



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

RAISSA MELO DE SOUSA

CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO E METILAÇÃO DO GENE
P21^{CDKN1A/CIP1} EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

BELÉM (PA)

2018

RAISSA MELO DE SOUSA

CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO E METILAÇÃO DO GENE
P21^{CDKN1A/CIP1} EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, como requisito para obtenção do título de mestre em Neurociências e Biologia Celular.

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

BELÉM (PA)

2018

Dados Internacionais de Catalogação
na Publicação (CIP) Sistema de Bibli-
otecas da Universidade Federal do
Pará

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados
fornecidos pelo(a) autor(a)

- S725c Sousa, Raissa Melo
 Caracterização do padrão de expressão e metilação do gene P21/CDKN1A em
 tumores mamários caninos
 / Raissa Melo
 Sousa. —
 2018 61 f. :
 il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e
 Biologia celular (PPGNBC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Fe-
 deral do Pará, Belém, 2018.
 Orientação: Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges
1. P21 (CDKN1A). 2. Expressão. 3. Metilação. 4. Câncer. 5. Caninos. I. Bor-
 ges, Bárbara do Nascimento,
 orient. II. Título
-

TERMO DE APROVAÇÃO

RAISSA MELO DE SOUSA

CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO E METILAÇÃO DO GENE *P21^{CDKN1A/CIP1}* EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Bárbara do Nascimento Borges - Orientadora
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Pará

Prof. Dr.^a Maria Lúcia Harada
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Carlos Eduardo Matos Carvalho Barros
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Pará

Belém

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Bárbara do Nascimento Borges, pela confiança, atenção, paciência, pelos preciosos ensinamentos repassados e por oferecer condições possíveis para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por todas as contribuições e pela disponibilidade em avaliar a dissertação.

O meu maior agradecimento é para a minha mãe, Maria do Socorro Melo, por todos os ensinamentos ao longo da vida e por acreditar que a educação é a arma mais poderosa que alguém poderia ter.

Ao meu pai, Raimundo Ferreira de Sousa, que se mostra como exemplo de homem de bom caráter, meu muito obrigada pelo apoio estrutural, pelas palavras amigas e duras nos momentos que eu precisei ouvir.

E aos queridos amigos e parentes, por me incentivarem e entenderem, pelos momentos de descontração e pelas palavras amigas.

A Universidade Federal do Pará (UFPA), pelo apoio financeiro e estrutural da pesquisa e por ser uma segunda casa, durante esses dois anos no mestrado. Ao CNPq e CAPES que disponibilizaram os recursos financeiros.

Aos médicos do Hospital Veterinário e patologistas do Laboratório de Patologia Veterinária da UFPA, pelas amostras e dados dos animais.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará (UFPA), por ceder a estrutura física para o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada.

RESUMO

A maioria dos tumores mamários caninos são malignos, fazendo com que o animal venha a óbito. Um dos fatores envolvidos nessa patogênese é a alteração no nível de expressão do gene *P21*, que codifica uma proteína que pode inibir a iniciação e a progressão tumoral. Um evento que pode afetar o nível celular da proteína p21 e o perfil de metilação desse gene, podendo ocasionar um silenciamento gênico ou uma superexpressão dele. Considerando a importância funcional desse gene, este estudo tem o objetivo de avaliar o perfil de metilação e expressão do gene *P21* em tumores mamários de cadelas do estado do Pará, com o intuito de identificar marcadores moleculares de diagnóstico precoce, sobrevida e prognóstico. Para isso, 83 amostras de tecidos tumoral e não tumoral foram coletadas no Hospital Universitário Mário Dias Teixeira, em Belém. O DNA e RNA de cada amostra foram extraídos utilizando kits específicos. Para as análises de metilação, o DNA obtido foi submetido ao processo de modificação, com posterior técnica de *Bisulfite Sequencing PCR*, utilizando iniciadores específicos para região e posterior visualização em gel de agarose 2%. Os resultados do sequenciamento foram analisados no software *BiQ Analyzer* a fim de avaliar o padrão de metilação. Para análise de expressão gênica, foi realizada a quantificação do mRNA do gene-alvo utilizando a técnica de PCR em tempo real, utilizando como controles constitutivos os genes *GAPDH* e *HPRT1*. Com análise estatística feita por meio dos testes Exato de Fisher, *Odds Ratio* e *Mann-Whitney* no programa *GraphPad Prism*, considerando os resultados significativos quando $p \leq 0.05$, com intervalo de confiança 95%. Para avaliação do perfil de metilação, foi realizada a caracterização das ilhas CpGs do gene *P21*, sendo que a ilha 1 está localizada em um íntron e possui 34 sítios CGs, enquanto que a ilha 2 foi identificada no éxon 2, com 22 sítios CGs. Na ilha 1 não foi detectada metilação, enquanto que a ilha 2 estava metilada, contudo o perfil de metilação não foi diferente entre as amostras tumorais, não tumorais e controles, não sendo possível correlacionar os valores de metilação com os dados clínicos e de expressão. Os níveis de expressão das amostras tumorais foram baixos quando comparados com as amostras não tumorais e controle, demonstrando que o papel de p21 nesses tumores pode se apresentar alterado. No entanto, nenhuma correlação estatisticamente significativa foi observada entre a expressão e os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes. Apesar disso, foi observada uma expressão reduzida em animais com sobrevida >1 ano de idade, e uma expressão elevada em animais com sobrevida < 1 ano de idade, sugerindo a influência de p21 como um marcador de prognóstico. Ainda são necessários estudos mais detalhados do gene *P21* para verificar se essas alterações poderão ser utilizadas como marcadores moleculares, e assim colaborar no prognóstico e detecção do câncer na espécie.

Palavras-chaves: *P21*. Metilação. Câncer. Caninos.

ABSTRACT

The most of canine mammary tumors are malignant and associated with the animal death. One of the factors involved in this pathogenesis is the change in the expression level of the gene P21, which in turn encodes a protein that can inhibit tumor initiation and tumor progression. The methylation profile of gene can affect the cellular level of p21 and lead gene silencing or overexpression. Whereas the functional importance of the P21 gene, this study aimed to evaluate the methylation profile and expression in mammary tumors of dogs, in order to identify molecular markers of early diagnosis, survival and prognosis. Therefore, 83 tumor and non-tumor tissue samples were collected from dogs, undergoing surgery at the Veterinary Hospital "Mário Dias Teixeira", in Belém -Pará. the DNA and RNA from each sample were submitted to extraction using a commercial kit. For the methylation analyzes, the obtained DNA was submitted to the modification process, with a subsequent technique of Bisulfite Sequencing PCR, using region-specific primers and subsequent visualization in 2% agarose gel. The sequencing results were analyzed in BiQ Analyzer software in order to evaluate the methylation pattern. For gene expression analysis, the target gene mRNA was quantified using the real-time PCR technique using the GAPDH and HPRT1 genes as constitutive controls. Statistical data was performed using the Fisher Exact, Odds Ratio and Mann-Whitney tests in the GraphPad Prism program, considering the significant results when $p \leq 0.05$, with a 95% confidence inter-val. In order to evaluate the methylation profile, the CpG islands of the P21 gene were characterized. The island 1 is located in an intron with 34 CGs, while an island 2 was identified in the exon, with 22 CGs. Both amplified generating a fragment of ~ 300 bp. At island 1 no methylation was detected, whereas island 2 was methylated, but the island methylation profile was not different between the tumor, non-tumor and control samples. With these results was impossible compare the methylation values with clinical and expression data, suggesting that these regions are not altered. The expression levels of the tumor samples were low when compared to the non-tumor samples and control, with p (0.0001), show that the role of p21 in these tumors may be altered but not statistically significant when correlated with clinical histopathological data of patients. However, a reduced expression in the survival of animals > 1 year of age was observed, and a high expression in animals with survival < 1 year of age, suggesting the influence of p21 as a marker of prognosis. More detailed studies of the P21 gene are still needed to see if these changes could be used as molecular markers, and thus aid on the prognosis and detection of cancer in the species.

Key-words: P21. Methylation. Cancer. Canine.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CONDIÇÃO DO MICROAMBIENTE TUMORAL.	9
FIGURA 2 - CARACTERÍSTICAS DO CÂNCER.	9
FIGURA 3 - PAISAGENS EPIGENÉTICAS.....	13
FIGURA 4 - MECANISMO DE METILAÇÃO.	14
FIGURA 5 - LOCAIS DE METILAÇÃO NO GENOMA.	15
FIGURA 6 - COMPLEXOS EM CADA ETAPA DO CICLO CELULAR.	16
FIGURA 7 - FOSFORILAÇÃO NA G1/S DA RB.	17
FIGURA 8 - ESTRUTURA DO GENE P21.	18
FIGURA 9 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA P21.	19
FIGURA 10 - PLASTICIDADE DE P21.	20
FIGURA 11 - PROTEOLISE MEDIADA POR UBIQUITINAS.	21
FIGURA 12 - ATUAÇÃO DE P21 NO REPARO POR EXCISÃO DE.....	23
FIGURA 13 - ASSOCIAÇÃO ENTRE PARP 1, PCNA E P21.....	23
FIGURA 14 - ATUAÇÃO DO P21 NAS CDKS QUE REGULAM O DSBR.	24
FIGURA 15 - REGULAÇÃO DA P53 SOBRE P21.	25
FIGURA 16 - OUTRAS INTERÇÕES ENTRE P21 E P53.....	26
FIGURA 17 - FUNÇÃO DA P53-P21-DREAM.	27
FIGURA 18 - ATUAÇÃO DA P21 NA QUIESCÊNCIA E SENESCÊNCIA.	29
FIGURA 19 - ATUAÇÃO DE P21 COMO INIBIDORA DA EMT.....	30
FIGURA 20 - DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS TUMORAIS	34
FIGURA 21- DISTRIBUIÇÃO DAS RAÇAS	34
FIGURA 22 - ILHAS CPGS DO GENE P21	35
FIGURA 23 - LOCALIZAÇÃO DAS ILHAS 1 E 2	35
FIGURA 24 - ALINHAMENTO DAS AMOSTRAS DA ILHA 1	36
FIGURA 25 - CONVERSÃO DAS CITOSINAS NÃO METILADAS.....	36
FIGURA 26 - DIAGRAMA COM AS REGIÕES NÃO METILADAS.....	37
FIGURA 27- DIAGRAMA DA ILHA 1 NÃO METILADA DO P21.....	38
FIGURA 28 - CITOSINAS METILADAS.....	39
FIGURA 29 - ALINHAMENTO DAS AMOSTRAS DA ILHA 2	39
FIGURA 30 - DIAGRAMA COM AS REGIÕES METILADAS	39
FIGURA 31 - DIAGRAMA DA ILHA 2 METILADA DO P21	40
FIGURA 32 - ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO.....	41

LISTA DE SIGLAS

5mC - 5 Metil Citosina
ASCs - Células Tronco Adultas
BCL2 - *B Cell Lymphoma 2*
BRCA2 - *Breast Cancer Type 2*
CDKIs - Inibidores de Cdk
CDKN1A - *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*
CDKS - Cinases Dependentes de Ciclina
CpG - Citosina-Fosfato-Guanina
CSCs - Células tronco tumorais
CY1 - Domínio de Ciclização
DNMT - DNA Metil Transferase
DSBR - Reparo de Quebra de Fita Dupla
EMT - Transição Epitélio-Mesenquimal
KID - Domínio Inibitório de Cinase
LH - *Helical Sub-Domain*
MDM2 - *Murine Double Minute*
NER - Reparo por Excisão de Base
NES - Sinal de Exportação Nuclear
NLS - Região do Sinal de Localização Nuclear
PARP 1 - *Poly ADP- Ribose Polymerase 1*
PCNA - Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
RAS - *Kirsten Rat Sarcoma*
RB - Retinoblastoma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1 BIOLOGIA DO CÂNCER.....	8
2.2 TUMOR DE MAMA CANINO	10
2.3 EPIGENÉTICA E METILAÇÃO	13
2.4 CICLO CELULAR.....	15
2.5 ESTRUTURA E FUNÇÕES DA PROTEÍNA EXPRESSA POR <i>P21</i>	18
2.5.1 Degradação de p21	20
2.5.2 Atuações nos checkpoints de G1/S e G2/M.....	21
2.5.3 Atuações no reparo do DNA.....	22
2.5.4 Interações com proteína p53	24
2.5.5 Regulação da Apoptose.....	27
2.5.6 Atuações na senescência e quiescência de células tronco tumorais.....	28
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS	32
4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	32
4.3 MODIFICAÇÃO E PCR DO DNA PARA SEQUENCIAMENTO.....	32
4.4 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO.....	33
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5 RESULTADOS	34
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	34
5.2. PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE <i>P21</i>	35
5.2.1 Caracterização das Ilhas CpGs.....	35
5.2.2 Status de Metilação na Ilha 1	36
5.2.2 Status De Metilação na Ilha 2.....	38
5.3 PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE <i>P21</i>	41
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	48
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

9. ANEXOS..... 60

9.1 ANEXO 1 60

9.2 ANEXO 2 61

1 INTRODUÇÃO

Mais de um milhão de cães são diagnosticados anualmente com câncer (PAOLONI et al., 2008). Os dados epidemiológicos demonstram que o câncer de mama é segundo mais frequente em cadelas (BORGE et al., 2011). As cadelas diagnosticadas com essa doença geralmente apresentam mais de um tumor mamário e cerca de 53,3% dessas neoplasias tem características malignas que levam ao óbito do animal (BRISTON et al., 2008). No Brasil, existem poucos dados epidemiológicos sobre a população canina afetada por câncer de mama, assim como poucos dados sobre as características epigenéticas de cada subtipo tumoral, principalmente em animais sem raça definida (NAGATA et al., 2008).

O início e a progressão desses tumores dependem da regulação de vários genes. O gene *P21*, modula a atuação de genes supressores tumorais e oncogenes na célula (CAZZALINI et al., 2010). A proteína p21, codificada por esse gene, geralmente age como um efetor em diferentes cascatas celulares, com intuito de inibir a proliferação celular, não dependendo exclusivamente da sua ativação pela via clássica com a proteína p53 como se acreditava (RONINSON, 2002). A atuação da p21 pode ser vista, principalmente, nos mecanismos de evasão ao ciclo celular, na regulação da apoptose e no sistema de reparo (COLEMAN, 2003; JUNG et al., 2010). Portanto, os níveis de expressão desse gene podem atuar como marcadores e indicativos de câncer (CAZZALINI et al., 2010). Contudo, pouca coisa se sabe sobre a regulação do gene *P21* no câncer de mama em caninos, visto que recentemente foi explicado o seu papel como oncogene no contexto tumoral (YOSHIMURA et al., 2017).

Por causa dessa ampla atuação do gene *P21*, o objetivo desse trabalho é avaliar o perfil de metilação e expressão do gene *P21* em tumores mamários de cadelas do estado do Pará, com o intuito de identificar marcadores moleculares de diagnóstico precoce e prognóstico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOLOGIA DO CÂNCER

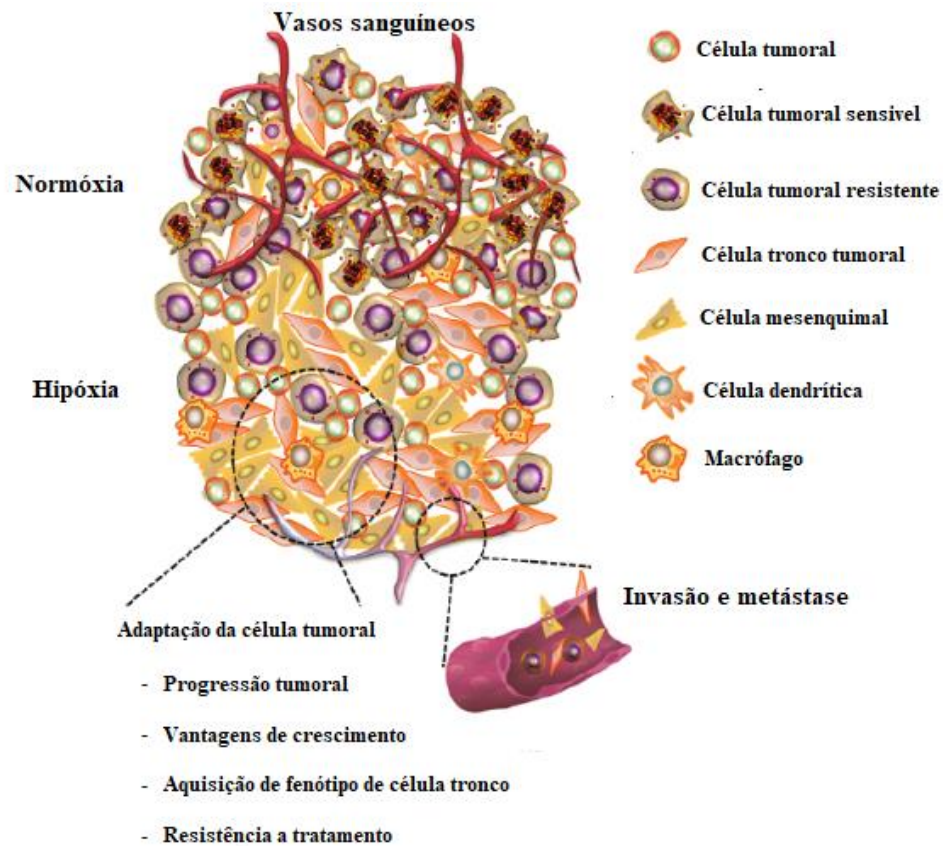
O termo “câncer” refere-se a um conjunto de doenças que compartilham características em comum para promoção de um crescimento celular descontrolado (ALI; SJÖBLOM, 2009; INCA, 2016), sendo um processo dependente de múltiplas etapas que geram uma malignidade celular e posterior metástase em órgãos adjacentes (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer pode acontecer de forma hereditária ou esporádica no organismo, e sua iniciação e progressão depende da atuação dos fatores genéticos e epigenéticos na regulação das funções de proto-oncogenes e genes supressores tumorais (BORGE et al., 2011; FEINBERG et al., 2005). Em grande parte dos cânceres, os produtos de proto-oncogenes estão ativados (oncogenes) para promover a proliferação e a manutenção das células tumorais, enquanto que os genes supressores tumorais se encontram inativados ou com funções reduzidas da capacidade de reparo, inibição do ciclo celular e regulação do ambiente tumoral (HOEIJMAKERS et al., 2001; LEVITT et al., 2001; VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

O tumor não é somente um conjunto de células em proliferação, mas sim um grupo celular heterogêneo e complexo (Figura 1), portanto essas células tumorais podem acumular diferentes alterações genéticas e epigenéticas entre si, devido a influência do microambiente tumoral (CHOUAIB et al., 2014; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Um dos componentes desse conjunto celular são as células tronco tumorais (CSC, *cancer stem cells*), que têm capacidade de auto renovação, iniciação e migração celular, bem como de resistir a terapias antitumorais (MARUSYK; ALMENDRO; POLYAK, 2012). Isso favorece a adaptação do tumor a um ambiente seletivo, gerando um processo de hierarquização com a seleção de uma nova subpopulação tumoral mais especializada e preparada (KRESO; DICK, 2014).

