	BNB 264 NT	Dachshund	12	Tecido não tumoral	N	N	INTEIRO	N	MULTÍPARA
40		BNB 265 T			Adenocarcinoma tubulo papilar grau II					

41	21	BNB 266 NT	SRD	10	Tecido mamário alterado	S	N	INTEIRO	N	NULÍPARA
42		BNB 267 T			Adenocarcinoma tubular grau II					
43	22	BNB 273 NT	SRD	?	Tecido mamário não tumoral	S		INTEIRO	N	MULTÍPARA
44		BNB 274 T			Adenocarcinoma tubular simples grau II					
45		BNB 275 T			Adenocarcinoma tubular papilífero simples grau III					
46	23	BNB 278 NT	SRD	10	Tecido não tumoral	S	N	CASTRADA	N	NULÍPARA
47		BNB 279 T			Carcinossarcoma grau II					
48		BNB 280 T			Carcinossarcoma grau III					
49	24	BNB 281 NT	SRD	9	Tecido não tumoral	N	N	INTEIRO	S	NULÍPARA
50		BNB 282 T			Fibrossarcoma grau II					
51	25	BNB 300 NT	SRD	12	Tecido não tumoral	SI	SI	SI	SI	SI
52		BNB 301 T			Adenocarcinoma tubular simples grau II					
53	26	BNB 302 NT	Poodle	12	Tecido não tumoral	SI	SI	SI	SI	SI
54		BNB 303 T			Adenocarcinoma tubular grau I					
55	27	BNB 308 NT	SRD	10	Tecido não tumoral	SI	SI	SI	SI	SI
56		BNB 309 T			Adenocarcinoma complexo grau II					
65	28	BNB 310 NT	Poodle	9	Tecido mamário não tumoral					
58		BNB 311 T			Adenocarcinoma complexo grau I/II					
59	29	BNB 312 NT	Poodle	10	Tecido não tumoral	SI	SI	SI	SI	SI
60		BNB 313 T			Adenocarcinoma complexo grau I/II					
61	30	BNB 314 NT	SRD	8	Tecido não tumoral	SI	SI	SI	SI	SI
62		BNB 315 T			Adenocarcinoma tubular simples grau I/II					
63	31	BNB 316 NT	Poodle	16	Tecido não tumoral	SI	SI	SI	SI	SI
64		BNB 317 T			Carcinossarcoma					
65		BNB 318 T			Adenocarcinoma complexo grau II/III					
66	32	BNB 319 NT	SRD	12	Tecido não tumoral	SI	SI	SI	SI	SI
67		BNB 320 T			Adenocarcinoma tubular simples diferenciado					
68		BNB 321 T			Adenocarcinoma tubular simples grau II					
69	33	BNB 327 T	SRD	10	Carcinoma em tumor misto	SI	SI	SI	SI	SI
70		BNB 328 NT			Tecido não tumoral					
71	34	BNB 329 NT	Cocker Spaniel	9	Tecido não tumoral	SI	SI	SI	SI	SI
72		BNB 330 T			Carcinoma Complexo					
73	35	BNB 333 T	Poodle	13	Carcinoma Complexo	SI	SI	SI	SI	SI
74		BNB 334 T			Carcinoma micropapilar					
75		BNB 335 NT			Tecido não tumoral					
76	36	BNB 338 T	SRD	1a 3m	Fibroadenocarcinoma	SI	SI	SI	SI	SI
77		BNB 339 NT			Tecido não tumoral					
78	37	BNB 340 T	SRD	12	Carcinossarcoma	SI	SI	SI	SI	SI
79		BNB 341 NT			Tecido não tumoral					
80	38	N 72 T	Pinscher	10	Carcinoma complexo grau I	N	S	INTEIRO	N	NULÍPARA
81		N 73 NT			Tecido não tumoral					
82	39	N 75 NT	Bulldog	8	Tecido não tumoral	N	S	INTEIRO	N	PRIMÍPARA
83		N 76 T			Carcinoma em tumor misto grau I					
84	40	N 77 NT	SRD	12	Tecido não tumoral	S	S	CASTRADA	S	MULTÍPARA

85		N 78 T			Carcinoma em tumor misto grau II					
----	--	--------	--	--	----------------------------------	--	--	--	--	--

Horm: Administração hormonal

Pdc: Pseudociese

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa, intitulado "AVALIAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA DOS GENES DO LOCUS INK4/ARF E SEUS REGULADORES EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS", protocolo nº 087/2015 (CEUA) e 28084.006960/2015-91 (UFRA), sob a responsabilidade da professora Bárbara do Nascimento Borges – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de 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 2005, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal Rural da Amazônia, em reunião de 30/05/2015.

Vigência do projeto	08 de julho de 2015 a 01 de junho de 2018
Espécie/linhagem	Canino/SRD
Número de animais	50
Peso/idade	1-40 kg/ 2-17 anos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	HOVET UFRA

Belém, 30 de junho de 2015.

Ana Sílvia S. Ribeiro
Profª Dra. Ana Sílvia Sardinha Ribeiro
Coordenadora CEUA UFRA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
Av. Tancredo Neves, nº 2501, Belém, Maricá, Pará – PA, CEP: 66.073-900
Contatos: (0800-91107) ceua@ufra.edu.br www.comissao.ufra.edu.br/ceua



ANEXO 3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Universidade Federal Rural da Amazônia está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá conhecer melhor os mecanismos que ocasionam as lesões de mama e o desenvolvimento de tumor mamário em caninos, através da identificação das alterações genéticas e epigenéticas associadas ao quadro clínico do paciente e exames histopatológicos. Estes estudos são realizados em pequenos fragmentos de tecido mamário removido por cirurgia e oferecem novas possibilidades de diagnóstico.

Seu animal está sendo admitido neste Hospital, para estabelecimento de diagnóstico e há a necessidade da remoção de material biológico relacionado à enfermidade. Parte do material retirado será encaminhado para exames laboratoriais, necessários para o diagnóstico definitivo. O restante do material não utilizado é armazenado para novos exames, se necessário.

A obtenção do fragmento de tecido mamário para pesquisa não implicará em riscos adicionais e nem em aumento no tempo do exame ou cirurgia. O fragmento de material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras, preservando a privacidade e identidade do animal. A eventual inclusão dos resultados em publicações científicas será feita de modo a garantir o anonimato do animal.

É necessário esclarecê-lo (a) que não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu atendimento ou tratamento. Caso você tenha alguma dúvida sobre este documento ou em relação a pesquisa, por gentileza, entre em contato com a Prof^a. Bárbara Borges (ISARH), pelos telefones 3201-7585/3210-5140.

Uma cópia deste documento será arquivada no prontuário do seu animal e, se desejar, uma cópia lhe será fornecida.

Declaro estar ciente das informações prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o teor, e autorizo a utilização de amostras de tecido retiradas durante a cirurgia do meu animal.

Belém, de de

Assinatura do Responsável _____

Nome: RG:

