

UNIVERSIDADE PAULISTA

**ANÁLISE DE METILAÇÃO DE ELEMENTOS LINE-1
EM TUMORES DE MAMA CANINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

**PATRÍCIA APARECIDA DOS SANTOS
DE CARVALHO JOAQUIM**

SÃO PAULO

2022

UNIVERSIDADE PAULISTA

**ANÁLISE DE METILAÇÃO DE ELEMENTOS LINE-1
EM TUMORES DE MAMA CANINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva

PATRÍCIA APARECIDA DOS SANTOS DE CARVALHO JOAQUIM

SÃO PAULO

2022

Joaquim, Patricia Aparecida dos Santos de Carvalho.

Análise de metilação de elementos LINE-1 em tumores de mama canino / Patricia Aparecida dos Santos de Carvalho Joaquim. - 2022.

56 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Patologia Integrada e Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva.

1. Epigenética. 2. Line-1. 3. Câncer de mama canino. I. Silva, Rodrigo Augusto da (orientador). II. Título.

PATRÍCIA APARECIDA DOS SANTOS DE CARVALHO JOAQUIM

**ANÁLISE DE METILAÇÃO DE ELEMENTOS LINE-1
EM TUMORES DE MAMA CANINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

_____/___/_____

Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva – Professor Orientador
Universidade Paulista – UNIP

_____/___/_____

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista – UNIP

_____/___/_____

Prof. Dr. Célio Júnior da Costa Fernandes
Universidade Estadual de Campinas – Unicamp

DEDICATÓRIA

Aos pacientes oncológicos, especialmente humanos e caninos, que bravamente lutam contra essa doença na esperança de que avanços na ciência resultem em tratamentos mais amenos, eficazes e duradouros.

Aos meus filhos, José Celestino e Agenor Francisco, que lhes sirva de incentivo aos estudos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Paulista e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, do Ministério da Educação do Brasil, por viabilizarem a realização deste trabalho, resultando na concretização de um sonho.

À minha família, pelo apoio no decorrer de todos esses semestres. Especialmente ao meu marido, Adriano, que diversas vezes abdicou de seus compromissos profissionais para me acompanhar nas atividades do mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva, pelo imenso apoio, pela paciência e pelo compartilhamento dos conhecimentos e da experiência em biologia molecular.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, pelo esmero em superar os obstáculos impostos pela pandemia de Covid-19 e cumprir a missão singular de nos proporcionar uma base sólida à nossa formação.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, especialmente Thalita Michelle Queté dos Reis, pela amizade, pela ajuda e pelas palavras de carinho nos momentos difíceis do meu tratamento.

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas.

Pessoas transformam o mundo.”

(Paulo Freire)

RESUMO

Com o aumento da expectativa de vida dos cães, o câncer de mama canino tem se tornado a mais importante e frequente neoplasia em cadelas. Diferentemente dos humanos, os estudos referentes à caracterização molecular e à epigenética das neoplasias caninas ainda estão limitados, especialmente, no que diz respeito a alterações epigenéticas. Assim, o objetivo deste estudo foi correlacionar o padrão de metilação dos Elementos LINE-1, um biomarcador molecular epigenético, em tecido mamário hígido e neoplásico de cadelas. Para isso, o DNA genômico foi extraído de cortes histológicos de biópsias e linhagens de câncer de mama canino pelo método fenol/clorofórmio e as porcentagens de metilação de LINE-1 determinadas por qPCR. Inicialmente, a análise dos dados clínicos revelaram que a idade mínima das cadelas desta pesquisa coincide com os demais estudos da literatura. As análises moleculares revelaram que tanto as linhagens como as amostras de adenoma tubular e carcinoma inflamatório canino são hipometiladas em relação ao tecido normal. Contudo, não foi possível comprovar a relação entre a hipometilação de LINE-1 com a agressividade tumoral do câncer de mama canino.

Palavras-chave: epigenética; metilação do DNA; hipometilação de LINE-1; carcinoma inflamatório canino; adenoma tubular canino; cultura de célula neoplásica.

ABSTRACT

With the increase in the life expectancy of dogs, canine mammary cancer has become the most important and frequent neoplasm in bitches. Unlike humans, studies on the molecular and epigenetic characterization of canine neoplasms are still limited, especially with regard to epigenetic changes. Thus, the aim of this study was to correlate the methylation pattern of LINE-1 Elements; an epigenetic molecular biomarker in healthy and neoplastic mammary tissue of bitches. For this, genomic DNA was extracted from histological sections of canine breast cancer biopsies and strains by the phenol/chloroform method and the percentages of LINE-1 methylation determined by qPCR. Initially, the analysis of clinical data revealed that the minimum age of the bitches in this study coincides with other studies in the literature. Molecular analyzes revealed that both lines and samples of tubular adenoma and canine inflammatory carcinoma are hypomethylated in relation to normal tissue. However, it was not possible to prove the relationship between LINE-1 hypomethylation and canine breast cancer tumor aggressiveness. Thus, the joint analysis of our results allows us to conclude that the methylation state of LINE-1 can be used in veterinary medicine as a potential molecular biomarker to differentiate healthy breast tissue from neoplastic tissue.

Keywords: epigenetics; DNA methylation; LINE-1 hypomethylation; canine inflammatory carcinoma; canine tubular adenoma; neoplastic cell culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Nomenclatura e drenagem das glândulas mamárias em caninos	15
Figura 2 -	Modificações pós traducionais de histonas	23
Figura 3 -	Mecanismo de metilação e desmetilação ativa do DNA	25
Figura 4 -	Mecanismo de inibição da transcrição gênica pela metilação de DNA	26
Gráfico 1 -	Idade das cadelas das amostras histológicas	32
Figura 5 -	Esquema do tratamento de DNA	34
Figura 6 -	Representação gráfica do fragmento amplificado	36
Figura 7 -	Classificação Histopatológica do tecido mamário canino	37
Figura 8 -	Eletroforese em gel de agarose	39
Figura 9 -	Determinação do estado de metilação da região promotora do gene <i>L1TD1</i> (LINE-1) em linhagens de tumor canino	40
Figura 10 -	Determinação do estado de metilação da região promotora do gene <i>L1TD1</i> (LINE-1) em tumores de mama canino	41
Figura 11 -	Comparação entre o estado de metilação de linhagens tumorais e tumores mamários	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipo de neoplasia, idade e raça das cadelas das amostras histológicas	32
Tabela 2 - Determinação da quantidade e da pureza do DNA	38

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	– por cento
μL	– microlitro
μM	– micromolar
≥	– maior ou igual
°C	– grau Celsius
5-hmeC	– 5-hidroximetilcitosina
5-meC	– 5-metil citosina
CH3	– grupamento Metil
chr	– cromossomo
CM1	– células isoladas do tumor primário de mama canina
CpG	– citosina-fosfato-Guanina
Crt	– controle
Ct	– <i>cycle threshold value</i>
DNA	– ácido desoxirribonucleico
DNMT1	– DNA metiltransferases 1
DNMT2	– DNA metiltransferases 2
DNMT3A	– DNA metiltransferases 3A
DNMT3B	– DNA metiltransferases 3B
DNMT3L	– DNA metiltransferases 3L
DNMTs	– DNA metiltransferases
EDTA	– ácido etilenodiamino tetra-acético
gDNA	– DNA genômico
h	– hora
HE	– hematoxilina-eosina
<i>L1td1</i>	– gene domínio transposase do tipo LINE-1 contendo 1
LaCIB	– Laboratório de Imunopatologia e Biologia do Câncer
LINE-1	– elementos transponíveis de classe I do DNA
lncRNAs	– RNAs longos não codificantes
meCpGs	– proteínas com domínio de ligação de metil-CpG
mg/mL	– miligrama por mililitro
miRNAs	– micro RNAs
mL	– mililitros

mM	– milimolar
MM4	– células isoladas do sitio metastático
ncRNAs	– RNAs não codificantes
ng	– nanograma
ng/mL	– nanograma por mililitro
pb	– pares de base
pH	– Potencial Hidrogeniônico
PTMs	– modificações pós-traducionais
qPCR	– PCR quantitativo em tempo real
RNA	– ácido ribonucleico
RPMI 1640	– <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAM	– S-adenosilmetionina
SDS	– Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	– Soro Fetal Bovino
SIRT6	– Sirtuína 6
TET1	– Proteínas de Translocação 1
TET2	– Proteínas de Translocação 2
TET3	– Proteínas de Translocação 3
TETs	– Proteínas de Translocação
Tris	– Tris(hidroximetil) aminometano
t RNA	– RNA transportador

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Anatomia da glândula mamária canina	15
2.2	Neoplasia mamária canina	16
2.3	Epigenética	21
2.3.1	Epigenética e câncer	27
3	JUSTIFICATIVA	29
4	OBJETIVOS	30
4.1	Objetivo geral	30
4.2	Objetivos específicos	30
5	MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1	Material biológico e seleção de amostras	31
5.2	Cultura de Células	32
5.3	Biologia Molecular	33
5.3.1	Desparafinização	33
5.3.2	Extração do DNA	33
5.3.3	Tratamento do DNA	33
5.3.4	Determinação do padrão de metilação	34
5.4	Análise estatística	35
6	RESULTADOS	36
6.1	Desenho dos iniciadores e padronização das condições de ciclagem	36
6.2	Caracterização histopatológica	36
6.3	Parâmetros moleculares	38
7	DISCUSSÃO	43
8	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

LINE-1 são elementos transponíveis de classe I do DNA, pertencentes ao grupo de elementos nucleares longos e intercalados L1. Por representarem cerca de 17% de todo o genoma humano e 34% do genoma canino (BÖHNE *et al.*, 2008), o estudo do padrão de metilação da região promotora desses elementos é amplamente utilizado na compreensão de inúmeras doenças de caráter multifatorial, podendo ser correlacionado diretamente como sensor epigenético em estudos que abordem a metilação global do genoma (KITKUMTHORN; MUTIRANGURA, 2011).

Dentre os diferentes mecanismos epigenéticos, destacamos a metilação do DNA por ser a única alteração química que ocorre diretamente na molécula do DNA. Esse mecanismo baseia-se na adição de um grupo metil (CH₃) ao carbono 5 do dinucleotídeo CpG pela ação das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) que utilizam o S-adenosilmetionina (SAM) como doador do grupo metil (CH₃), que será transferido para citosina, formando a 5-metilcitosina (5-meC) (SAWAN *et al.*, 2008). Alterações no padrão de metilações em regiões promotoras ou regulatórias gênicas podem impactar os mecanismos de controle transcricional, podendo levar ao silenciamento parcial ou à ativação inadequada de genes específicos (LIU *et al.*; 2014; FEINBERG, 2001).

A ativação transcricional de oncogenes – fase inicial – e a repressão transcricional de genes supressores tumorais – segundo momento – são consideradas eventos iniciais de hipometilação que evidenciam a relação entre alterações epigenéticas e a tumorigênese. (BAYLIN; JONES, 2016).

O LINE-1 é considerado um potencial biomarcador para diagnóstico precoce de tumores porque as alterações epigenéticas no padrão de metilação das sequências repetitivas de DNA são observadas antecipadamente à transformação tumoral. Ele também é utilizado, em humanos, para acompanhar o estagiamento tumoral. (KITKUMTHORN; MUTIRANGURA, 2011).