Os principais eventos de promoção dessas células são elucidados no trabalho de Hanahan e Weinberg (2011), no qual são propostas características comuns aos diferentes tumores, entre elas vale destacar: o aumento da taxa de replicação pela continuidade do ciclo celular; os defeitos no sistema de reparo; bem como a capacidade de evasão da morte celular programada, levando ao aumento da taxa de replicação celular (Figura 2).

FIGURA 1 - CONDIÇÃO DO MICROAMBIENTE TUMORAL.



Fonte: Adaptado de Chouaib et al. (2014).

Notas: Adaptação das células do tumor sólido mediante regiões de normóxia, perto dos vasos, e regiões afastadas de vasos com hipóxia, sendo este um ambiente propício à seleção celular, as células tumorais menos adaptadas são sensíveis ao ambiente/ sistema imune/ tratamentos e morrem, já células resistentes a esses processos podem adquirir a capacidade de metástase.

FIGURA 2 - CARACTERÍSTICAS DO CÂNCER.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

2.2 TUMOR DE MAMA CANINO

A população mundial de cães em domicílio é de 360.8 milhões, com a estimativa de 52.2 milhões de animais no Brasil, no qual a região norte ocupa a terceira posição (IBGE, 2013). O câncer é a doença mais comumente associada à causa de morte em caninos no Reino Unido e Estados Unidos, sendo mais frequente em animais adultos e idosos (HOFFMAN et al. (2017; FLEMING; CREEVY; PROMISLOW, 2011). No Brasil essa incidência varia de 7.4% até 13.28% dos casos de óbitos, visto que as doenças infecciosas em países em desenvolvimento ainda são altas (BENTUBO et al., 2007; PORTILHO et al., 2015).

Dentre os principais tipos de câncer que acometem tanto humanos quanto animais, podemos destacar os tumores no cérebro, mama, bexiga, próstata, ósseo, no sangue e pele. Sendo aproximadamente cerca de 1.66 milhões de diagnósticos por ano (500 casos/100.000 população), já em caninos esse valor duplica para cerca de 4.2 milhões de diagnósticos por ano (5.300 casos/ 100.000 população) (SCHIFFMAN; BREEN, 2015). Os tumores mamários tanto em mulheres quanto de cadelas são bem frequentes, sendo que em cadelas ele ocupa a segunda posição (INCA, 2018; RCA-SP; PROSCHOWSKY et al., 2003; EZERSKYTE et al., 2011). A carência em campanhas e divulgação sobre a gravidade dessas neoplasias em cães ainda é pequena, somente 28% da população sabe que cadelas podem desenvolver tumor de mama (MAGALHÃES et al., 2016).

O tecido mamário canino se desenvolve naturalmente durante a puberdade (6-12 meses de idade), sendo caracterizado por um tecido ducto-alvéolo-lobular com um estroma bem vascularizado que se desenvolve bastante durante o período gestacional (GOLDSCHMIDT et al., 2017). A transformação de células normais em células tumorais segundo Ferreira (2010), ocorre devido a lesões no epitélio luminal dos ductos ou dos alvéolos e também em células mioepiteliais, que contribuem para o desenvolvimento de neoplasias benignas e malignas (CASSALI et al., 2011).

A maioria dos tumores mamários são caracterizados como nódulos circunscritos de consistência firme e pouca mobilidade, com tamanho variando de alguns milímetros a vários centímetros e acometem uma ou mais glândulas mamárias, podendo apresentar diferentes tipos histológicos em uma mesma mama. Os tumores malignos têm um padrão de crescimento infiltrativo, sendo capazes de romper estruturas da membrana basal, além de ter uma taxa de crescimento mais acelerada e capacidade de gerar metástases (GOLDSCHMIDT et al., 2017).

Mais da metade das cadelas diagnosticadas apresentam mais de um tumor nas mamas, e cerca de 53,3% dessas neoplasias tem características malignas (BRISTON et al., 2008). Essa doença ocorre principalmente em fêmeas não castradas, com idade superior a seis anos (BORGES et al., 2011), sendo que a maioria dos tumores ocorre entre os 10-12 anos de idade (31,37%), seguidos pelos animais de 12-14 anos (19,44%), tendo uma baixa incidência para aqueles entre 2-4 anos (2,78%) e nenhum caso para menores de dois anos (GUPTA et al., 2012).

No Brasil, a quantidade de diagnóstico de tumor mamário varia de 24.7% do casos até 63.8%, sendo que para a cidade de Belém do Pará somente um trabalho de Priebe et al. (2011) avalia a incidências de neoplasias mamárias (38%) (OLIVEIRA et al., 2010; TORIBIO et al., 2012; TETARDI et al., 2014; POERTILHO et al., 2015; COSTA et al., 2016).

A classificação histológica mais aceita no Brasil para os tumores de mama em caninos é a de Cassali et al. (2011), na qual os tumores estão organizados em dois grandes grupos: os carcinomas e os sarcomas (Tabela 1). Enquanto os sarcomas são neoplasias malignas de origem mesenquimal, os carcinomas são neoplasias malignas de origem epitelial, sendo sub-organizados em: carcinoma in situ, carcinoma complexo, carcinomas simples, tipos especiais de carcinoma e tumores mistos (CASSALI et al., 2011).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PARA TUMORES MAMÁRIOS CANINOS.

Neoplasias Epiteliais e Mesenquimais Malignas		
1 Carcinomas	1.7 Tipos especiais de carcinoma	2 Sarcomas
1.1 Carcinoma in situ	Carcinoma Micropapilar	2.1 Fibrossarcoma
Carcinoma Ductal in situ	Carcinoma Lobular Invasivo	2.2 Osteossarcoma
Carcinoma Lobular in situ	Carcinoma Lobular Pleomórfico	2.3 Carcinossarcoma
1.2 Carcinoma em tumor misto	Carcinoma Secretório	2.4 Sarcoma em tumor misto
1.3 Carcinoma Papilar	Carcinoma Mucinoso	2.5 Outros sarcomas
1.4 Carcinoma Tubular	Carcinoma Rico em Lipídios	Condrossarcoma
1.5 Carcinoma Sólido	Carcinoma de Célula Escamosa	Lipossarcoma
1.6 Neoplasias mioepitelial	Carcinoma de Células Fusiformes	Hemangiossarcoma
Adenomioepitelioma maligno	Carcinoma Anaplásico	
	Neoplasias Mamárias com	
	Sebócitos diferenciados	

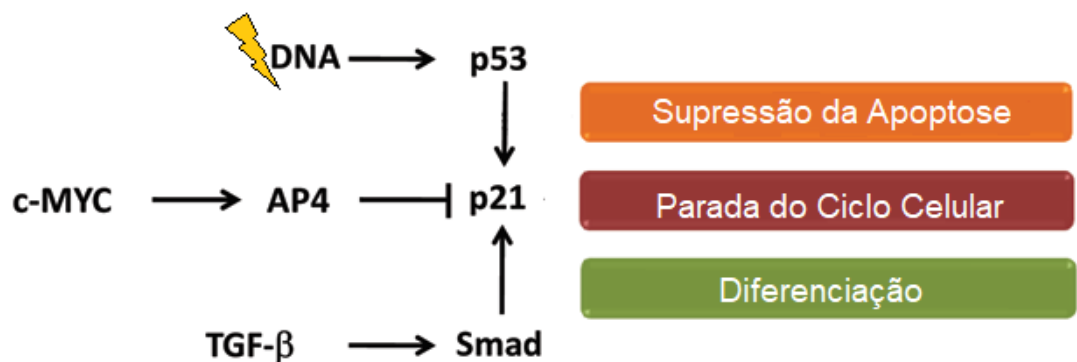
Fonte: Adaptado de Cassali et al. (2011).

O exame histopatológico é o principal mecanismo para o diagnóstico do câncer de mama em caninos, auxiliando também na definição do prognóstico do animal, bem como na escolha do tratamento conjuntamente com o sistema de classificação TNM. Contudo, uma classificação molecular desses tumores pode auxiliar na detecção precoce e na escolha de uma terapia mais eficiente, que pode abranger e associar ainda mais os tratamentos de cirurgia, criocirurgia, quimioterapia, imunoterapia, radioterapia e eletroterapia, bem como a terapia gênica (BORGE et al., 2011; SORENMO et al., 2011).

Existem diversos fatores para o desenvolvimento de tumores mamários em caninos. Segundo Gupta et al. (2012), os cães compartilham um ambiente em comum com humanos, por isso muitas vezes são expostos aos mesmos fatores de risco. Outros fatores estão associados com: o envelhecimento do animal, a predisposição que algumas raças têm sobre outras, a administração de hormônios exógenos, obesidade e alterações genéticas espontâneas ou hereditárias (BORGE et al., 2011). A maioria das neoplasias mamárias são hormônios dependentes (MARNELLI et al., 2004). Portanto, o uso a longo prazo de progesteronas sintéticas pode aumentar a incidência dos tumores, devido ao aumento da hiperplasia celular e da capacidade mitótica (QUEIROGA et al., 2005).

Os principais alvos de estudo para o câncer de mama em caninos são os mecanismos relacionadas com a progressão da massa tumoral, malignidade e metástase, no caso, as responsáveis pela maioria das mortes já registradas (CASSALI et al., 2011). Grande parte das modificações no tecido mamário também ocorrem por alterações em vias envolvendo os genes *TP53-P21*, *TGF β -SMADs-P21* e *c-MYC-AP4-P21* (Figura 3) (PETER JUNG; HEIKO HERMEKING 2009). Portanto, as funções já elucidadas do gene *P21* reforçam sua importância na regulação tumoral em caninos (KIM et al., 2017).

FIGURA 3 - DIFERENTES MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA P21

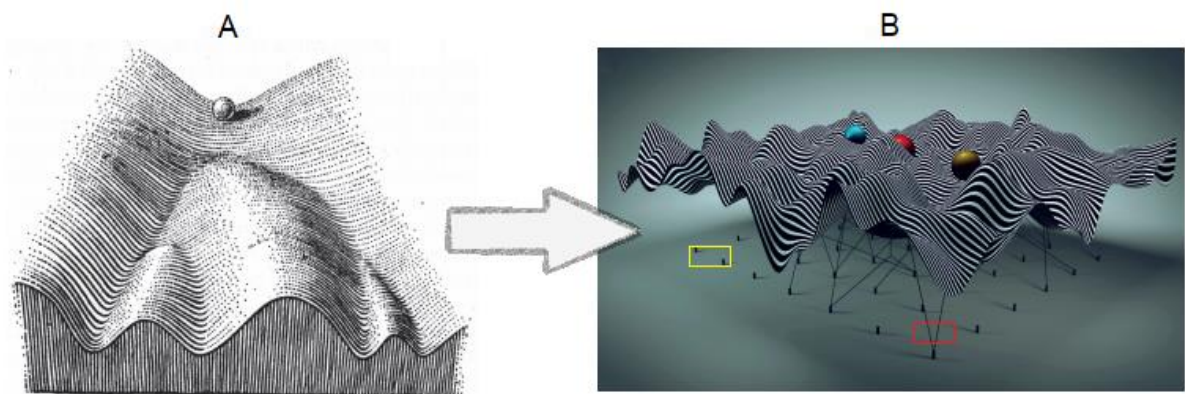


2.3 EPIGENÉTICA E METILAÇÃO

Mutações genéticas favorecem o mecanismo da oncogênese, contudo a regulação dos mecanismos celulares pelo ambiente em que o organismo está inserido, também exerce papel na progressão tumoral, por meio das alterações epigenéticas (BORGE et al., 2011; INCA, 2016).

O termo paisagem epigenética, proposto por C.H Waddington em 1942, demonstrava que as células percorriam caminhos (vales), modificando-se em um tipo célula específico, sendo orientadas pelo nível de expressão de alguns genes (fios), o que explicava, em parte, como a interação causal entre genes e seus produtos eram responsáveis por diferentes fenótipos (Figura 3) (WADDINGTON, 1957; DEICHMANN, 2016). Posteriormente essa definição explicaria como a expressão gênica é alterada sem a modificação direta no genoma e que as características epigenéticas podem ser herdáveis através da mitose e/ou meiose (DUPONT, ARMANT; BRENNER, 2009).

FIGURA 3 - PAISAGENS EPIGENÉTICAS.



Fonte: Adaptado de Stricker, Kofler e Beck (2017).

Notas: A. Primeira concepção de paisagem epigenética, demonstrando que a célula embrionária, representada por um círculo, percorria um caminho responsável por sua diferenciação celular, sendo modulada por genes; B. Posteriormente, com a descoberta de mais modificações epigenéticas, essa paisagem ficou mais ampla e complexa, demonstrando que os genes (retângulo amarelo) são regulados quanto sua expressão (retângulo vermelho), afim de direcionar a células (círculos coloridos sobre a “malha”) em diferentes destinos.

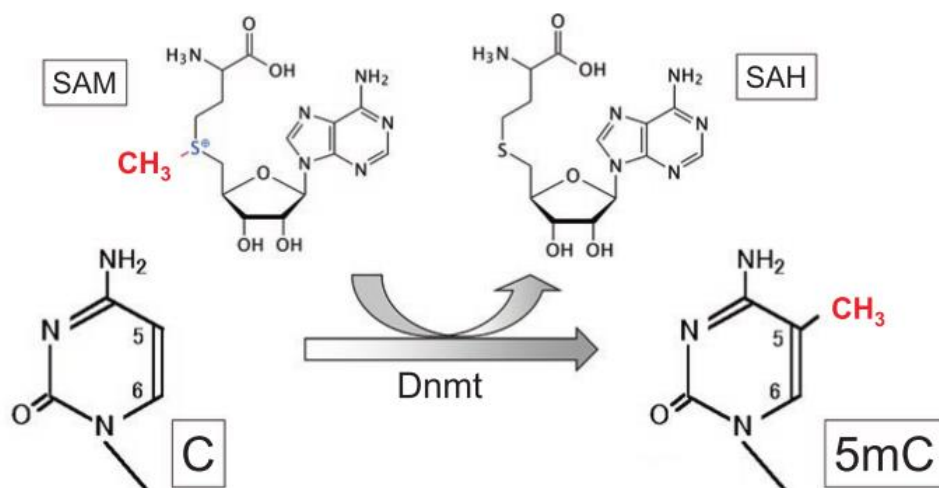
Os fatores epigenéticos exercem um papel importante na plasticidade e dinâmica celular, tendo início antes da formação do embrião e se estendendo por toda vida (STRICKER; KOFERLE; BECK, 2016). Apesar de dividir um material genético idêntico, cada tipo celular e cada célula tem um fenótipo diferente, devido a uma minuciosa regulação epigenética (BISWAS; RAO, 2017). Diversos mecanismos são responsáveis pelo funcionamento da maquinaria epigenética, entre eles temos: a metilação de DNA, as modificações de Histonas e a

atuação de RNAs não codificantes (ncRNA) (TAB et al., 2010). As alterações epigenéticas podem ocorrer desde o desenvolvimento inicial do tumor até sua invasão maligna a tecidos adjacentes. Contudo grande parte das marcações epigenéticas tem potencial de ser reversível, abrindo uma vantagem na utilização terapêutica (BISWAS; RAO, 2017).

O processo epigenético mais estudado é a metilação de resíduos citosinas no DNA. A metil citosina foi primeiramente descrita por Johnson e Coghill (1925), mas somente em 1975 se verificou a correlação entre a sua presença com a modificação da expressão genética. Múltiplas formas de modificação de bases no DNA já foram atualmente descritas: 5-metil-citosina (5mC); 5-hidroxi-metil-citosina (5hmC); 5-formil-citosina (5fC); 5-carboxil-citosina (5caC); 3-metil-citosina (3mC); 6-metil-adenina (6mA) (STRICKER; KOFERLE; BECK, 2017). Muitas dessas modificações são transitórias e intermediárias, podendo ser removidas por glicosilases (STRICKER; KOFERLE; BECK, 2016).

A formação da 5 metil citosina é catalisada por enzimas “escritoras” denominadas DNA metil transferases (DNMT), como a DNMT1 (manutenção), DNMT3a e a DNMT3b (metilação "de novo") (TABY; JEAN-PIERRE, 2010). Essas enzimas promovem a metilação por meio da adição covalente de um grupo metil, doado pela S-metil adenosina (SAM), no carbono -5 do anel de citosina (Figura 4) (LISTER et al., 2009; MENG et al., 2015).

FIGURA 4 - MECANISMO DE METILAÇÃO.

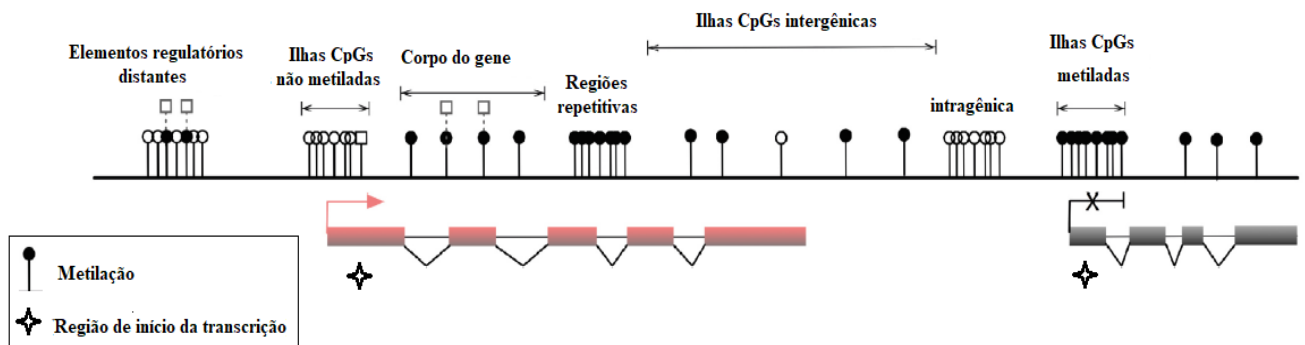


Fonte: Adaptado de Suetake et al. (2017).

Notas: DNA metil transferase (Dnmt) catalisa a doação do grupo metil (CH₃) pela S-adenosilmetionina (SAM), para o carbono 5 da citosina (C), originando uma 5- metil- citosina (5mC), sendo a S- adenosilhomocisteína (SAH) um intermediário da reação.

As metilações ocorrem em regiões de DNA ricas em dinucleotídeos de Citosina-fosfato-Guanina (CpG), em regiões de alta frequência de CpG, denominadas de ilhas CpG, (PORTELA; ESTELLER, 2010). Ilhas com mais de 20% de metilação são consideradas hipermetiladas (BORGES et al., 2010). Contudo, cerca de 60% das regiões promotoras dos genes contém ilhas CpGs não metiladas (PORTELA; ESTELLER, 2010). Essa modificação química da citosina promove o recrutamento de proteínas ligantes da metilação (MBD, de *Methyl- CpG binding Domain*), favorecendo assim o recrutamento de modeladores da cromatina e repressão da transcrição. Em contraste, CpGs não metiladas podem favorecer a expressão gênica. A metilação do DNA não é exclusiva das ilhas localizadas no promotor, também ocorrem em regiões de baixa densidade de CpG, como as CpG *shores*, localizadas a ~2Kb de distância da ilha CpGs, no corpo do gene, em regiões repetitivas e intergênicas não repetitivas (Figura 5) (KACEM; FEIL, 2009; PORTELA; ESTELLER, 2010).