Como em humanos, a neoplasia canina é considerada uma doença de etiologia multifatorial, associada a fatores genéticos, nutricionais e ambientais. As lesões malignas correspondem a 40% a 50% das neoplasias caninas e, frequentemente, se tornam fatais devido ao desenvolvimento de metástases (PRIESTER; MANTEL, 1971; UJVARI *et al.*, 2018). Dentre as lesões malignas, os tumores mamários são o tipo mais frequentemente diagnosticado em cadelas, representando um importante problema

clínico (KASZAK *et al.*, 2018). Vários estudos europeus mostraram uma taxa de incidência de aproximadamente 200/100.000 cães/ano (SLEECKX *et al.*, 2011); superior à observada em humanos, entre os quais a incidência anual é de 85 casos por 100.000 mulheres (BRAY *et al.*, 2018)

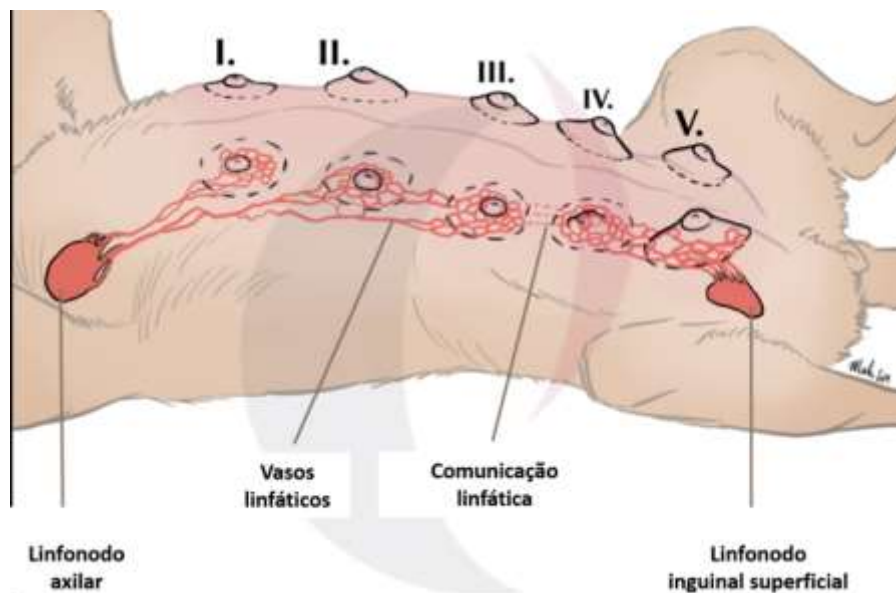
Diferentemente do humano, o câncer de mama canino ainda é mal caracterizado em nível molecular, sendo escassos na literatura os estudos que buscam entender os fatores epigenéticos subjacentes ao seu desenvolvimento. Diante disso, pesquisas que objetivam a melhor compreensão dos mecanismos epigenéticos que possam auxiliar no diagnóstico precoce como em tratamentos mais eficazes voltados à saúde animal têm ganhado importante destaque no campo de pesquisa veterinária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia da glândula mamária canina

Na espécie canina, as glândulas mamárias se estendem da região torácica à inguinal. Macroscopicamente são constituídas, em média, por cinco pares de glândulas distribuídas bilateralmente, simétricas e paralelas na linha mediana ventral. Sua irrigação é fornecida pela artéria epigástrica superficial cranial e por meio de ramos perfurantes da artéria torácica interna, intercostal e torácica lateral (glândulas torácicas craniais e caudais e glândula abdominal cranial). Já as glândulas abdominais caudais e inguinais recebem sangue da artéria epigástrica superficial caudal e dos ramos periovulares da artéria pudenda externa. Os linfonodos axilares drenam as torácicas craniais e caudais e abdominais craniais; linfonodos inguinais drenam abdominais craniais e caudais e inguinais. Existe também comunicação entre as glândulas craniais e caudais do mesmo lado, assim como entre as glândulas direita e esquerda por meio da reorganização linfática que pode ser originada pelo próprio tumor (FIGURA 1) (LUIZ; MIGLINO; SANTOS, 2002; LUIZ *et al.*, 2004).

Figura 1 - Nomenclatura e drenagem das glândulas mamárias em caninos



Legenda: I. Torácica craniana, II. Torácica caudal, III. Abdominal craniano, IV. Abdominal caudal, V. Inguinal.

Fonte: Adaptada de uma ilustração de M. L. Cárdenas.

A drenagem linfática das glândulas das mamas torácicas craniais e caudais é feita pelos linfonodos axilares. Por outro lado, as mamas abdominais craniais podem apresentar drenagem mista (linfonodo axilar e inguinal). Essa drenagem pode sofrer variação individual, assim como ser influenciada pelo estágio da lactação ou pela presença de massa tecidual e/ou obstrutiva (MUNSON; MORESCO, 2007).

Em relação à drenagem linfática dos tumores mamários, há evidências de que a neoplasia mamária pode alterar a drenagem linfática padrão, formando novos canais de drenagem, aumentando a rede vascular linfática, promovendo o recrutamento de maior número de linfonodos, possibilitando tanto a ligação linfática entre as cadeias contralaterais como também entre as glândulas adjacentes de uma mesma cadeia, na direção cranial e caudal (QUEIROGA; LOPES, 2002; PEREIRA *et al.*, 2003). Acredita-se que, em decorrência de maior volume de tecido mamário estar presente nos últimos pares da cadeia mamária, as glândulas inguinais são as mais afetadas por neoplasia (LIMA; PECHUTTI, 2019). Podem ter apresentação única ou múltipla, podendo ser facilmente palpáveis e reconhecidas como nódulos ou massas discretas dentro da glândula mamária (FILGUEIRA, 2005), sendo que o aumento de volume da glândula mamária em cadelas não relacionado à pseudociese, à lactação ou à mastite deve ser investigado, pois a incidência de neoplasia maligna é de 50% (ZUCCARI; SANTANA; ROCHA, 2001).

2.2 Neoplasia mamária canina

As neoplasias são proliferações progressivas, não funcionais, compostas de células que não apresentam respostas apropriadas aos mecanismos que controlam o crescimento celular (GILBERTSON *et al.*, 1983). Nos últimos anos, a incidência de câncer em cães tem aumentado progressivamente, principalmente pela maior longevidade proporcionada pelo uso de alimentos comerciais balanceados, pelo controle de pragas e parasitas e pela melhora no diagnóstico oferecido aos animais (CHAN; TAPIA RICO, 2019; GARCÍA *et al.*, 2019).

Embora os avanços na oncologia tenham sido significativos, o câncer ainda continua sendo um grande desafio à ciência médica. Observa-se que nos últimos anos a relação animal-humano sofreu mudanças e os animais tornaram-se membros da família humana. Assim, surgiram avanços na assistência veterinária que acarretaram

aumento da expectativa de vida dos cães e, conseqüentemente, aumento da incidência de doenças relacionadas à idade, como o câncer.

Os tumores mamários são o tipo mais frequentemente diagnosticado em cadelas, representando um importante problema clínico (KASZAK *et al.*, 2018). Vários estudos europeus mostraram uma taxa de incidência de aproximadamente 200/100.000 cães/ano (SLEECKX *et al.*, 2011); superior à observada em humanos, entre os quais a incidência anual é de 85 casos por 100.000 mulheres (BRAY *et al.*, 2018). Entretanto, se levarmos em conta os diferentes tempos de vida das duas espécies, a maior incidência de desenvolvimento de tumor mamário é semelhante entre cães (8-11 anos) e humanos (50-58 anos); essa taxa tem mostrado aumentar com a idade, com a doença raramente diagnosticada antes dos 5 e dos 25 anos de idade em cães e humanos, respectivamente (SCHNEIDER, 1970). Os tumores malignos correspondem a 26% a 73% das ocorrências, sendo o carcinoma o tumor maligno mais comum na mama (MORRISON, 1998; MISDORP *et al.*, 1999; PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2000). Os tumores mamários caninos são um grupo heterogêneo de neoplasias e de ocorrência natural que têm várias características em comum com a condição em humanos. Ambos apresentam similaridade em várias características epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas (SANTOS *et al.*, 2020). Entre essas, podemos destacar a faixa etária de aparecimento, a morfologia, o efeito protetor da ovariário-histerectomia, a presença de receptores de estrógeno e progesterona na massa tumoral, os órgãos-alvo de metástase, a evolução clínica e a hereditariedade, em alguns casos (SAAD *et al.*, 2019).

Com base nas informações clínicas limitadas disponíveis na medicina veterinária, os medicamentos eficazes no tratamento de câncer de mama humano, como a ciclofosfamida, o 5-fluorouracil e a doxorubicina, têm apresentado resultados satisfatórios no tratamento de tumores malignos da glândula mamária de cadelas. Entretanto, cabe ressaltar que estudos prospectivos randomizados são necessários para avaliar a real eficácia da quimioterapia em cães com tumores de glândula mamária de alto risco e, assim, determinar quais drogas e protocolos seriam os mais eficazes. Contudo, até que esses estudos sejam realizados, o tratamento dos tumores da glândula mamária canina será baseado na compreensão individual do oncologista sobre a biologia do tumor, a experiência e a interpretação dos estudos disponíveis (HARVEY; GILBERTSON, 1977).

Como em humanos, a neoplasia canina é considerada uma doença de etiologia multifatorial, associada a fatores genéticos, nutricionais e ambientais. Esse cenário nos permite afirmar que sua etiologia é dependente da interação entre os componentes genéticos e os fatores ambientais e nutricionais do animal (UJVARI *et al.*, 2018).

Em relação ao risco de desenvolver tumores de glândula mamária, ainda não se sabe se a frequência dos tumores mamários caninos está relacionada à raça. Os estudos realizados não foram capazes de produzir resultados conclusivos a esse respeito, devido principalmente às variações geográficas na densidade da raça (DALECK *et al.*, 1998). Por outro lado, Sonnenschein e colaboradores (1991), em estudo com cães portadores de carcinomas mamários, demonstraram que animais alimentados com uma dieta com baixo teor de gordura e alta proteína tiveram uma sobrevida significativamente prolongada em comparação a cães alimentados com uma dieta com alto teor de gordura e baixa proteína (SHOFER *et al.*, 1989). Também foi demonstrado nesse estudo que a obesidade e uma dieta rica em carne vermelha foram fatores de risco independentes para o desenvolvimento de tumores mamários (PERÉZ-ALENZA *et al.*, 1998). Diante dos possíveis fatores implicados na fisiopatologia do câncer de mama canino, idade avançada é observada na maioria dos casos diagnosticados (SORENMO *et al.*, 2009). O papel dos hormônios sexuais nessas neoplasias está extensamente estudado e estabelecido (CANADAS-SOUSA *et al.*, 2019). Essa hipótese é sustentada pelo fato de a incidência desses tumores aumentar de forma pronunciada quando a castração é realizada após o segundo ciclo estral. Quando as cadelas são castradas antes do primeiro ciclo estral, o risco de desenvolverem tumores de mama é de 0,05%, aumentando para 8% após o primeiro ciclo estral e para 26% após o segundo ciclo (DALECK *et al.*, 1998).

Clinicamente, as neoplasias benignas e malignas apresentam características diferentes em relação à velocidade, aos limites e ao modo de crescimento, ao grau de diferenciação, à composição estromal, ao potencial metastático e à recorrência (DIAS *et al.*, 2016). Embora os tumores da glândula mamária canina possam ser benignos, aproximadamente 40% a 50% dessas lesões são malignas e frequentemente se tornam fatais devido ao desenvolvimento de metástases (PRIESTER; MANTEL, 1971).

As neoplasias mamárias caninas benignas normalmente apresentam-se com diâmetro menor que 3 centímetros, circunscritas, firmes à palpação, não aderidas aos

tecidos adjacentes e com evolução lenta (DE NARDI *et al.*, 2002). Por outro lado, as neoplasias malignas apresentam, na maioria dos casos, tamanho superior a 5 centímetros, aderências a planos profundos, podendo apresentar, por vezes, ulceração cutânea (SAAD *et al.*, 2019), além de exibirem caráter invasivo com rápida evolução e frequente associação a metástases linfonodais e pulmonares (XAVIER; LIMA; JUNIOR, 2017). Entretanto, algumas lesões apresentam características histopatológicas limítrofes entre expansões benignas e malignas, representando um desafio diagnóstico. A presença de anaplasia, a invasão de tecidos vizinhos e, principalmente, a invasão de vasos sanguíneos e linfáticos sugerem seu potencial em produzir metástases (MUNSON; MORESCO, 2007).

A Classificação Histológica Internacional de Tumores Mamários da Cadela e da Gata da Organização Mundial da Saúde combina a classificação morfológica histogênica e descritiva, incorporando características prognósticas histológicas que têm sido associadas ao aumento da malignidade (MISDORP, 1976).

A maioria dos tumores da glândula mamária é de origem epitelial. São frequentes também as neoplasias mistas, associando componentes epiteliais e mesenquimais, como áreas de cartilagem e osso. Neoplasias mamárias puramente mesenquimais são menos frequentes (HARVEY; GILBERTSON, 1977; SLEECKX *et al.*, 2011). A classificação histológica pioneira para displasias e tumores mamários caninos foi publicada em 1974, seguindo-se uma modificação em 1999. As neoplasias mamárias benignas mais conhecidas são os adenomas, surgindo como nódulos bem delimitados, não infiltrativos, compostos por túbulos, que são revestidos por uma única camada de células epiteliais, de formato que pode variar de cuboide a colunar e quantidade moderada de citoplasma eosinofílico. Os núcleos são centrais, com forma redonda a oval, cromatina finamente pontilhada e pequeno nucléolo central, com mínima anisocariose e anisocitose e estroma fibrovascular de escasso a moderado (NAZÁRIO; REGO; OLIVEIRA, 2007).

As neoplasias malignas mais frequentes na mama se originam das células epiteliais e são denominados carcinomas. Em humanos, o protocolo mais empregado para a gradação histológica é o descrito por Elston e Ellis (2001), o qual apresenta uma forte relação com o prognóstico do paciente. Esse protocolo passou a ser utilizado também em tumores de mama caninos (KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2001; NIETO *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2003).

Usualmente são classificados como carcinoma simples, complexo ou especial (TAVASOLY *et al.*, 2013; ALBERTS *et al.*, 2017). Estudos têm demonstrado que os carcinomas caninos simples correspondem histologicamente aos carcinomas da mama humanos e abrigam extensas aberrações genômicas, muitas das quais recapitulam fielmente as principais características do câncer de mama humano. Os carcinomas simples caninos não apresentam proliferação de células mioepiteliais e são histologicamente comparáveis aos carcinomas ductais ou lobulares humanos (LIU *et al.*, 2014).