FIGURA 5 - LOCAIS DE METILAÇÃO NO GENOMA.



Fonte: Adaptado de Meng et al. (2015).

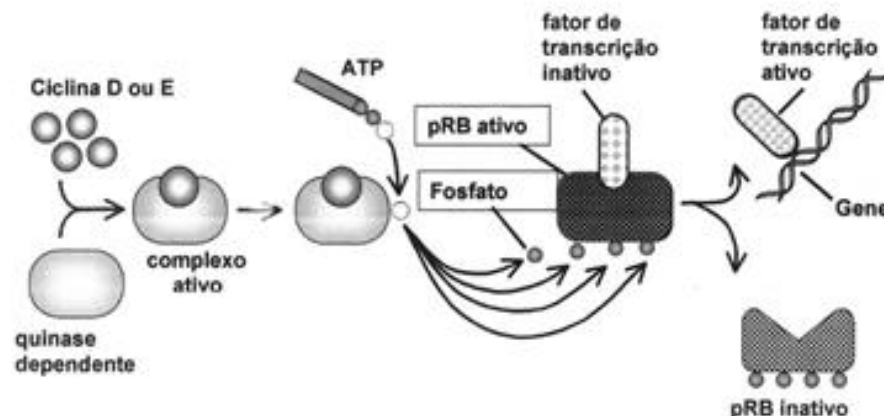
Notas: CpG metilado é representado pela bola preenchida, e CpG não metilado é representado pela bola não preenchida. Grande parte das metilações nas regiões promotoras (estrela) são responsáveis pela inibição da transcrição de genes. Contudo essas metilações também podem ocorrer em *enhancers*, no corpo do gene (intragênica: éxons e íntrons), em elementos de repetição e entre genes (intergênica).

2.4 CICLO CELULAR

Diversos mecanismos de sinalização celular são essenciais para a passagem ordenada da célula pelos quatro estágios do ciclo celular: G1 (crescimento da célula), S (síntese), G2 (crescimento e preparação para mitose), e M (mitose e meiose), enquanto que no estado quiescente não ocorre divisão celular, sendo representado por G0 (NORBURY; NURSE 1992).

Durante o ciclo, a célula necessita passar por pontos de checagem, dentre eles um na transição de G1/S (verificação de erros e síntese de enzimas necessárias para a duplicação do DNA) e outro em G2/M (síntese de proteínas e segregação cromossômica). Essas etapas do

FIGURA 7 - FOSFORILAÇÃO NA G1/S DA RB.



Fonte: Ward et al. (2002).

Legenda: Mecanismo de fosforilação dos complexos Cdks/Ciclina é responsável por dar continuidade no ciclo celular, devido a ativação de enzimas, como fatores de transcrição, que permitem a produção de substratos necessários para célula durante G1/S e G2/M.

Já a Cdk2/Ciclina A é incumbida da progressão do ciclo para fase de síntese, enquanto que a entrada na mitose é ativada por Cdk1/ciclina B, um complexo é responsável por fosforilar a proteína APC (*Adenomatous poliposis coli*), gerando a degradação da enzima inibitória separase, permitindo assim a atuação na separação das cromátides irmãs na anáfase (DOMINGUEZ-BRAUER et al., 2015; SHERR; BARTEK, 2017.) Outras cinases também contribuem para entrada na mitose como a PLK1 (*Pololike kinase 1*) e a Aurora A (conhecida também por *serine/threonine-protein kinase 6*) (DOMINGO-SANANES et al., 2011).

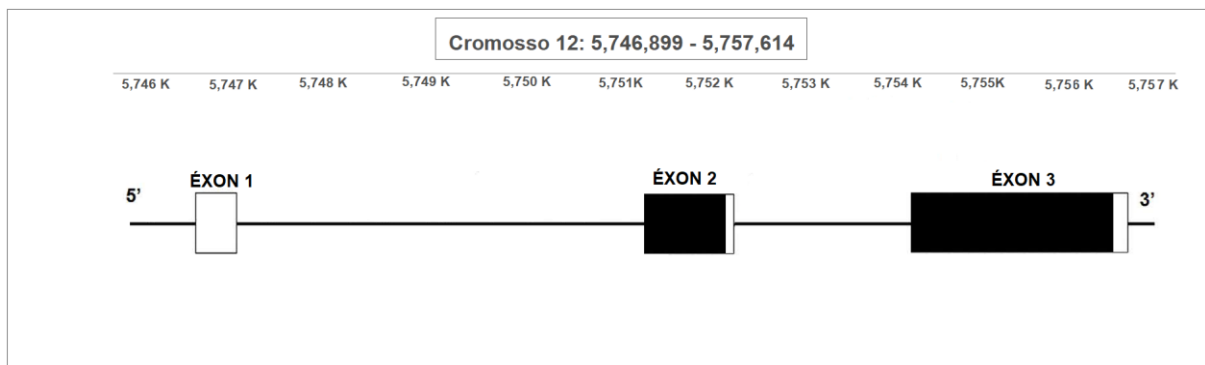
As Cdks podem ser reguladas por fosforilação, proteólise, fatores de transcrição e por inibidores específicos de Cdks (CDKIs). Esses inibidores podem ser agrupados na família Cip/Kip (*Cdk interacting protein-1/ knotted interacting protein 1*) ou na família INK4 (kinase inhibitor). As cinases Cdk4 e Cdk6 são inibidas por proteínas dos locus INK4b-ARF-INK4a, como a $p16^{\text{INK4A}}$, $p15^{\text{INK4B}}$, $p14^{\text{ARF}}$, $p18^{\text{INK4c}}$ e $p19^{\text{INK4d}}$. A atividade de Cdk2 é inibida por proteínas Cip/Kip, como a p27 e p21, sendo a p21 um alvo canônico de p53 em resposta a sinalização oncogênica e dano ao DNA (SHERR; BARTEK, 2017.).

A p21 é uma inibidora central da Cdk2, mas também pode atuar em outras cinases como na Cdk1, Cdk4 e Cdk6 (HARPER et al., 1995). O papel de cada uma dessas cinases no ciclo celular é importante, contudo a Cdk2 não é tão essencial para a continuidade do ciclo celular como a proteína Cdk1 (BESSON et al., 2008; MARTIN et al., 2005).

2.5 ESTRUTURA E FUNÇÕES DA PROTEÍNA EXPRESSA POR P21

O gene *P21/CDKN1* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*) está localizado na região do cromossomo 12p em caninos, sendo composto por três éxons (Figura 8). Esse gene codifica um polipeptídeo de 164 aminoácidos, com peso molecular de 20 kDa (CAZZALINI et al., 2010). A proteína p21 foi descoberta em 1993 por El-Deiry, sendo caracterizada como uma inibidora de cinases dependente de ciclinas, (CDKI, *Cyclin-dependent kinases inhibitor*), por sua atuação inibindo as cinases: Cdk2, Cdk3, Cdk4 e Cdk6, levando a uma parada do ciclo celular em G1 e G2/M (CAZZALINI et al., 2010; GARDEL; TYNER, 1999). Devido a essa interação, foi denominada primeiramente de Cip1 (*Cdk interacting protein-1*) e após os estudos de sua ativação por meio do gene *TP53* foi renomeada para Waf1 (*wild-type p53 activated fator*) (ABBAS; DUTTA, 2009).

FIGURA 8 - ESTRUTURA DO GENE P21.

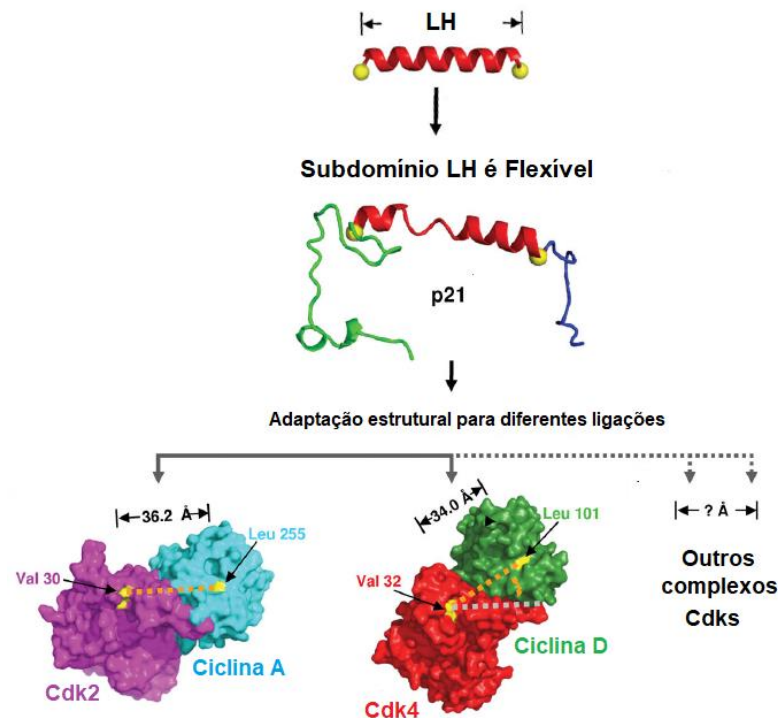


Fonte: Adaptado de Yang et al. (2004) e Zhang et al. (2009).

A p21 geralmente age como um efetor em diferentes vias de genes supressores tumorais, com intuito de inibir a proliferação celular, não dependendo exclusivamente da ativação da via clássica com a p53, como se acreditava (RONINSON, 2002). Além disso, a função de p21 é distinta conforme sua localização celular, podendo exercer um papel duplo, inibindo ou ativando a proliferação celular, portanto sua expressão também depende da região e do contexto celular (ABBAS; DUTTA, 2009).

Essa proteína pode atuar como um regulador negativo do ciclo celular por meio de sua estrutura carboxi-terminal (C-terminal) que compete com polimerases e proteínas responsáveis pela replicação, para se ligar à proteína PCNA, assim como a região amino-terminal (N-terminal) da p21 que tem o domínio de ciclização (Cy1) bem conservado, além de um outro domínio Cy2 de ligação mais fraca na região C-terminal da p21 (Figura 9) (CHEN et al., 1995, 1996; DUTTO et al., 2015). A ligação da p21 em diferentes complexos de Cdks requer uma adaptação

FIGURA 10 - PLASTICIDADE DE P21.



Fonte: Adaptado de Wang et al. (2011).

Notas: Região flexível da proteína p21, localizada no domínio inibitório KID, que pode se ajustar conforme a proteína ligante, com tamanho de 36 angstrom para o complexo Cdk2/Ciclina A.

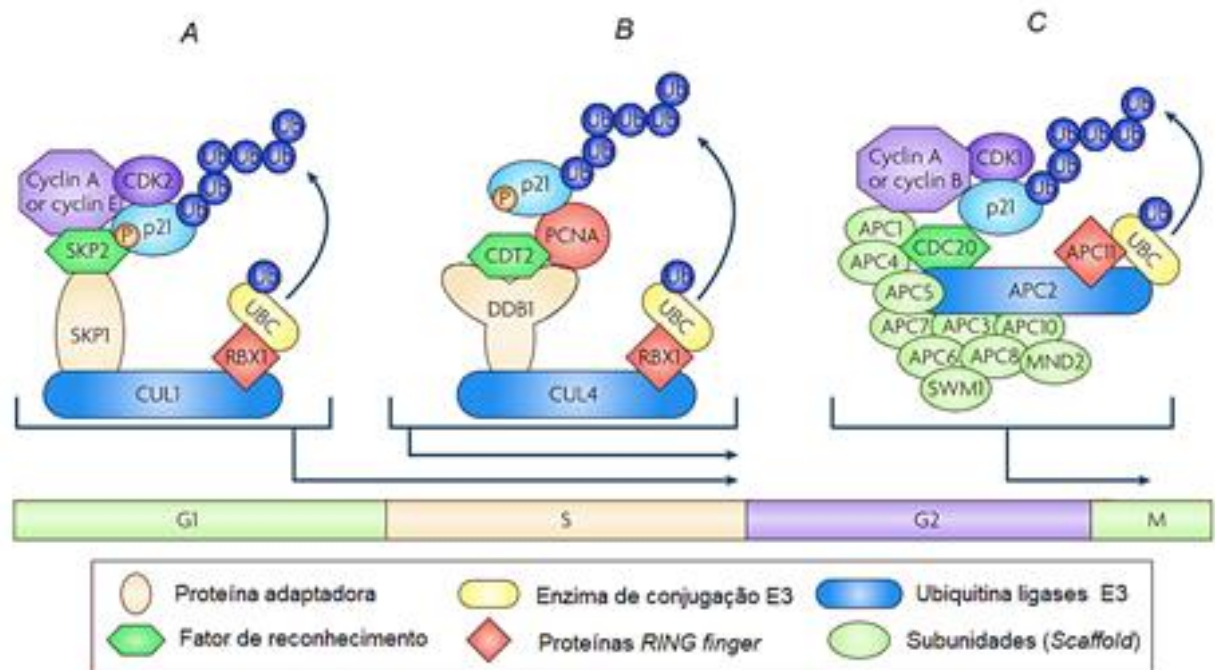
2.5.1 Degradação de p21

Nas células em divisão, a proteína p21 é instável e tem um curto período de meia vida, entre 20-60 minutos (ABBAS; DUTTA, 2009). Assim, para evitar sua degradação, a proteína Ras (*Kirsten rat sarcoma viral*) promove a transcrição de ciclina D1, que se liga a região Cy2, impedindo a interação do proteossomo nesse local (COLEMAN, 2003; JUNG et al., 2010; YOSHIMURA et al., 2017).

A degradação de p21 pode ocorrer de forma dependente da ubiquitina cinase, pela atuação de três complexos ubiquinas ligases: SCF (SKP1-CUL1-SKP2), CR14 (CUL4B-DDB1-CDT2) e APC/C, esse mecanismo de degradação ocorre somente quando p21 está ligada a Cdk2 (ciclina A/E), Cdk1 (ciclina A/B) e PCNA. O complexo SCF (Skp1- Cullin- Skp2) é responsável pela degradação de p21 na fase G1/S, enquanto que o CDT2 é um fator de reconhecimento da Cul4 (CRL4^{cdt2}, *Cullin - Ring ligase*), que atua com a ubiquitina ligase E3 (dependente de PCNA) na degradação de p21 somente durante a síntese. Na fase G2/M o complexo promotor de anáfase (APC) adiciona ubiquitina a ciclinas e p21 (Figura 11) (ABBAS; DUTTA, 2009; BARR et al., 2017; WARFEL; EL-DEIRY, 2013). Quando a p21 não está associada a

esses elementos, a degradação ocorre independente da atuação de ubiquitinas devido á interação direta da região C-terminal da p21 com o proteossomo (BISWAS et al., 2017b; JIN et al., 2003).

FIGURA 11 - PROTEOLISE MEDIADA POR UBIQUITINAS.



Fonte: Adaptado de Abbas e Dutta (2009).

2.5.2 Atuações nos checkpoints de G1/S e G2/M

A p21 inibe a atividade das ciclinas que atuam no *checkpoint* da fase G1 do ciclo celular. No início de G1, a proteína Rb é fosforilada pelo complexo Cdk4,6/Ciclina D e posteriormente por Cdk2/Ciclina E, fazendo com que Rb seja inativada e libere o fator de transcrição E2F (*E2 factor*). Logo, o ciclo celular tem continuidade com a transcrição de enzimas para síntese de DNA na fase S, contudo, a atividade da Cdk2 é normalmente inibida pela p21, portanto o fator E2F não é liberado (Figura 7) (CAZZALINI et al., 2010; JU et al., 2006; SATYANARAYANA et al., 2008).

A p21 influencia o *checkpoint* na fase G1/S por meio da forte interação com a proteína PCNA, necessária para replicação celular, pois atua como cofator das polimerases delta e épsilon (Pol δ , Pol ϵ). A p21 interage com o domínio “DNA polimerase” da PCNA, levando a uma inibição da replicação do material genético (LEE et al., 2009).

Apesar da baixa afinidade da p21 com o complexo Cdk1/ciclina B, essa proteína também regula a entrada da célula na mitose, de duas maneiras: por meio da inativação direta do

complexo Cdk1/Ciclina B ou pela inativação dos mecanismos de fosforilação de cinases ativadoras de Cdk (CAK) (TAYLOR; STARK, 2001).

2.5.3 Atuações na síntese e reparo do DNA

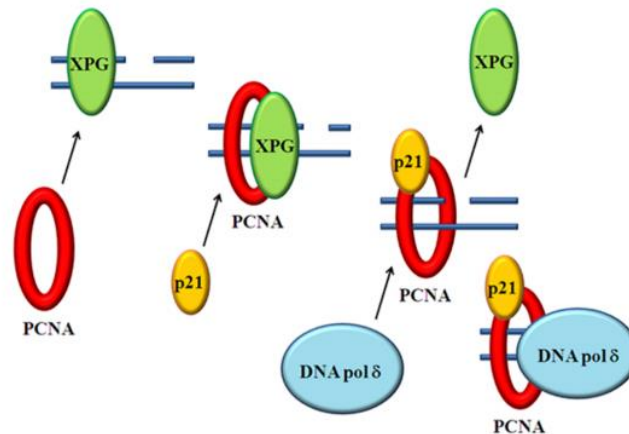
A proteína p21 também atua no reparo do DNA durante um dano celular, devido a sua interação com a PCNA, uma proteína trimérica com formato de anel. Assim, quando um dano é detectado no material genético, a PCNA é recrutada para o núcleo e após níveis desejáveis dessa proteína na região, a p21 é translocada para mesma região para atuar em diferentes mecanismos de reparo e na regulação de PCNA (CHEN et al., 1996 a; CAZZALINI et al., 2009). Para evitar consequências deletérias no reparo após replicação, as células recrutam polimerases específicas como a polimerase POLH (Poln) e PCNA para corrigir ou alterar a fita molde pelo processo denominado síntese translesão (*Translesion DNA synthesis-TLS*). A atuação de polimerases mais específicas dependem da interação e ligação com PCNA, para isso a proteína p21 deve ser ubiquitinada para degradação (SORIA; GOTTIFREDI, 2010).

Durante o reparo por excisão de base (NER), PCNA é recrutada para núcleo e direcionada para região onde a endonuclease XPG (xeroderma pigmentoso grupo G) atua. A XPG é responsável pela incisão do DNA e remoção dos nucleotídeos, enquanto a proteína p300 atua na sua acetilação. Esse processo facilita a liberação da proteína XPG com a proteína PCNA na fita de DNA, liberando espaço para atuação da polimerase delta (δ) na síntese de nucleotídeos. Contudo, a proteína p300 exerce essa função somente na sua forma ativa, ou seja, quando não ligada a PCNA. Portanto, para promover a dissociação dessas proteínas, a p21 é requisitada, que compete pelo sítio de ligação da PCNA com a p300, eliminando o efeito inibitório de PCNA em p300 e dando continuidade no reparo com atuação da polimerase delta (Figura 12) (CHEN et al., 1996 b; THILLHON et al., 2013; KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016).