Por outro lado, os carcinomas caninos complexos, os quais são caracterizados pela proliferação de células luminiais e mioepiteliais, parecem não ter um envolvimento direto das anormalidades genômicas, apresentando, em vez disso, importantes alterações na expressão de genes modificadores da cromatina, indicando que sua origem se deva principalmente a alterações epigenômicas (LIU *et al.*, 2014).

Um carcinoma *in situ* é um tumor epitelial com características malignas, porém sem evidência de invasão do tecido adjacente. Essas lesões são frequentemente multicêntricas e podem crescer a partir de ductos ou lóbulos preexistentes (BEVERIDGE; SOBIN, 1974; TAVASOLY *et al.*, 2013).

Dentre as diferentes classificações dos carcinomas caninos, os carcinomas tubulares ou adenocarcinomas constituem o tipo mais comum de tumor. Caracterizam-se por apresentar elevada heterogeneidade, tanto em termos morfológicos como em comportamento biológico (TAVASOLY *et al.*, 2013). Esses tumores preservam em parte a morfologia ductal ou tubular original da glândula mamária e cursam com sobrevida prolongada (TAVASOLY *et al.*, 2013). No carcinoma tubular as células são dispostas em paliçada com delimitação luminal e frequente estratificação. Os núcleos podem ser hipocrômicos, normocrômicos ou hiperocrômicos, além de apresentarem nucléolos múltiplos ou aumentados de volume. A atividade mitótica também é variável, estando, em geral, aumentada (HARVEY; GILBERTSON, 1977).

O carcinoma inflamatório mamário (CMI) é um subtipo raro de tumor das glândulas mamárias, que ocorre espontaneamente em mulheres (DE SÁ; REPETTI, 2011), e descrito em cadelas pela primeira vez em 1983 (SILVA *et al.*, 2019), caracterizado pelo comportamento altamente agressivo e por elevada taxa de mortalidade (MARCONATO *et al.*, 2009). A neoplasia também já foi caracterizada em gatas, apresentando sintomatologia semelhante à observada nas demais espécies

(PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2004). Sua frequência de aparecimento na mulher é de 1% a 4% (BRUN *et al.*, 1988). Em relação às cadelas, mesmo não existindo dados relativos à sua frequência, acredita-se que seu percentual de acometimento não ultrapasse os 4% (XAVIER; LIMA; JUNIOR, 2017). Embora a literatura mencione que fatores genéticos, nutricionais e ambientais possam estar correlacionados ao desenvolvimento, sua etiologia nas cadelas ainda é desconhecida. É considerado um tumor incomum, com curso clínico fulminante e uma taxa de sobrevivência extremamente baixa (CLEMENTE *et al.*, 2009; XAVIER; LIMA; JUNIOR, 2017).

As características clínicas e histológicas do carcinoma inflamatório são semelhantes, entre humanos e caninos. Ambos apresentam edema, eritema, firmeza, sensação dolorosa e calor nas glândulas mamárias acometidas (HIRKO *et al.*, 2014). Histologicamente, as espécies também apresentam importantes similaridades, sendo a característica histológica que norteia o diagnóstico do CMI a presença de êmbolos neoplásicos em vasos linfáticos da derme superficial (BENTUBO *et al.*, 2006). Em geral, apresentam extensa infiltração de células inflamatórias, elevado número de células pleomórficas com núcleos bizarros ricos em cromatina e células epiteliais anaplásicas nos linfonodos regionais (GOMES *et al.*, 2006; DE SÁ; REPETTI, 2011).

2.3 Epigenética

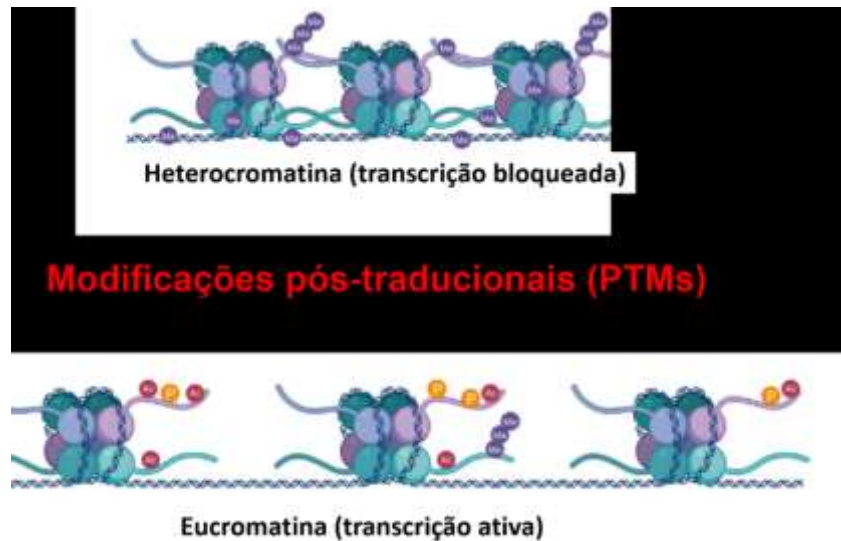
O termo epigenética originou-se do prefixo grego *epi*, que significa “acima ou sobre algo” (NOBLE, 2015), e abrange amplamente o estudo de todas as alterações herdáveis na função e na expressão dos genes que não estão associadas a uma mudança na sequência do DNA genômico (HO; BURGGREN, 2010). Introduzido inicialmente por Conrad Waddington no início da década de 1940, foi definido por ele como “o ramo da biologia que estuda as interações causais entre genes e seus produtos que dão origem ao fenótipo”. Recentemente o termo foi redefinido pelo *International Journal of Epidemiology* como o estudo de mudanças na função do gene que podem ser herdáveis mitoticamente e/ou meioticamente e que não implicam uma mudança na sequência de DNA (DUPONT; ARMANT; BRENNER, 2009).

Em 1969, Griffith e Mahler sugeriram que as modificações covalentes nas bases de DNA poderiam modular a expressão gênica. Hoje essas modificações são reconhecidas como mecanismos epigenéticos e desempenham um papel fundamental nas funções celulares, contribuindo nos processos de desenvolvimento

além de influenciar as redes de comunicação e sinalização celular. Assim, a manutenção do código epigenético é crítica tanto para a realização dos processos celulares básicos como também de processos complexos como a diferenciação celular (ESLAMINEJAD; FANI; SHAHHOSEINI, 2013).

Entre os principais mecanismos de regulação epigenética, destacam-se as modificações químicas no DNA, como metilação e hidroximetilação de citosinas, modificações pós-translacionais das histonas (metilação, ubiquitinação, acetilação e fosforilação) e os micro RNAs (miRNAs) não codificantes (TOST, 2009; TOST, 2010). As modificações pós-traducionais (PTMs) de histonas são cruciais para a regulação dinâmica e persistente do genoma, pois as histonas são proteínas essenciais para o empacotamento do genoma eucariótico em seu estado fisiológico. Essas modificações armazenam e transmitem sinais sobre o estado de compactação do genoma através de seus múltiplos sítios de acetilação e/ou metilação distribuídos na cauda das histonas que fazem parte do nucleossoma (TAYLOR; YOUNG, 2021). Essas unidades básicas da cromatina são estruturas dinâmicas envolvidas na regulação da expressão gênica. Sua estabilidade é alcançada por meio das interações histonas-DNA que, devido às caudas de histonas serem domínios de proteínas carregados positivamente, fazem com que o DNA carregado negativamente tenha alta afinidade (TORRES-PEREZ *et al.*, 2021). Essa afinidade do DNA é responsável pelo controle do estado da cromatina, a qual pode estar no estado de heterocromatina (alta afinidade), transcrição reprimida, e no estado de eucromatina (baixa afinidade) transcrição ativada (FIGURA 2) (STRICKFADEN, 2021).

Figura 2 - Modificações pós-traducionais de histonas



Fonte: Adaptada de Torres-Perez *et al.* (2021).

Por definição, os RNAs não codificantes (ncRNAs) são moléculas de RNA que não codificam proteínas. Atualmente temos dois grupos principais, os pequenos, classificados em microRNAs (miRNAs), e os RNAs longos não codificantes (lncRNAs), moléculas de RNA com mais de 200 nucleotídeos que não codificam proteínas (HOMBACH; KRETZ, 2016). Há tempos, estudos têm demonstrado que tanto os miRNAs como os lncRNAs podem atuar como reguladores-chave da expressão gênica em muitas vias e sistemas celulares diferentes. Dentre essas moléculas, os miRNAs são os mais estudados e atuam como silenciadores pós-transcricionais, inibindo a tradução de RNAs mensageiros-alvo. Também desempenham papel-chave no processo carcinogênico em vários tipos de neoplasias e, conseqüentemente, podem ser utilizados como potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico no câncer (ALIZADEH *et al.*, 2019).

Por outro lado, os lncRNAs são menos caracterizados em termos de estrutura e função. Essa classe de ncRNA pode desempenhar diferentes funções como modificar a estrutura da cromatina (TSAI *et al.*, 2010), atuar no *imprinting* genômico (MERCER; MATTICK, 2013), alterar a atividade transcricional de diferentes genes (KHALIL *et al.*, 2009) ou interferir nas etapas de tradução, processamento e na estabilidade dos mRNAs (TRIPATHI *et al.*, 2013). Ao atuarem no processo de remodelamento da cromatina e recrutarem complexos modificadores de cromatina, os

lncRNAs afetam diretamente o processo de transcrição gênica (TSAI *et al.*, 2010). Adicionalmente, também podem atuar no recrutamento e na atividade das DNA metiltransferases (DNMTs) e, desse modo, modular o processo de metilação dos dinucleotídeos CpG e promover alterações na expressão gênica (LAW; JACOBSEN, 2010). Dessa forma, sua função na carcinogênese está relacionada ao controle nos processos de proliferação celular (TRIPATHI *et al.*, 2013), à resistência à apoptose (PICKARD *et al.*, 2013), à metástase (YING *et al.*, 2006), à indução da angiogênese e à evasão de supressores tumorais (NING *et al.*, 2016).

Entre os vários mecanismos epigenéticos conhecidos até o momento, destacamos a metilação do DNA como um dos mais estudados. A metilação do DNA é um mecanismo epigenético, guiado pelas enzimas DNMTs, que consiste na adição covalente de um grupamento metil (CH₃), doado pelo substrato S-adenosilmetionina (SAM), ao carbono 5' do dinucleotídeo CpG, formando a 5-metil citosina (5-meC) (SAWAN *et al.*, 2008). Em mamíferos, até o momento foram identificados cinco membros de DNMTs, as DNMT1, 2, 3A, 3B e 3L, divididas em dois grupos (UYSAL; AKKOYUNLU; OZTURK, 2015).

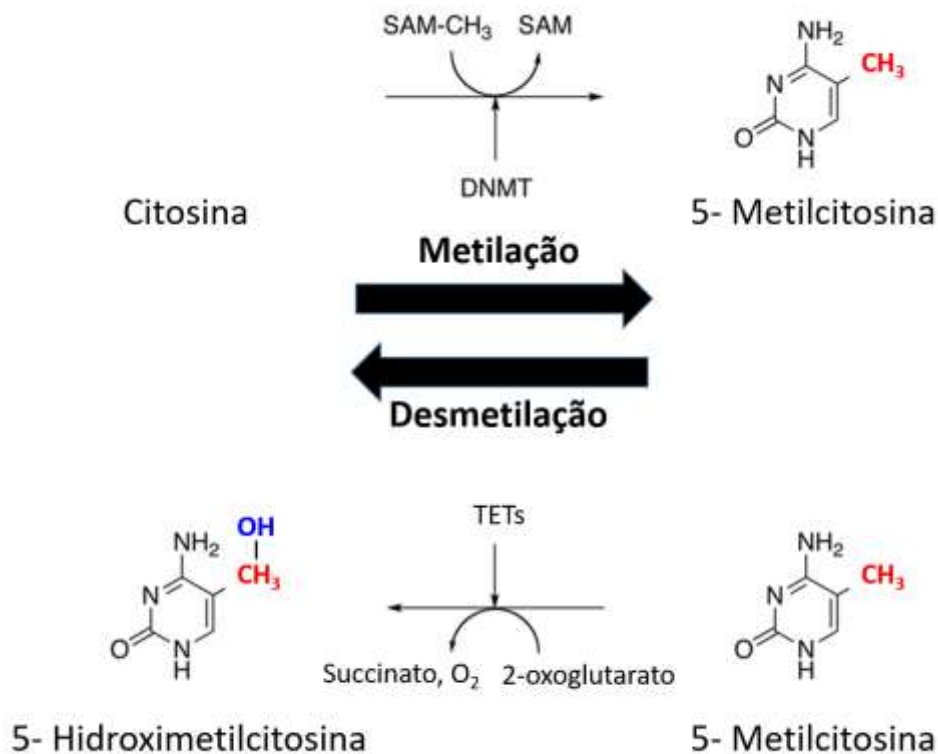
O primeiro grupo é formado pela DNMT1, que é denominada DNMT de manutenção, por apresentar alta afinidade por fitas de DNA hemimetilado. Por esse motivo, é responsável pela manutenção dos padrões de metilação do DNA durante a replicação. O segundo grupo, as DNMTs de *nov*o, é representado pela DNMT3A e 3B, responsáveis pela ocorrência das ondas sequenciais de metilação *de novo* em regiões do genoma sem nenhuma indicação prévia de metilação (CHEN; ZHANG, 2020; BOGDANOVIC; LISTER, 2017). DNMT2 e DNMT3A e DNMT3B são enzimas menos estudadas. DNMT2 é considerada uma metiltransferase de RNA transportador (tRNA) (EHRENHOFER-MURRAY, 2017) e DNMT3L, apesar da ausência de atividade enzimática, estimula a metilação *de novo*, através da interação com as DNMT3A e DNMT3B (JIA *et al.*, 2007).