Em algumas linhagens celulares, hormônio-dependentes, os receptores de estrógenos são responsáveis por ativar PCNA e inibir P21/P53, favorecendo a síntese de DNA e proliferação celular (LIAO et al., 2014). Porém, durante os mecanismos de reparo, a P21 não inibe a PCNA no interdomínio *loop* conector de oito aminoácidos. Portanto, quando a célula faz o reparo por excisão de base (BER), esse domínio torna-se alvo da proteína Parp 1 (*Poly ADP-ribose polymerase 1*), responsável pela ribosilação de ADP (Adenosina difosfato) e reguladora das topoisomerases, logo essa ligação entre Parp 1 e PCNA afeta a atividade da polimerase na síntese de DNA. Outra importante função de Parp-1 é o sequestro de p21, pela ligação da proteína no domínio PARP C-terminal de p21, resultando na liberação do PCNA para iniciar o

BER (Figura 13) (CAZZALINE et al., 2014; PROSPER; DUTTO et al., 2016; SCOVASSI, 2006).

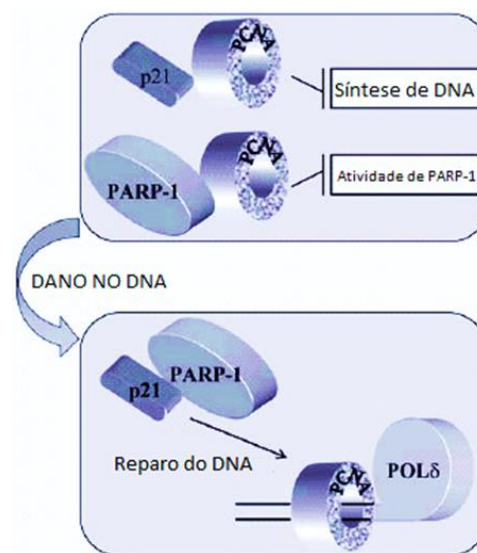
FIGURA 12 - ATUAÇÃO DE P21 NO REPARO POR EXCISÃO DE BASE



Fonte: Adaptado de Thillhon et al., 2013.

Notas: PCNA libera o XPG, mediante atuação de p21, para facilitar a atuação da polímerase delta.

FIGURA 13 - ASSOCIAÇÃO ENTRE PARP 1, PCNA E P21.



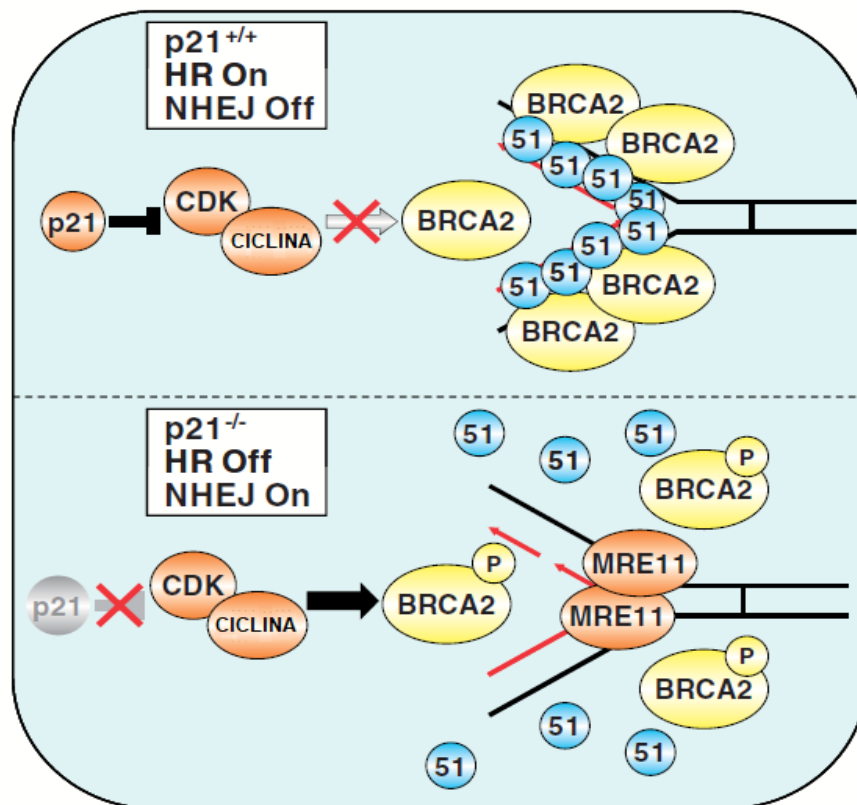
Fonte: Adaptado de Prosperi e Scovassi (2006).

Notas: A proteína p21 em uma célula normal inibe PCNA e após o sequestro de p21 por PARP1, durante o dano no DNA, a proteína PCNA consegue interagir com a polimerase.

Por outro lado, durante o reparo de quebra de fita dupla (DSBR), a proteína p21 atua na inibição da atividade de CDKS1, uma cinase encarregada da fosforilação de Brca2 (*breast*

cancer type 2) na serina 3291 (S3291), quando a p21 está deficiente ou inativa, esse fosfato impossibilita a ligação com a recombinase Rad51, levando a uma desestabilização da Rad51 no núcleo. Esse processo impede o DSBR por recombinação homóloga (HR), então a célula passa a atuar por uma recombinação não homóloga (NHEJ), o que aumenta o possível número de erros na sequência de nucleotídeos, levando a uma instabilidade genômica (Figura 14) (MAURO et al 2012; SHIBATA; JEGGO, 2014).

FIGURA 14 - ATUAÇÃO DO P21 NAS CDKS QUE REGULAM O DSBR.



Fonte: Adaptado de Mauro et al. (2012).

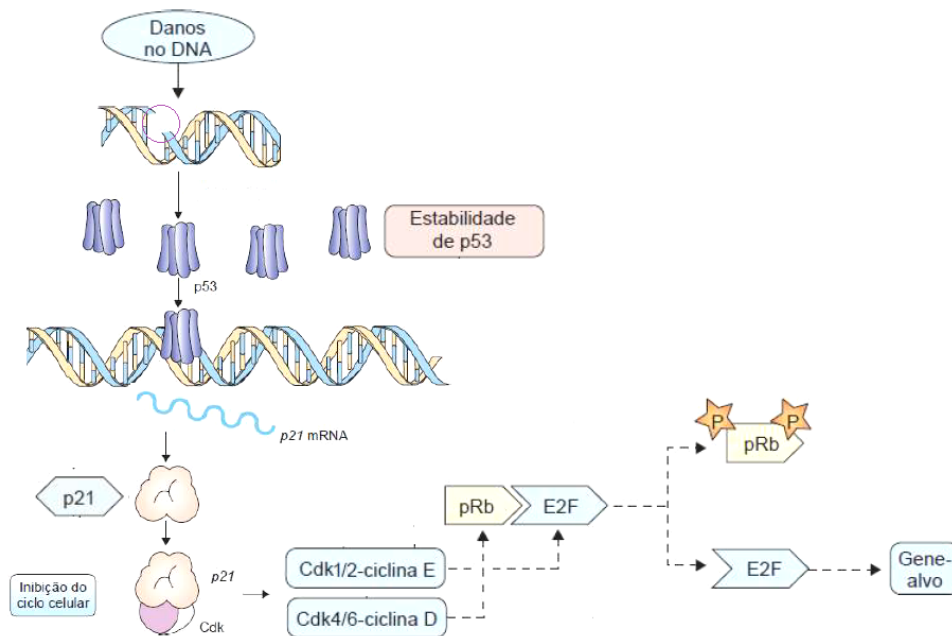
Notas: Ativação de p21 permite a recombinação homóloga durante o reparo da quebra de fita dupla, por inibir a fosforilação da Brca2, favorecendo a estabilização de Rad 51, enquanto que a inativação de 21 permite essa fosforilação e ativação do mecanismo de recombinação não homóloga.

2.5.4 Interações com proteína p53

Uma das funções mais estabelecidas de p21 são como efetoras *downstream* da proteína p53, em resposta a sinais de estresse intracelulares e extracelulares, como o dano no DNA por radiação ionizante (SHEEH et al., 1997). O acúmulo de p53 selvagem (inativo) ocorre principalmente pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). A p53 passa então, para sua forma ativada por meio de fosforilações por cinases. Contudo a adição de grupos fosfatos dificultam o trabalho da proteína Mdm2 (Murine double minute) em degradar a p53, facilitando o

acúmulo de p53 como fator de transcrição na região promotora do gene *P21* (Figura 15) (DALECK; DE NADIR, 2009; KIM et al., 2014).

FIGURA 15 - REGULAÇÃO DA P53 SOBRE P21.