O padrão de metilação do DNA pode ser perdido tanto passivamente, devido à inibição da atividade da DNMT de manutenção, ou, por processo ativo, quando a 5-meC é removida enzimaticamente. Embora o mecanismo de metilação do DNA esteja bem caracterizado, a mesma afirmação não podemos fazer para o processo de desmetilação, o qual ainda não foi totalmente elucidado (GEHRING; BUBB; HENIKOFF, 2009). Nesse sentido, os estudos apontam para uma família de proteínas de translocação (TET). A família TET em mamíferos é composta por três membros,

TET1, 2 e 3, os quais compartilham um elevado grau de homologia no seu domínio catalítico (LOENARZ; SCHOFIELD, 2009).

Essas proteínas são capazes de oxidar a citosina metilada (5-meC) e catalisar a conversão da 5-meC em 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC), formando também a 5-formilcitosina e 5-carboxilcitosina para serem posteriormente reconhecidas e eliminadas por glicólise (DAO *et al.*, 2014). No entanto, o mecanismo de desmetilação ainda não foi totalmente elucidado; estudos sugerem que vias ou mecanismos alternativos podem estar atuando em conjunto com as TETs na regulação da dinâmica dos eventos de desmetilação. Contudo, os estudos concordam que a oxidação inicial de 5-meC para 5-hmeC pelas TETs é um pré-requisito indispensável para os processos subsequentes de desmetilação do DNA, independentemente da forma como esses passos finais serão mediados (MAITI; DROHAT, 2011) (FIGURA 3).

Figura 3 - Mecanismo de metilação e desmetilação ativa do DNA



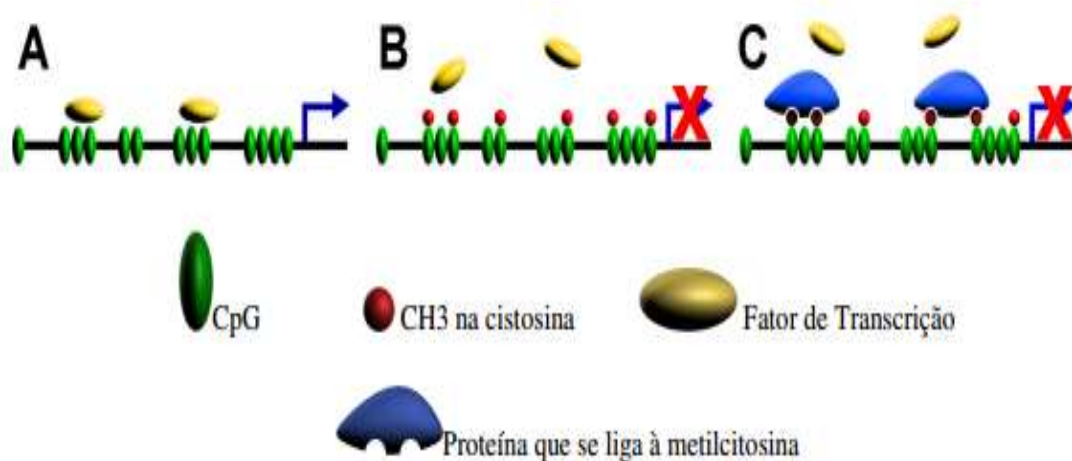
Legenda: O esquema representa a transferência do grupo metil a citosina pela ação das DNA metiltransferases (DNMTs) e sua remoção pela ação das desmetilases, proteínas pertencentes à família das proteínas de translocação (TETs).

Fonte: Gibney; Nolan (2010).

Em organismos eucariotos, a metilação do DNA ocorre predominantemente em regiões repetitivas do genoma que possuem abundância de resíduos dinucleotídeos CpG, conhecidas como ilhas CpG. Em geral os dinucleotídeos CpG são relativamente raros no genoma dos mamíferos, ocorrendo normalmente em regiões densas chamadas ilhas CpG, que se localizam principalmente em regiões promotoras de genes funcionais (FERREIRA; ESTELLER, 2018; JOHNSON; BELSHAW, 2008).

A metilação dos dinucleotídeos CpGs em regiões promotoras ou no primeiro éxon de um gene pode modular e/ou silenciar a expressão gênica direta ou indiretamente (BRENET *et al.*, 2011; TUREK-PLEWA; JAGODZINSKI, 2005). No mecanismo direto, a metilação nos CpGs altera a acessibilidade do DNA aos fatores de transcrição. O mecanismo indireto de regulação gênica é mediado pela ação de proteínas com domínio de ligação de metil-CpG (meCpGs) que possuem afinidade e reconhecem 5-meC em ilhas CpG, bloqueando assim a ligação dos fatores de transcrição, ou por proteínas que formam complexos com outras proteínas de remodelamento de cromatina e estão envolvidas na estabilização da estrutura da heterocromatina (FIGURA 4) (TUREK-PLEWA; JAGODZINSKI, 2005).

Figura 4 - Mecanismo de inibição da transcrição gênica pela metilação de DNA



Legenda: (A) Região promotora desmetilada permitindo a ligação dos fatores de transcrição; (B) Metilação impedindo a ligação dos fatores de transcrição; e (C) Bloqueio da ligação dos fatores de transcrição na região promotora pela ação das proteínas que se ligam à metilcitosina em ilhas CpG (meCpGs).

Fonte: Adaptada de Attwood; Yung; Richardson (2002).

2.3.1 Epigenética e câncer

É amplamente aceito que o desenvolvimento tumoral é impulsionado pelo acúmulo de sucessivas alterações genéticas e epigenéticas que afetam a estrutura e a função do genoma (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Enquanto as alterações genéticas interrompem os padrões normais de expressão gênica, às vezes levando à expressão de proteínas anormais e constitutivamente ativas, as alterações epigenéticas desregulam os mecanismos de controle transcricional, levando ao silenciamento ou à ativação inadequada de genes associados à transformação tumoral (LIU *et al.*, 2014; FEINBERG, 2001). As modificações epigenéticas podem afetar a acessibilidade do DNA, tendo grande influência nos processos de transcrição, reparo de DNA e replicação (BAYLIN; JONES, 2011).

Em tumores, a perda global de metilação (hipometilação) do genoma é observada e sugere-se que a hipometilação inicia e propaga a carcinogênese por meio de indução de instabilidade cromossômica e ativação transcricional de oncogenes (TOST, 2010). Dessa forma, a relação entre alterações epigenéticas e o desenvolvimento tumoral é sustentada principalmente pela ocorrência de eventos iniciais de hipometilação que têm como consequência a ativação transcricional de oncogenes e, num segundo momento, a repressão transcricional de genes supressores tumorais mediada por eventos de hipermetilação (BAYLIN; JONES, 2016).

Embora a hipermetilação de genes específicos tenha sido bem caracterizada no câncer, o impacto da hipometilação global do DNA ainda necessita de estudos adicionais. Sabemos que a hipometilação ocorre principalmente em elementos repetitivos e está associada, sobretudo, a instabilidades genômicas e cromossômicas. Ocorre em cerca de 50% dos cânceres de mama e se correlaciona com grau, estágio e malignidade (ATALAY, 2013).

Os elementos repetitivos do DNA estão dispersos por todo o genoma de mamíferos e constituem cerca de 50% do genoma humano (ZHENG *et al.*, 2017). Dentre as diferentes sequências, duas se destacam como principais: os elementos transponíveis de classe I do DNA (LINE-1), pertencentes ao grupo de elementos nucleares longos e intercalados L1, os quais compõem cerca de 17% do genoma humano e 34% do genoma canino (BÖHNE *et al.*, 2008); e os elementos repetidos intercalados curtos (Alu), compondo 11% do genoma humano (LANDER *et al.*, 2001).

Os Elementos LINE-1, em especial, são um tipo de sequência repetitiva que está dispersa ao longo de todo o genoma, sendo o estudo de seu padrão de metilação amplamente utilizado na compreensão de inúmeras doenças de caráter multifatorial, estando correlacionado diretamente à metilação global do genoma (KITKUMTHORN; MUTIRANGURA, 2011). Durante o desenvolvimento do processo carcinogênico, sua hipometilação está diretamente correlacionada com a ocorrência de mudanças genéticas como: instabilidade genômica, mutação de genes supressores tumorais e transcrição alternativa de oncogenes (ALBERTI; ZIMMET, 1998).

As repetições LINE-1 são usadas como marcadores substitutos para estado de metilação global (LUO; LU; XIE, 2014) por causa de sua alta abundância e densidade. Em tecidos normais, encontram-se principalmente hipermetiladas, podendo variar em alguns tipos de tecidos e localizações do genoma (PHOKAEW *et al.*, 2008). Em humanos, sua hipometilação é comum na maioria dos cânceres e se mostra cada vez mais reduzida em estágios avançados do desenvolvimento tumoral (VAN HOESEL *et al.*, 2012; CHOI *et al.*, 2007).

O fato de as alterações epigenéticas no padrão de metilação em sequências repetidas do DNA serem eventos normalmente observados nos estágios que antecedem a transformação tumoral (ZEGGAR *et al.*, 2020) e comporem aproximadamente 20% do genoma em mamíferos o qualifica como um potencial biomarcador, o qual pode ser utilizado tanto para o diagnóstico precoce como também no acompanhamento da progressão tumoral (KITKUMTHORN; MUTIRANGURA, 2011).

3 JUSTIFICATIVA

Pesquisas que visam à busca pela compreensão dos mecanismos moleculares que possam auxiliar no diagnóstico e no tratamento, bem como em perspectivas de prevenção e controle de câncer em animais têm ganhado importante destaque no campo de pesquisa veterinária, principalmente no Brasil, que possui uma posição de destaque em relação à população canina, com cerca de aproximadamente 52 milhões de cães – a segunda maior população canina mundial. É importante ressaltar ainda que, dentre as patologias diagnosticadas entre cães, os tumores ocupam um lugar de destaque, sendo as neoplasias mamárias o tipo mais frequente, principalmente em cadelas não castradas. Dos tumores mamários diagnosticados, 50% são malignos e apresentam evolução metastática e, conseqüentemente, prognóstico reservado. É importante ressaltar que, assim como nas mulheres, o câncer mamário está entre os cânceres mais frequentes em cadelas. No entanto, ao contrário do câncer de mama humano, o câncer de mama canino é mal caracterizado em nível molecular e ainda são poucos os estudos buscando entender os fatores epigenéticos subjacentes ao seu desenvolvimento nesses animais. Dessa forma, este estudo propõe correlacionar o padrão de metilação dos Elementos LINE-1 com o estadiamento do câncer mamário canino, uma vez que, além de contribuir para a melhor elucidação da fisiopatologia molecular, as neoplasias caninas podem servir como modelo de estudo em oncogênese e oncologia comparada, para que se tenha melhor compreensão da biologia tumoral, podendo auxiliar no direcionamento do estabelecimento de fatores epigenéticos para o estadiamento tumoral.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Correlacionar o padrão de metilação dos Elementos LINE-1 em tecido mamário hígido e neoplásico canino.

4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar o padrão de metilação dos Elementos LINE-1 em amostras de tecido mamário canino hígido, linhagens de células de câncer de mama canino, adenomas e carcinomas inflamatórios caninos;
- ✓ Comparar o padrão de metilação dos Elementos LINE-1 entre glândulas mamárias caninas híginas, linhagens de células de câncer de mama canino, adenomas mamários e carcinomas inflamatórios de mama canino.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

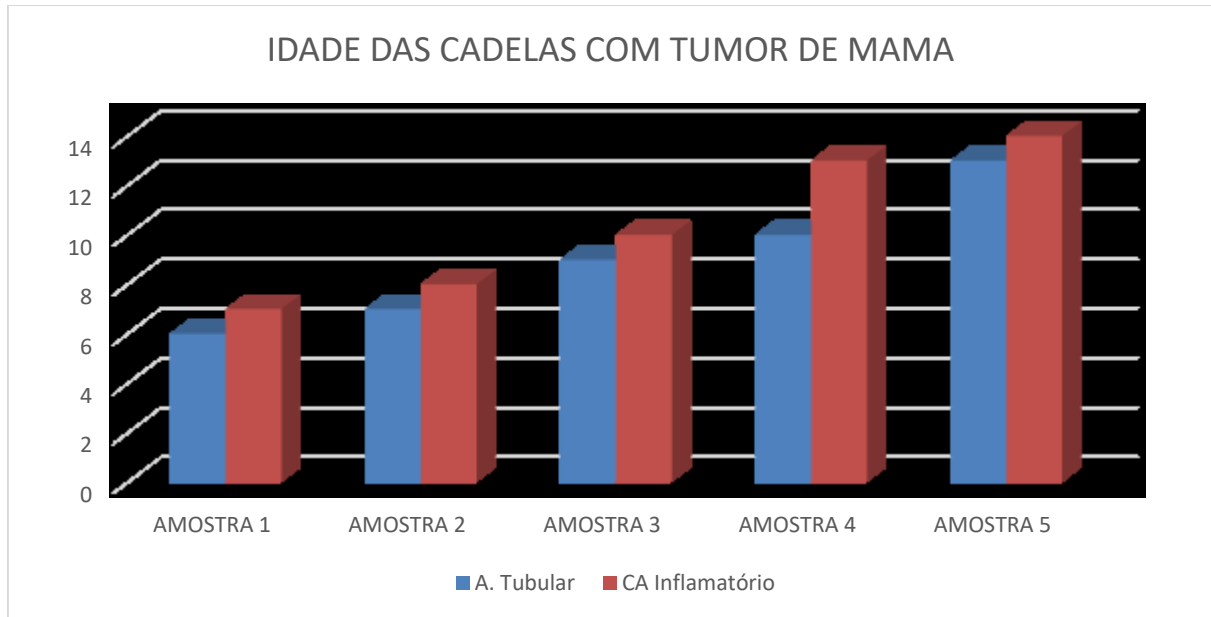
5.1 Material biológico e seleção de amostras

Para realização do estudo molecular foram utilizadas amostras de tecido mamário canino hígido e de lesões neoplásicas caninas benignas e malignas. As amostras híidas e neoplásicas de adenoma tubular e carcinoma inflamatório foram fixadas em formol a 10%, submetidas à emblocagem em parafina e à microtomia, sendo, no mínimo, cinco cortes de cada tipo de amostras, em cortes histológicos de 5 µm (micrômetro) de espessura, corados pela hematoxilina-eosina, avaliados em microscópio de luz. As lesões foram classificadas segundo a classificação proposta por Misdorp *et al.* (1999), e a graduação foi feita pela classificação de Elston & Ellis (1991).

As amostras de adenoma tubular e de carcinoma inflamatório são de cadelas com idade variando entre 6 e 13 anos e entre 7 e 14 anos, respectivamente (GRÁFICO 1).

As linhagens de células de câncer de mama canino foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Carlos E. Fonseca Alves, coordenador do Laboratório de Imunopatologia e Biologia do Câncer - (LaCIB) do Departamento de Cirurgia Veterinária e Anestesiologia Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Gráfico 1 - Idade das cadelas das amostras histológicas



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 1 - Tipo de neoplasia, idade e raça das cadelas das amostras histológicas

Neoplasia	Raça	Idade
Adenoma Tubular	Shih-Tzu	6
Adenoma Tubular	Lhasa- Apso	7
Adenoma Tubular	SRD	9
Adenoma Tubular	Maltês	10
Adenoma Tubular	SRD	13
CA Inf.	Lhasa-Apso	7
CA Inf.	Rottweiler	8
CA Inf.	SRD	10
CA Inf.	Cocker	13
CA Inf.	Shih-Tzu	14

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Cultura de Células

As linhagens CM1, isoladas de carcinoma sólido, e MM4, isoladas de um linfonodo metastático, estabelecidas pelo grupo do Laboratório de Imunopatologia e Biologia do Câncer - (LaCIB), foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Carlos E. Fonseca Alves. Ambas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), que foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e

1% de antibióticos (100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina) em estufa úmida a 37°C, contendo 5% de CO₂, com repiques periódicos a cada 72h (DE FARIA LAINETTI *et al.*, 2020).

5.3 Biologia Molecular

Para realização do estudo de metilação da região promotora de LINE-1, o DNA genômico foi extraído a partir de cortes histológicos de amostras parafinadas de adenoma mamário e carcinoma inflamatório mamário de cadelas e de cultura de células de tumor mamário canino.

5.3.1 Desparafinização

Como etapa inicial, os cortes histológicos foram incubados por 30 minutos a 57°C, com 1 mL de xilol. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 RPM por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o precipitado (amostras de tecido desparafinizadas) armazenado a -20°C para posterior extração do DNA.

5.3.2 Extração do DNA

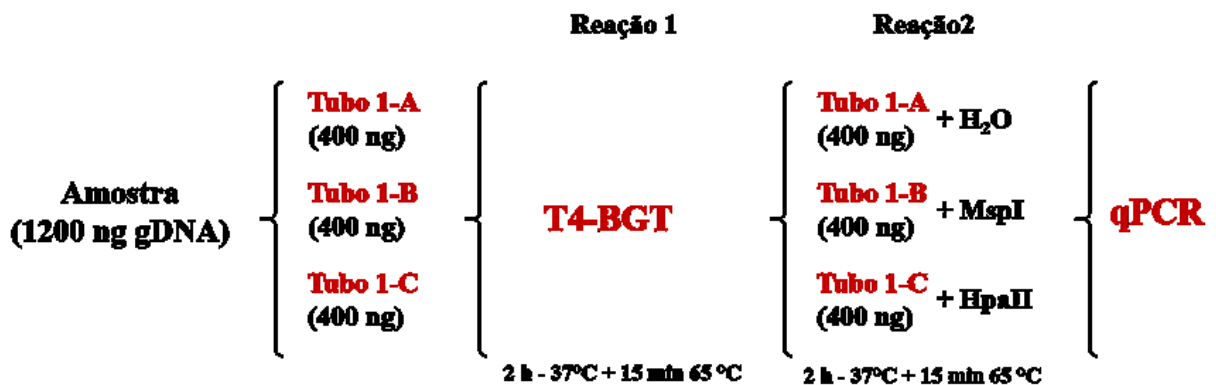
Para obtenção das amostras de DNA genômico (gDNA), as células de câncer de mama canino e as amostras de cortes histológicos (precipitados) foram homogeneizadas em tampão de extração (10 mM de Tris pH 3,0; 0,5% de SDS, 5 mM de EDTA) e digeridas com proteinase K (20 mg/mL) por 16h a 56°C. No dia seguinte, o DNA foi isolado pelo método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (TREVILATTO; LINE, 2000). A quantidade e a pureza do gDNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

5.3.3 Tratamento do DNA

Cada amostra de gDNA foi dividida em três tubos contendo a mesma concentração (400 ng) e foram digeridas com as endonucleases *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), que reconhece e corta todas as sequências CCGG

(metiladas e não metiladas), e pela *HpaII* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), que reconhece todas as sequências CCGG, com a diferença de que sequências CCGG metiladas (5-meC) promovem a inibição de sua atividade catalítica. No terceiro tubo foi adicionada a mesma quantidade de H₂O (gDNA não digerido = Controle 100%). Todas as reações foram realizadas separadamente com volume final de 25 µL a 37°C por 16 horas e inativadas a 65°C por 15 minutos. Após o término da digestão enzimática, as amostras foram armazenadas em *freezer* -20°C.

Figura 5 - Esquema do tratamento do DNA



Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.4 Determinação do padrão de metilação

O padrão de metilação (5-meC) e da região promotora dos Elementos LINE-1 foi determinado por reações de qPCR contendo *SYBR Green I Master 2x* (5 µL) 0,5 µM de iniciadores específicos [(F: 3' GTC TTT GGG GAG TGA TGG AA 5') e (R: 3' TAA CAA TGA AGG CGA TGC AG 5')], 1,5 µL (25 ng) de gDNA tratado (nas três condições: H₂O, *MspI* e *HpaII*) e 3 µL de H₂O livre de nuclease. Para obtenção dos valores percentuais referentes à metilação das amostras utilizamos a fórmula [5-meC = ($HpaII^{Ct} - MspI^{Ct}$) / Crt^{Ct} X 100], de acordo com Nestor e colaboradores (2012), com pequenas modificações (NESTOR *et al.*, 2012).

5.4 Análise estatística

A análise de significância estatística, para avaliar as associações dos padrões de metilação dos Elementos LINE-1 com a progressão tumoral, foi realizada no programa GraphPad Prism versão 7.0 (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 $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Desenho dos iniciadores e padronização das condições de ciclagem

A sequência dos iniciadores (representadas em vermelho) foi desenhada em ilha CpG dentro de regiões de hipersensibilidade a DnaseI localizada no cromossomo 5 (chr5:48238441-48238634), flanqueando um fragmento de cinco sítios de reconhecimento enzimático (CCGG) utilizando o programa Primer3 Input (versão 0.4.0). A determinação de estruturas secundárias e as temperaturas de anelamento foram analisadas pelo programa Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/>). Todas as sequências foram alinhadas para confirmação da localização cromossômica e a verificação se o fragmento amplificado correspondia ao gene-alvo no genoma canino foi feita pela ferramenta de PCR *in-silico* (<https://genome.ucsc.edu/>). O tamanho do fragmento amplificado foi de 194 pb (pares de base), o que possibilitou a análise de seis sítios de reconhecimento para as endonucleases *MspI* e *HpaII* (CCGG), representadas em amarelo na Figura 6.

Figura 6 - Representação gráfica do fragmento amplificado

Chromosome 5, ROS_Cfam_1.0 – 48238441-48238634

```
TAGAATCTTCCCGACTCCGCCAGGGGAGGGGAGGAGCCGGCAAAACCGGCTGAGCCCCCTCGCTCCTC
CCTTAGCGCGCTGGTGGTCCGCAGGCTGGGTCCCTTCTGCAGGTGAGGCTGGCCAGGTGCGGGGGGACG
GGCGCCGCGGGGCCCTCGGGCTCTGCACCTGCTTTGTTCCCGACGGGCCGGTGGCAGAGGCCCTTCC
TCAGCCTCCCCTCCCCGAGAGCAGCGGCGTTGGGGCACCCGGCGGCTCAGAAGAGCACGAGACGCTGGA
TGTCAGGGTTGTGAGTTCGAGACTCACGTTGGGTGGGGAGAGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAGGAAGAGAAG
TAAAATAGCAGTGCCAGGAGGAGAAAGTGAGGCCAAGGAAAGGAGGCAATATTTAAGTACGGGCTTTAA
AGAAGGTTGGGGGGGGGGTGCACCTGGGTGGCTCAGCGTTGAGCGTCTACCTTCGGCCCAGGGCGTGA
TCCTGGAGACCCGGGATCGAGCCCCGCTCGGGCTCCCTGCATGGGGCCTGCTTCTCCCTCTGCCTGGGT
CTCTGCCTCTCTCAACTCTCATGAATAAATACAATCTTTAAAAATAAGTAAAAGGGTGGGGGAGGTGAAC
ACTTCTTGGTGTCTTTGGGGAGTGATGGAATGAGGGGAGCGCTTTGGAGCCTGGCGGACCTGGGTGTTA
AGTCTGTCCCCTTTTTCGTGGATGCCAGGCCCTGAACTTAATCCCCAACCCGGTCCTTCGCAGTACTTCCCA
TAAACTGTACAAGTAAGGGAATAGGTTTGAAGGTAGTGACTTTTTCTGCATCGCCTTCATTGTTAGAAAT
GACTGAATTCTTTTTCAAACGGTGAATATATATTTACTGCCAAAGTGTCTTAGGAAATAGACCCCAACTA
```

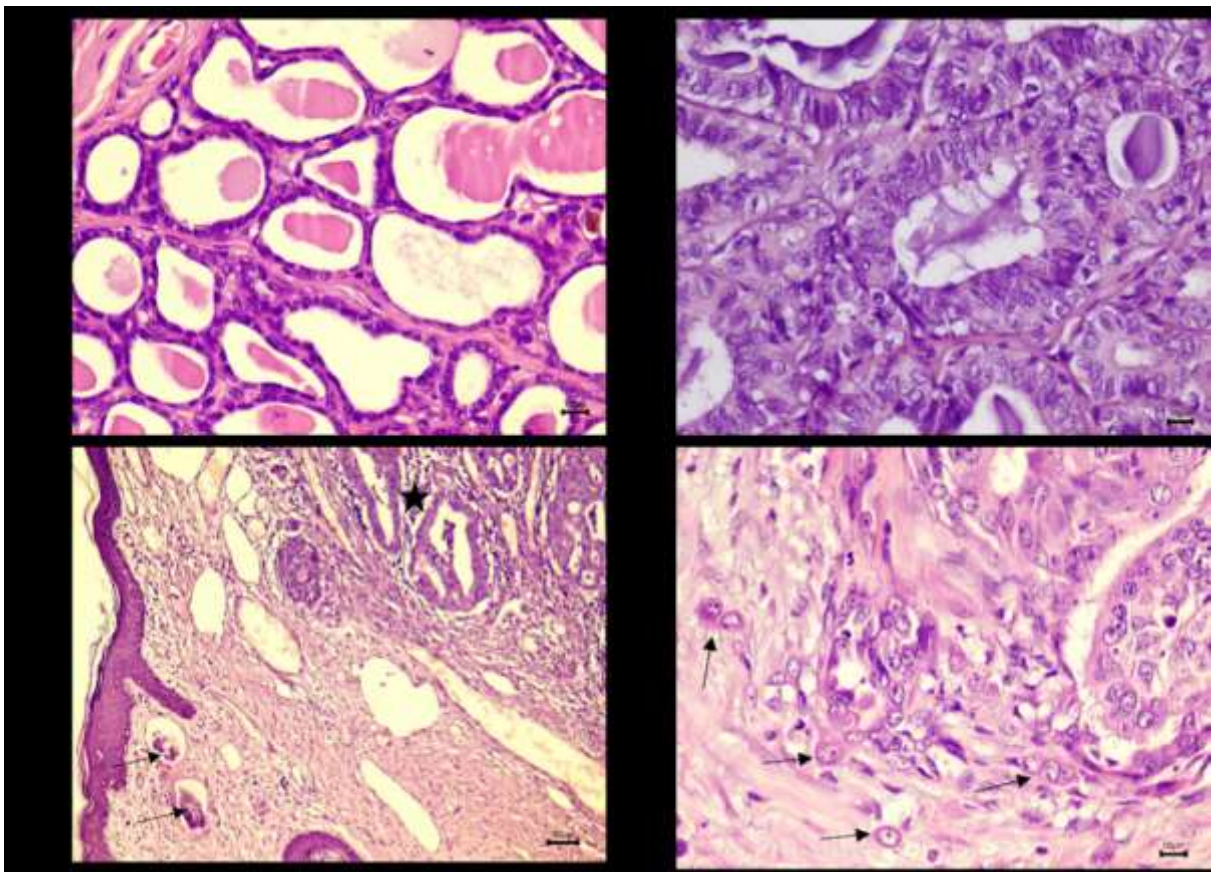
Fonte: Elaborada pela autora.

6.2 Caracterização histopatológica

As amostras histopatológicas mamárias utilizadas, oriundas do Banco de Tumores coordenado pelo Prof. Dr. José Guilherme Xavier, foram reavaliadas e

selecionadas, totalizando 15 amostras: 5 tecidos hígidos, 5 adenomas mamários e 5 carcinomas inflamatórios de mama. As fotomicrografias evidenciam, após coloração por hematoxilina-eosina (HE), detalhes morfológicos relacionados ao tecido mamário íntegro (FIGURA 7a), e as versões neoplásicas, respectivamente, benigna, com incremento na celularidade local associado a pleomorfismo discreto (FIGURA 7b), e maligna, com carcinoma inflamatório assumindo padrão tubular (estrela) e embolização neoplásica em vasos linfáticos – setas – (FIGURA 7c) e invasão de células malignas individualmente em sítios intersticiais adjacentes (FIGURA 7d).

Figura 7 - Classificação Histopatológica do tecido mamário canino



Legenda: Fotomicrografia representativa do tecido mamário normal (a), adenoma tubular mamário (b) e carcinoma inflamatório mamário com destaque para a presença de êmbolos neoplásicos em vasos linfáticos na derme superficial (setas) (c) e organizando túbulos, sendo observadas células neoplásicas invasoras livres na derme (setas) (d).

Fonte: Imagens cedidas pelo Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

6.3 Parâmetros moleculares

Abaixo apresentamos os valores obtidos para a quantificação e a pureza do DNA genômico extraído pelo método de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico das amostras deste estudo (TABELA 2).

Tabela 2 - Determinação da quantidade e da pureza do DNA

AMOSTRAS	[DNA} ng/μL	Razão A260/A280	Razão A260/A230
N1	251,7	1,81	1,61
N2	296,6	2,15	2,17
N3	249,9	1,87	1,48
N4	130,7	2,03	2,16
N5	148,6	1,95	2,06
CA Inf. 1	283,3	1,87	2,15
CA Inf. 2	622,2	1,82	2,15
CA Inf. 3	65,7	1,88	1,90
CA Inf. 4	254,5	1,87	2,09
CA Inf. 5	142,6	1,84	1,94
A. Tubular 1	441,2	1,88	1,95
A. Tubular 2	228,2	1,98	1,75
A. Tubular 3	221,9	1,85	1,78
A. Tubular 4	105,2	1,65	1,27
A. Tubular 5	614,8	1,85	2,07
CM1	511,1	1,81	1,72
CM2	601,1	1,92	2,24
CM3	566,8	2,02	1,07
CM4	748,9	1,85	2,14
CM5	468,3	2,05	2,08
MM4 1	918,5	1,89	1,82
MM4 2	950,5	1,86	1,79
MM4 3	622,2	1,82	2,15
MM4 4	816,2	1,84	2,06
MM4 5	739,7	1,87	2,14

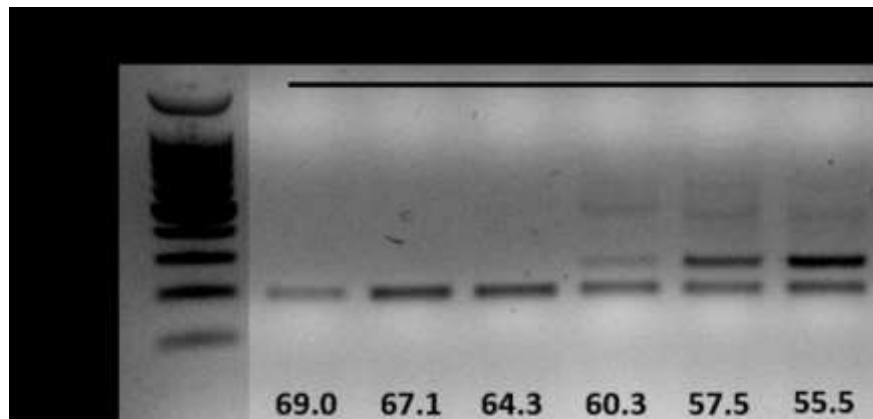
Legenda: N1 a N5: amostras histológicas de tecido hígido mamário canino; CA Inf.1 a CA Inf. 5: amostras histológicas de carcinoma inflamatório canino; A. Tubular 1 a A. Tubular 5: amostras histológicas de adenoma tubular canino; CM1 a CM5: amostras da cultura de células de carcinoma sólido; MM4 1 a MM4 5: amostras da cultura de células de linfonodo metastático.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como etapa seguinte, foi realizado PCR convencional com curva de temperatura (55,5°C – 69,0°C) para determinação da temperatura ideal de anelamento das sequências de iniciadores. Com base nos resultados de eletroforese em gel de agarose apresentados na Figura 8, foi possível observar a existência de

fragmentos inespecíficos nas temperaturas de 55,5°C, 57,5°C e 60,3°C. Por outro lado, nas temperaturas de 64,3°C, 67,1°C e 69,0°C as reações foram específicas, não sendo possível observar a amplificação de fragmentos. Apoiados nesses resultados, optamos por determinar a temperatura de 65,0°C como temperatura padrão para as análises futuras de metilação da região promotora dos Elementos LINE-1.

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose

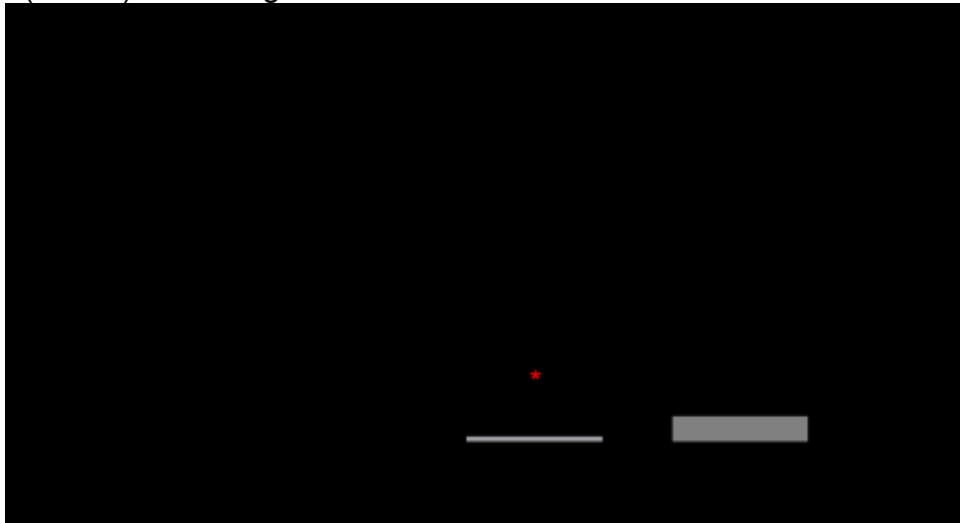


Legenda: Após a amplificação do fragmento de estudo utilizando PCR convencional com curva de temperatura, o material genético amplificado foi resolvido em gel de agarose a 1,5%.

Fonte: Registro feito pela autora.

Após a padronização das condições ideais de ciclagem do conjunto de iniciadores específicos para a região promotora do gene *L1td1* (LINE-1), o estado de metilação da região promotora dos Elementos LINE-1 das linhagens tumorais e das amostras de biópsia foram determinados por qPCR. Os resultados referentes ao padrão de metilação das linhagens tumorais apresentados na Figura 9 mostram que a região promotora dos Elementos LINE-1 de ambas as linhagens de tumor de mama canino são hipometiladas em relação ao tecido de mama normal. Curiosamente, quando avaliamos as porcentagens de metilação apenas entre as linhagens tumorais, foi possível observar que a linhagem isolada do tumor sólido de mama canino, CM1, apresentou menor porcentual de metilação em relação à linhagem metastática, MM4.

Figura 9 - Determinação do estado de metilação da região promotora do gene *L1TD1* (Line-1) em linhagens de tumor canino



Legenda: O estado de metilação da região promotora (5-meC) foi investigado por análise de qPCR com *primers* específicos após prévia digestão enzimática do DNA genômico com as endonucleases *MspI* e *HpaII*. Os níveis relativos de metilação foram determinados por qPCR usando o método do limiar de ciclo (Ct). Os valores de metilação (5-meC) foram obtidos pelo cálculo $Ct^{[HpaII]} - Ct^{[MspI]} / Ct^{[SE]}$. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão de 5 amostras independentes realizadas em duplicata técnica normalizadas em função do controle (100%).

Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação à caracterização do padrão de metilação da região promotora dos Elementos LINE-1 das amostras de tumores de mama canino, foram observados resultados semelhantes aos obtidos para as linhagens tumorais. Tanto as amostras de adenoma tubular quanto as amostras de carcinoma inflamatório possuem menor porcentagem de metilação na região promotora dos Elementos LINE-1 quando comparadas ao percentual observado no tecido normal. Adicionalmente, a comparação entre as porcentagens de metilação apenas dos tumores revelou que as amostras de adenoma tubular apresentaram menor percentual de metilação quando comparadas ao valor percentual dos carcinomas inflamatórios (FIGURA 10).

Figura 10 - Determinação do estado de metilação da região promotora do gene *L1TD1* (Line-1) em tumores de mama canino



Legenda: O estado de metilação da região promotora (5-meC) foi investigado por análise de qPCR com *primers* específicos após prévia digestão enzimática do DNA genômico com as endonucleases *MspI* e *HpaII*. Os níveis relativos de metilação foram determinados por qPCR usando o método do limiar de ciclo (Ct). Os valores de metilação (5-meC) foram obtidos pelo cálculo $Ct^{[HpaII]} - Ct^{[MspI]} / Ct^{[SE]}$. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão de 5 biópsias independentes realizadas em duplicata técnica normalizadas em função do controle (100%).

Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados apresentados na Figura 11 são referentes à comparação gráfica das porcentagens de metilação obtidas nas amostras avaliadas. Nossos resultados mostram que ambas as linhagens tumorais caninas, CM1 e MM4, são hipometiladas em relação às biópsias tumorais e que, corroborando a literatura, tanto as células malignas quanto o tecido tumoral apresentam expressiva hipometilação da região promotora dos Elementos LINE-1 em relação ao padrão observado no tecido mamário hígido.

Figura 11 - Comparação entre o estado de metilação de linhagens tumorais e tumores mamários



Legenda: O estado de metilação da região promotora (5-meC) foi investigado por análise de qPCR com *primers* específicos após prévia digestão enzimática do DNA genômico com as endonucleases *MspI* e *HpaII*. Os níveis relativos de metilação foram determinados por qPCR usando o método do limiar de ciclo (Ct). Os valores de metilação (5-meC) foram obtidos pelo cálculo $Ct^{[HpaII]} - Ct^{[MspI]} / Ct^{[SE]}$. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão de 5 amostras independentes realizadas em duplicata técnica normalizadas em função do controle (100%).

Fonte: Elaborado pela autora.

7 DISCUSSÃO

Mesmo com a expressiva melhora no diagnóstico e no tratamento do câncer em humanos promovida pelo crescente avanço científico obtido nos últimos anos a respeito da biologia tumoral, tais benefícios ainda não foram totalmente disponibilizados aos cuidados veterinários, especialmente no que diz respeito aos tumores de mama caninos (GRAY *et al.*, 2020). O compartilhamento de uma série de características biológicas, relacionadas à ocorrência natural, à idade de acometimento, à heterogeneidade tumoral, às vias de sinalização e classificação histológica tornaram as neoplasias mamárias caninas um modelo biológico em oncologia comparada (RADULY *et al.*, 2018), permitindo que a maioria dos estudos no tema tenham uma dupla significação, para a medicina veterinária e humana (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018). Neste estudo, buscou-se comparar o padrão de metilação de LINE-1 em tecido mamário hígido e em condições neoplásicas, vinculadas a um crescimento localizado (adenoma) ou com potencial de crescimento a distância (carcinoma inflamatório). Esse último, em particular, foi selecionado em razão de seu elevado potencial de disseminação, inerente ao próprio diagnóstico histopatológico do processo, fundamentado na detecção de embolização neoplásica linfática (BENTUBO *et al.*, 2006).

Indo na contramão da maioria dos grupos de pesquisa, o estudo aqui busca aplicar parte dos conhecimentos moleculares já bem estabelecidos no que diz respeito ao estadiamento tumoral do câncer de mama humano em amostras caninas. Assim, optou-se por analisar se existia alguma relação entre os níveis de metilação na região promotora dos elementos repetitivos LINE-1 e a malignidade das neoplasias mamárias caninas. Em humanos, o estado de metilação de LINE-1 de células sanguíneas e tecido mamário neoplásico correlaciona-se de forma inversamente proporcional ao estadiamento e à malignidade tumoral (KANKAVA *et al.*, 2018; MIGLIO *et al.*, 2018). Estudos em oncologia veterinária que avaliem os níveis de metilação na região promotora dos elementos repetitivos LINE-1 ainda são escassos (CHOI *et al.*, 1999; ISHIZAKI *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos corroboram em parte essa informação. Foi demonstrado que a região promotora de LINE-1 estava hipometilada nas amostras obtidas de biópsias de mama de cadelas classificadas como adenoma tubular e como carcinoma inflamatório mamário em comparação com o tecido normal. Sua hipometilação, além

de estar relacionada a eventos de instabilidade genômica por causar a ativação transcricional, terá como consequências a retrotransposição do elemento transponível e a alteração cromossômica (SAITO *et al.*, 2010; BAE *et al.*, 2012; KEMP; LONGWORTH, 2015). Ainda, essas sequências, devido à sua alta frequência no genoma, constituindo cerca de 34% do genoma canino (BÖHNE *et al.*, 2008) LINE-1, podem ser usadas como marcadores substitutos para o estado de metilação global (LUO; LU; XIE, 2014). Em células normais, os locais CpG dentro de LINE-1 são geralmente metilados, mantendo assim a inativação transcricional e a inibição da retrotransposição, como observado em nossos resultados no tecido normal (CHALITCHAGORN *et al.*, 2004).

A idade média das cadelas das nossas amostras, obtidas de biópsia, de adenoma tubular e de carcinoma inflamatório, foi de 9 anos e 10,4 anos, respectivamente, e está em consonância com a literatura, que aponta aumentar o risco de desenvolvimento tumoral com o avanço da idade. Nos estudos de Sorenmo (2009), com 236 cadelas com tumores de mama, cadelas mais velhas foram mais acometidas por neoplasia malignas – sendo 8,5 anos a idade média das cadelas com tumores benignos e 9,5 anos a das cadelas vítimas de neoplasias malignas.

Diante dos fatores relacionados à fisiopatologia do câncer de mama canino, o fato de a idade avançada ser observada na maioria dos casos diagnosticados reforça a importância do envolvimento de um componente etiológico de natureza epigenética. Nesse sentido, em humanos, a hipometilação de retroelementos LINE-1 e Alu de células circulantes do sangue tem sido aceita como um biomarcador epigenético do envelhecimento (ERICHSEN *et al.*, 2018). Uma importante conexão entre o envelhecimento, a manutenção da heterocromatina repressiva e a ativação transcricional dos Elementos LINE-1 foi estabelecida em um modelo de camundongo geneticamente modificado em que o silenciamento da Sirtuína 6 (SIRT6) promoveu o envelhecimento prematuramente acompanhado de eventos de hipometilação da região promotora de LINE-1 (VAN METER *et al.*, 2014). Apesar de 70% dos tumores diagnosticados serem em cadelas não castradas, não devemos ignorar a idade como fator etiológico. Mesmo não podendo extrapolar de forma segura a conexão entre o envelhecimento, a hipometilação e SIRT6, por ainda não ter sido demonstrada nenhuma relação na espécie canina, acreditamos que o processo natural de envelhecimento possa contribuir para os eventos de hipometilação de LINE-1.

Como em humanos, a neoplasia canina é considerada uma doença de etiologia multifatorial associada a fatores genéticos, ambientais e epigenéticos. Sabemos que as neoplasias benignas e malignas se diferenciam clinicamente por apresentarem características distintas de crescimento, grau de diferenciação e potencial metastático (DIAS *et al.*, 2016). Epigeneticamente, em humanos, a perda de metilação das regiões LINE-1 de células cancerosas está diretamente ligada ao aumento da expressão de transcritos quiméricos de L1 que tem sido largamente utilizada como um marcador epigenético de malignidade (CRUICKSHANKS; TUFARELLI, 2009).

Curiosamente para as amostras caninas, essa relação não foi confirmada. A análise comparativa entre o percentual de metilação de LINE-1 apenas entre os tecidos tumorais revelou que o tumor classificado como adenoma tubular apresentou menor percentual de metilação (hipometilação) quando comparado ao valor percentual do tumor classificado como carcinoma inflamatório. Esses resultados se contrapõem à literatura acerca das neoplasias mamárias humanas, uma vez que os adenomas tubulares, caracteristicamente de crescimento localizado e baixa agressividade, se mostraram hipometilados em relação aos carcinomas inflamatórios, tipicamente de condições de crescimento rápido, intensa invasividade e grande potencial de disseminação e péssimo prognóstico. No entanto, caminham no mesmo sentido das observações realizadas por Lee *et al.* (2019).

A fim de confirmar se a inversão observada no padrão de metilação dos Elementos LINE-1 das amostras caninas se mantinham em relação às amostras humanas, em que a metilação de LINE-1 se mostra cada vez mais reduzida em estágios avançados do desenvolvimento e agressividade tumoral (CHOI *et al.*, 2007; VAN HOESEL *et al.*, 2012), o padrão de metilação dos Elementos LINE-1 de amostras obtidas do cultivo de células isoladas do tumor primário (CM1) e de sítio metastático (MM4) foi determinado. Para nossa surpresa, resultados semelhantes foram encontrados e, como nos resultados obtidos para as biópsias tumorais, a linhagem não metastática CM1 apresentou menor percentual de metilação em relação à linhagem mais agressiva com potencial metastático, MM4.

O estabelecimento e a manutenção dos padrões de metilação específicos ao tecido mamário são críticos e desempenham um papel crucial na manutenção da função celular normal e da identidade celular (VEECK; ESTELLER, 2010). A análise conjunta dos resultados aqui apresentados nos permite afirmar que o estado de metilação da região promotora dos Elementos LINE-1 pode ser utilizada como um

biomarcador molecular para diferenciar tecidos tumorais de tecidos normais, entretanto estudos adicionais utilizando o mesmo tipo tumoral com diferente grau de estadiamento são necessários para que, assim, possamos indicar ou não sua utilização como ferramenta molecular na determinação do estadiamento e da agressividade tumoral em amostras caninas.

Contudo não podemos olhar qualquer que seja o biomarcador como apenas um analito ou análise molecular com capacidade de fornecer informações diagnósticas e/ou prognósticas a respeito do quadro patológico em questão. Temos que ter em mente que sua maior utilidade e/ou seu benefício clínico será saber se o mesmo pode ser usado como alvo terapêutico. Nesse sentido, estudos pré-clínicos realizados por Sciamanna e colaboradores (2005) demonstraram que a inibição de LINE-1 por dois inibidores da transcriptase reversa foi capaz de retardar o crescimento do melanoma maligno e de células de carcinoma prostático humano (SCIAMANNA *et al.*, 2005).

8 CONCLUSÕES

O padrão de metilação dos Elementos LINE-1 pode ser utilizado como um biomarcador molecular para diferenciar tecido mamário canino normal de tecido mamário canino neoplásico. Entretanto, para confirmar se há relação entre o grau de metilação dos Elementos LINE-1 e o estadiamento tumoral, mais estudos com amostras caninas são necessários.

REFERÊNCIAS

- ABDELMEGEED, S. M.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease. **Oncology letters**, v. 15, n. 6, p. 8195-8205, jun. 2018.
- ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 15, n. 7, p. 539-553, jul. 1998.
- ALBERTS, B. *et al.* **Analisando células, moléculas e sistemas**. [s.l: s.n.], 2017.
- ALIZADEH, M. *et al.* The potential role of miR-29 in health and cancer diagnosis, prognosis, and therapy. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 11, p. 19280-19297, nov. 2019.
- ATALAY, C. Epigenetics in breast cancer. **Experimental oncology**, v. 35, n. 4, p. 246-249, dez. 2013.
- ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 59, p. 241-257, 2002.
- BAE, J. M. *et al.* ALU and LINE-1 hypomethylations in multistep gastric carcinogenesis and their prognostic implications. **International journal of cancer**, v. 131, n. 6, p. 1323-1331, set. 2012.
- BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 10, p. 726-734, set. 2011.
- BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. Epigenetic Determinants of Cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 8, n. 9, set. 2016.
- BENTUBO, H. D. L. *et al.* Carcinoma inflamatório de mama em cadela - relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, n. 65, p.40-44, 2006.
- BEVERIDGE, W. I.; SOBIN, L. H. International histological classification of tumors of domestic animals. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 50, n. 1-2, p. 1-142, 1974.
- BOGDANOVIC, O.; LISTER, R. DNA methylation and the preservation of cell identity. **Current opinion in genetics & development**, v. 46, p. 9-14, out. 2017.
- BÖHNE, A. *et al.* Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology**, v. 16, n. 1, p. 203-215, 2008.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and

mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, nov. 2018.

BRENET, F. *et al.* DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. **PLoS one**, v. 6, n. 1, p. e14524, jan. 2011.

BRUN, B. *et al.* Treatment of inflammatory breast cancer with combination chemotherapy and mastectomy versus breast conservation. **Cancer**, v. 61, n. 6, p. 1096-1103, mar. 1988.

CANADAS-SOUSA, A. *et al.* Estrogen receptors genotypes and canine mammary neoplasia. **BMC veterinary research**, v. 15, n. 1, p. 325, set. 2019.

CHALITCHAGORN, K. *et al.* Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. **Oncogene**, v. 23, n. 54, p. 8841-8846, nov. 2004.

CHAN, M. M.; TAPIA RICO, G. The “pet effect” in cancer patients: Risks and benefits of human-pet interaction. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 143, p. 56-61, nov. 2019.

CHEN, Z.; ZHANG, Y. Role of Mammalian DNA Methyltransferases in Development. **Annual review of biochemistry**, v. 89, p. 135-158, jun. 2020.

CHOI, Y. *et al.* Molecular structure of canine LINE-1 elements in canine transmissible venereal tumor. **Anim Genet**, v. 30, p. 51-53, 1999.

CHOI, I.-S. *et al.* Hypomethylation of LINE-1 and Alu in well-differentiated neuroendocrine tumors (pancreatic endocrine tumors and carcinoid tumors). **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 20, n. 7, p. 802-810, jul. 2007.

CLEMENTE, M. *et al.* Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. **The Veterinary record**, v. 165, n. 3, p. 78-81, jul. 2009.

CRUICKSHANKS, H. A.; TUFARELLI, C. Isolation of cancer-specific chimeric transcripts induced by hypomethylation of the LINE-1 antisense promoter. **Genomics**, v. 94, n. 6, p. 397-406, dez. 2009.

DALECK, C. R. *et al.* Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 95-100, 1998.

DAO, T. *et al.* Hydroxymethylation as a Novel Environmental Biosensor. **Current environmental health reports**, v. 1, n. 1, p. 1-10, mar. 2014.

DE FARIA LAINETTI, P. *et al.* Establishment and Characterization of Canine Mammary Gland Carcinoma Cell Lines With Vasculogenic Mimicry Ability in vitro and in vivo. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 583-874, 2020.

DE NARDI, A. B. *et al.* Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Arch. Vet. Sci.**, v. 7, p. 15-26, 2002.

DE SÁ, S. S.; REPETTI, C. S. F. Carcinoma inflamatório mamário canino - Revisão de literatura. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 8-14, 2011.

DIAS, M. L. DE M. *et al.* Survival analysis of female dogs with mammary tumors after mastectomy: Epidemiological, clinical and morphological aspects. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 181-186, 2016.

DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. **Seminars in reproductive medicine**, v. 27, n. 5, p. 351–357, set. 2009.

EHRENHOFER-MURRAY, A. E. Cross-Talk between Dnmt2-Dependent tRNA Methylation and Queuosine Modification. **Biomolecules**, v. 7, n. 1, p. 14, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372726/>.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p. 403-410, nov. 1991.

ERICHSEN, L. *et al.* Genome-wide hypomethylation of LINE-1 and Alu retroelements in cell-free DNA of blood is an epigenetic biomarker of human aging. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 6, p. 1220-1226, set. 2018.

ESLAMINEJAD, M. B.; FANI, N.; SHAHHOSEINI, M. Epigenetic regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in culture. **Cell journal**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2013.

FEINBERG, A. P. Cancer epigenetics takes center stage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 2, p. 392-394, jan. 2001.

FERREIRA, H. J.; ESTELLER, M. CpG Islands in Cancer: Heads, Tails, and Sides. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1766, p. 49-80, 2018.

FILGUEIRA, K. D. **Características anatomopatológicas de neoplasias mamárias em cadelas criadas no município de Fortaleza-CE.** 2005. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

GARCÍA, E. *et al.* Epidemiology of tumors in dogs in the capital of the state of Mexico from 2002-2016. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 4, p. 1085-1092, 2019.

GEHRING, M.; BUBB, K. L.; HENIKOFF, S. Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5933, p. 1447-1451, jun. 2009.

GIBNEY, E. R.; NOLAN, C. M. Epigenetics and gene expression. **Heredity** (Edinb), v. 105, n. 1, p.4-13, jul. 2010.

GILBERTSON, S. R. *et al.* Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. **Veterinary pathology**, v. 20, n. 2, p. 127-142, mar. 1983.

GOMES, C. *et al.* Carcinoma inflamatório mamário canino. **Acta Scientiar Veterinariae**, v. 34, n. 2, p. 171-174, 2006.

GRAY, M. *et al.* Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. **Frontiers in oncology**, v. 10, p. 617, 2020.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, jan. 2000.

HARVEY, H. J.; GILBERTSON, S. R. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary clinics of North America**, v. 7, n. 1, p. 213-219, 1977.

HIRKO, K. A. *et al.* A comparison of criteria to identify inflammatory breast cancer cases from medical records and the Surveillance, Epidemiology and End Results data base, 2007-2009. **The breast journal**, v. 20, n. 2, p. 185-191, 2014.

HO, D. H.; BURGGREN, W. W. Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective. **The Journal of experimental biology**, v. 213, n. 1, p. 3-16, jan. 2010.

HOMBACH, S.; KRETZ, M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 937, p. 3-17, 2016.

ISHIZAKI, T. *et al.* Long interspersed nucleotide element-1 hipomethylation in canine malignant mucosal melanoma. **Oncologia Veterinária e Comparada**, v. 18, ed. 4, p. 854-860, 2020.

JIA, D. *et al.* Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. **Nature**, v. 449, n. 7159, p. 248-251, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2712830/> .

JOHNSON, I. T.; BELSHAW, N. J. Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 4, p. 1346-1359, abr. 2008.

KANKAVA, K. *et al.* LINE-1 METHYLATION IN BLOOD AND TISSUES OF PATIENTS WITH BREAST CANCER. **Georgian medical news**, n. 276, p. 107-112, mar. 2018.

KARAYANNOPOULOU, M. *et al.* Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. **Journal of Veterinary Medicine**, n. 48, p. 85-96, 2001.

KASZAK, I. *et al.* Current biomarkers of canine mammary tumors. **Acta veterinaria**

Scandinavica, v. 60, n. 1, p. 66, out. 2018.

KEMP, J. R.; LONGWORTH, M. S. Crossing the LINE Toward Genomic Instability: LINE-1 Retrotransposition in Cancer. **Frontiers in chemistry**, v. 3, p. 68, 2015.

KHALIL, A. M. *et al.* Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 28, p. 11667-11672, jul. 2009.

KITKUMTHORN, N.; MUTIRANGURA, A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. **Clinical epigenetics**, v. 2, n. 2, p. 315-330, ago. 2011.

LANDER, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, fev. 2001.

LAW, J. A.; JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nat. Ver. Genet.**, p.204-220, mar. 2010.

LEE, K. H. *et al.* Methylation of LINE-1 in cell-free DNA serves as a liquid biopsy biomarker for human breast cancers and dog mammary tumors. **Scientific Reports**, v. 9, n. 175, 2019.

LIMA, V. M. de; PECHUTTI, T. **Revista Científica de Medicina Veterinária - Ano XVI**, n. 33, jul. 2019.

LIU, D. *et al.* Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. **Cancer research**, v. 74, n. 18, p. 5045-5056, set. 2014.

LOENARZ, C.; SCHOFIELD, C. J. Oxygenase catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation. **Chemistry & biology**, v. 16, n. 6, p. 580-583, jun. 2009.

LUIZ, C. R. *et al.* Estudo comparativo da irrigação da papila mamária em cães sem raça definida (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 1, p. 20-24, 2004.

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

LUO, Y.; LU, X.; XIE, H. Dynamic Alu methylation during normal development, aging, and tumorigenesis. **BioMed research international**, v. 2014, p. 784-706, 2014.

MAITI, A.; DROHAT, A. C.; Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p.35334-35338, 2011.

MARCONATO, L. *et al.* Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory

carcinoma: 43 cases (2003-2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 8, p. 967-972, out. 2009.

MERCER, T. R.; MATTICK, J. S. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 3, p. 300-307, mar. 2013.

MIGLIO, U. *et al.* The expression of LINE1-MET chimeric transcript identifies a subgroup of aggressive breast cancers. **International journal of cancer**, v. 143, n. 11, p. 2838-2848, dez. 2018.

MISDORP, W. Histologic classification and further characterization of tumors in domestic animals. **Advances in veterinary science and comparative medicine**, v. 20, p. 191-221, 1976.

MISDORP, W. *et al.* Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. **Comparative Oncology**, v. 7, p. 11-29, 1999.

MORRISON, W. B. **Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998, p. 591-598.

MUNSON, L.; MORESCO, A. Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. **Breast disease**, v. 28, p. 7-21, 2007.

NAZÁRIO, A. C. P.; REGO, M. F.; OLIVEIRA, V. M. DE. Nódulos benignos da mama: uma revisão dos diagnósticos diferenciais e conduta. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 4, p. 211-219, 2007.

NESTOR, C. E. *et al.* Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. **Genome research**, v. 22, n. 3, p. 467-477, mar. 2012.

NIETO, A. *et al.* BRCA-1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. **Journal of Comparative Pathology**, 128, p. 260-268, 2003.

NING, B. *et al.* Targeting epigenetic regulations in cancer. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 48, n. 1, p. 97-109, jan. 2016.

NOBLE, D. Evolution beyond neo-Darwinism: a new conceptual framework. **The Journal of experimental biology**, v. 218, n. Pt 1, p. 7-13, jan. 2015.

PEREIRA, C. T. *et al.* Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 32, n. 5, p. 282-290, out. 2003.

PÉREZ-ALENZA, M. D. *et al.* Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 12, v. 3, p.132-139, 1998.

PÉREZ-ALENZA, M. D. *et al.* Factors influencing the incidence and prognosis of

canine mammary tumours. **Journal of Small Animal Practice**, n. 41, p. 287-291, 2000.

PÉREZ-ALENZA, M. D. *et al.* First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. **Breast cancer research: BCR**, v. 6, n. 4, p. R300-7, 2004.

PHOKAEW, C. *et al.* LINE-1 methylation patterns of different loci in normal and cancerous cells. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 17, p. 5704-5712, out. 2008.

PICKARD, M. *et al.* Long non-coding RNA GAS5 regulates apoptosis in prostate cancer cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Diseases**, v. 1832, n.10, p.1613-1623, 2013.

PRIESTER, W. A.; MANTEL, N. Occurrence of tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 47, n. 6, p. 1333-1344, dez. 1971.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico Canine mammary tumours , research on new prognostic factors. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, n. 543, p. 119-127, 2002.

RADULY, L. *et al.* Canis lupus familiaris as relevant animal model for breast cancer - a comparative oncology review. **Animal Science Paper & Reports**, v. 36, n. 2, p.119-148, 2018.

REIS, A. L. *et al.* Immunohistochemical study of the expression of E-cadherin in canine mammary tumours. **Veterinary Record**, 152, p. 621-624, 2003.

SAAD, E. S. A. *et al.* A Comparative Review of Mixed Mammary Tumors in Mammals. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 24, n. 2, p. 125-137, jun. 2019.

SAITO, K. *et al.* Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 16, n. 8, p. 2418-2426, abr. 2010.

SANTOS, T. R. *et al.* Risk factors associated with mammary tumors in female dogs. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 40, n. 6, p. 466-473, 2020.

SAWAN, C. *et al.* Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutation research**, v. 642, n. 1-2, p. 1-13, jul. 2008.

SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer**, v. 26, n. 2, p. 419-426, ago. 1970.

SCIAMANNA, I. *et al.* Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. **Oncogene**, v. 24, n. 24, p. 3923–3931, jun. 2005.

SHOFER, F. S. *et al.* Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. **Breast cancer research and treatment**, v. 13, n. 1, p. 49-60, jan. 1989.

SILVA, D. M. da *et al.* Inflammatory Mammary Carcinoma in a Male Dog-Case Report. **Topics in companion animal medicine**, v. 37, p. 100-357, dez. 2019.

SLEECKX, N. *et al.* Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 46, n. 6, p. 1112-1131, dez. 2011.

SORENMO, K. *et al.* Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary and comparative oncology**, v. 7, n. 3, p. 162-172, aug. 2009.

STRICKFADEN, H. Reflections on the organization and the physical state of chromatin in eukaryotic cells. **Genome**, v. 64, n. 4, p. 311–325, abr. 2021.

TAVASOLY, A. *et al.* Classification and grading of canine malignant mammary tumors. **Veterinary research forum: an international quarterly journal**, v. 4, n. 1, p. 25-30, 2013.

TAYLOR, B. C.; YOUNG, N. L. Combinations of histone post-translational modifications. **The Biochemical journal**, v. 478, n. 3, p. 511-532, fev. 2021.

TORRES-PEREZ, J. V. *et al.* Histone post-translational modifications as potential therapeutic targets for pain management. **Trends in pharmacological sciences**, v. 42, n. 11, p. 897–911, nov. 2021.

TOST, J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 507, p. 3-20, 2009.

TOST, J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. **Molecular biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 71-81, jan. 2010.

TREVILATTO, P. C.; LINE, S. R. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. **The Journal of forensic odonto-stomatology**, v. 18, n. 1, p. 6-9, jun. 2000.

TRIPATHI, V. *et al.* Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. **PLoS genetics**, v. 9, n. 3, mar. 2013.

TSAI, M.-C. *et al.* Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. **Science** (New York, N.Y.), v. 329, n. 5992, p. 689-693, ago. 2010.

TUREK-PLEWA, J.; JAGODZINSKI, P. P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. **Cellular & molecular biology letters**, v. 10, n. 4, p. 631-647, 2005.

UJVARI, B. *et al.* Genetic diversity, inbreeding and cancer. **Proceedings. Biological sciences**, v. 285, n. 1875, mar. 2018.

UYSAL, F.; AKKOYUNLU, G.; OZTURK, S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. **Biochimie**, v. 116, p. 103-113, set. 2015.

VAN HOESEL, A. Q. *et al.* Hypomethylation of LINE-1 in primary tumor has poor prognosis in young breast cancer patients: a retrospective cohort study. **Breast cancer research and treatment**, v. 134, n. 3, p. 1103-1114, ago. 2012.

VAN METER, M. *et al.* SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. **Nature communications**, v. 5, p. 5011, set. 2014.

VEECK, J.; ESTELLER, M. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 15, n. 1, p. 5-17, mar. 2010.

XAVIER, R. G. C.; LIMA, M. O.; JUNIOR, D. F. Neoplasias mamárias em cadelas – Revisão de literatura - Mammary neoplasms in dogs - **Literature review**. v. 10, n. Id, p. 133-149, 2017.

YING, H. *et al.* The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 9, p. 2158-2164, Sep. 2006.

ZEGGAR, H. R. *et al.* Tumor DNA hypomethylation of LINE-1 is associated with low tumor grade of breast cancer in Tunisian patients. **Oncology letters**, v. 20, n. 2, p. 1999-2006, ago. 2020.

ZHENG, Y. *et al.* Prediction of genome-wide DNA methylation in repetitive elements. **Nucleic acids research**, v. 45, n. 15, p. 8697-8711, set. 2017.

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