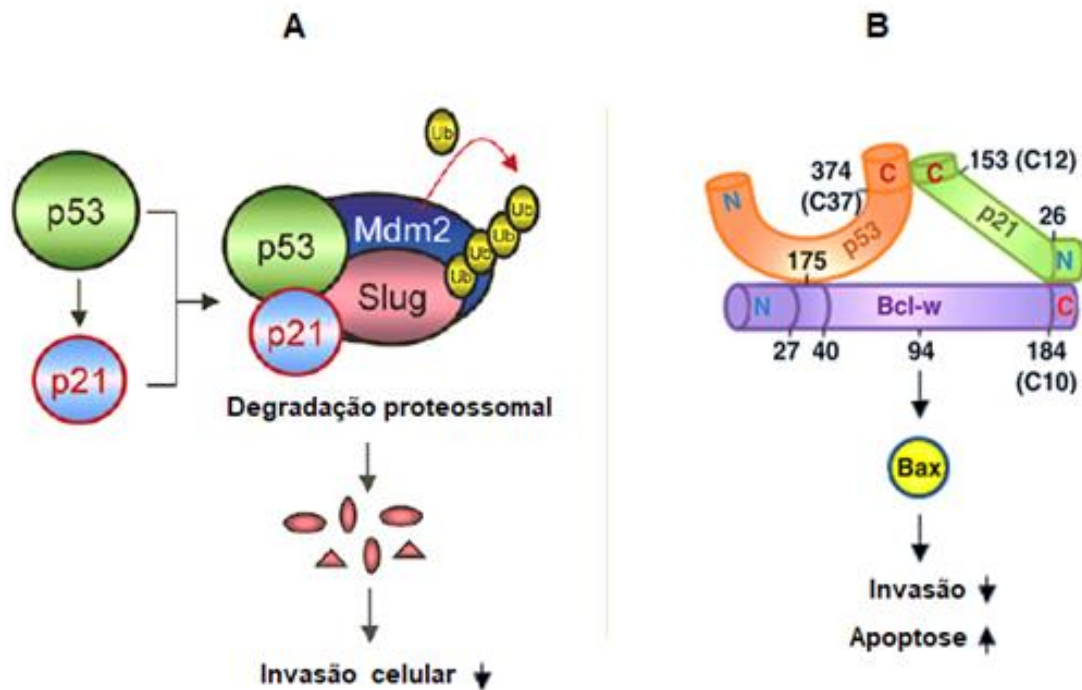
Fonte Adaptado de Daleck e De Nadir (2009).

Notas: p53 é um fator de transcrição para o gene *P21*. Este gene atua na inibição de Cdks/ciclinas que fosforilam pRb, impedindo a atuação de fatores de transcrição, portanto a p53 indiretamente atua na expressão de genes, por meio da p21, bem como a p21 depende do estímulo de p53.

A proteína p21 também coopera com p53 para suprimir a proliferação e invasão celular, pois p21-p53-Mdm2 formam um complexo com a proteína Slug/Snail (*Snail family transcriptional repressor*), um fator de transcrição de genes relacionados com o aumento do potencial metastático. Tal complexo permite a ubiquitinação e degradação de Slug, portanto pode favorecer o controle da invasão tumoral (Figura 16 A) (ENGELAND, 2017; KIM et al., 2014). A cooperação com p53 também ocorre durante a estimulação da apoptose, pois p53-p21 interagem com o fator antiapoptótico Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), encarregado pela homeostasia mitocondrial. A ligação com Bcl2 ocorre de forma dependente das regiões N/C-terminais, levando a formação de um complexo p53/p21/ Bcl-w que induz a liberação do fator Bax (*Bcl-2-associated X*), por ocupar seus domínios de interação, e assim favorecer a morte celular programada (Figura 16 B) (KIM et al., 2017).

A ativação de p53 e aumento de p21 proporciona a inibição de cinases que fosforilam Rb e consequentemente modulam a ativação de genes efetores na progressão tumoral, porém o mecanismo de fosforilação de Rb não era suficiente para explicar como acontecia a regulação do ciclo celular no final da fase S e G2/M, bem como a promoção da quiescência.

FIGURA 16 - OUTRAS INTERÇÕES ENTRE P21 E P53.



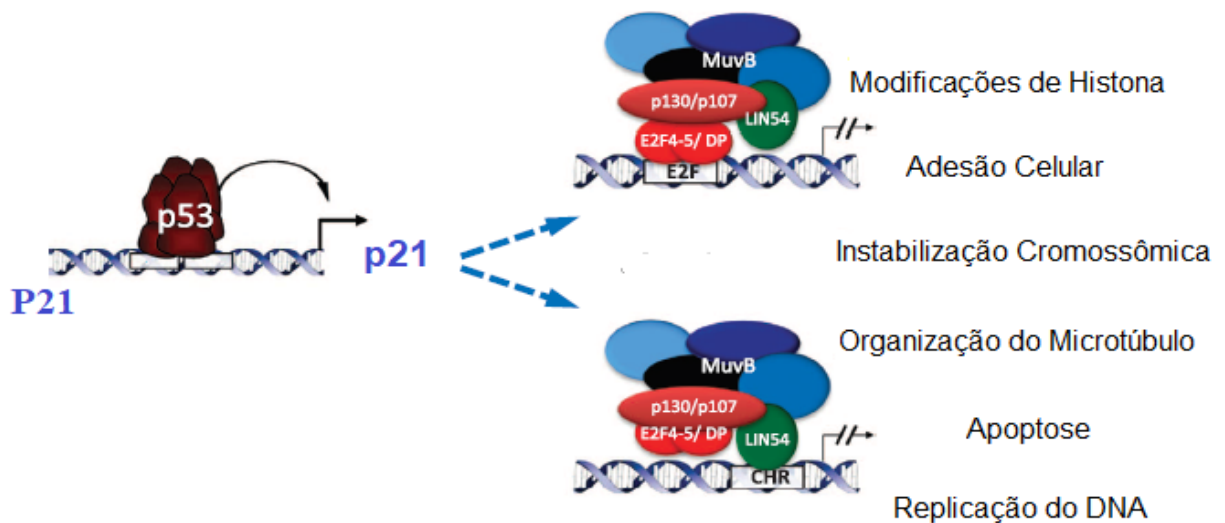
Fonte: Adaptado de Kim et al. (2014 e 2017).

Notas: A. Interação entre p21 e p53 para degradação da proteína Slug; B. Bcl é bloqueada fisicamente pela associação da p21 e p53, exercendo uma função proapoptótica na célula.

Posteriormente, foi descoberto que proteínas codificadas pelos genes *RBL1* (*P107*) e *RBL2* (*P130*) atuam como subunidades de um complexo regulatório denominado DREAM composto por: parceiros de dimerização (DP), homólogos de Rb (Rb-like), E2F e Muv B (Multivul cass B). Esse complexo se liga a sequências conservadas específicas localizadas nos promotores de genes, conhecidas como regiões de ligação E2F e CHR (região homóloga de genes do ciclo celular), CDE (elementos dependentes do ciclo celular) e CLE (Elementos tipo CHR) (FISCHER et al., 2016; SADASIVAM; DECAPRIO, 2013). Essas proteínas regulam cerca de 210 genes, e alguns desses genes são repressores do ciclo celular como: *CDK1*, *CKS1B* (Subunidade 1 regulatória de cinases dependentes de ciclinas), *PLK* (*Polo Like Kinase*), *MYBL* (Proto oncogene MYB tipo 2) e *AURKB* (Aurora cinase B).

O complexo DREAM atua conforme a interação proteica de seus componentes nas diferentes fases do ciclo celular (ENGELAND, 2017). A via p53-p21-DREAM- *E2F/CHR* requer a regulação positiva de p21, que pode hipofosforilar a p107 e p130, a pouca fosforilação (< 17S para p017 e < 22S para p130) permite a união de p107 e p130 ao complexo inibitório DREAM, para atuar em importantes domínios E2F e CHR de diferentes genes (Figura 17) (ENGELAND, 2017; LENG et al., 2002).

FIGURA 17 - FUNÇÃO DA P53-P21-DREAM.



Fonte: Adaptado de Engeland et al. (2017).

Notas: A fosforilação de p130/p107 é capaz de conduzir essas proteínas para formação do complexo DREAM, contribuindo para regulação de diferentes genes e funções.

2.5.5 Regulação da Apoptose

A p21 regula as proteínas responsáveis pelo balanço entre sobrevivência e morte celular e a localização dessa proteína na célula é o que determina em parte a sua função, pois a presença de p21 no núcleo favorece a apoptose, enquanto que no citoplasma atua com funções anti-apoptóticas (CAZZALINI et al., 2010). A maioria das funções pro-apoptóticas da p21 dependem da colaboração com p53, através da relação com a proteína Bax e Bcl, como explicado na seção anterior (KIM et al., 2017).

Logo, a proteína p21 pode exercer uma função anti-apoptótica, em resposta a um dano no DNA, pela capacidade da sua região N- terminal (33 aminoácidos) se ligar fisicamente com precursores de proteases e cinases, como: procaspase3, caspase8, caspase10, ASK 1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) e SAPK (Proteína cinase ativada por estresse), impedindo a transformação dessas proteínas para forma ativa, deixando-as incapazes de promover a apoptose

(ABBAS; DUTTA, 2009; KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016). Outra característica importante para guiar a atuação da p21 é a capacidade da procaspase 3 em clivar a p21, levando a uma perda de 52 aminoácidos na região p21 C-terminal, incluindo o sinal de localização nuclear da mesma, gerando um fragmento final de 15kDa que permanece no citoplasma, pois não consegue ser redirecionado para núcleo (JIN et al., 2000; WARFEL; EL-DEIRY, 2013).

No citoplasma, a p21 se liga na cinase ASK1, um substrato requerido na cascata de MAP cinase, que inibe sua forma ativa. As principais funções afetadas nessa cascata são das proteínas SAPK e p38, gerando uma desregulação nas vias que essas duas proteínas atuam, que incluem: Bcl2, Bax e p53, levando a ineficiência dos mecanismos de apoptose (JUNG et al., 2010). Outros mecanismos mais simples de inibição da apoptose envolvem o bloqueio de Cdks por p21, especificadamente as Cdks2 que ativam a caspases 3 responsáveis pelas modificações necessárias à uma célula com morte celular programada, como as modificações na condensação cromossômica, no encolhimento celular e na perda da adesão entre células, bem como podem ativar as caspases que interagem com a mitocôndria para produção de ROS (JANICKE et al., 2007; MASGRAS et al., 2012).

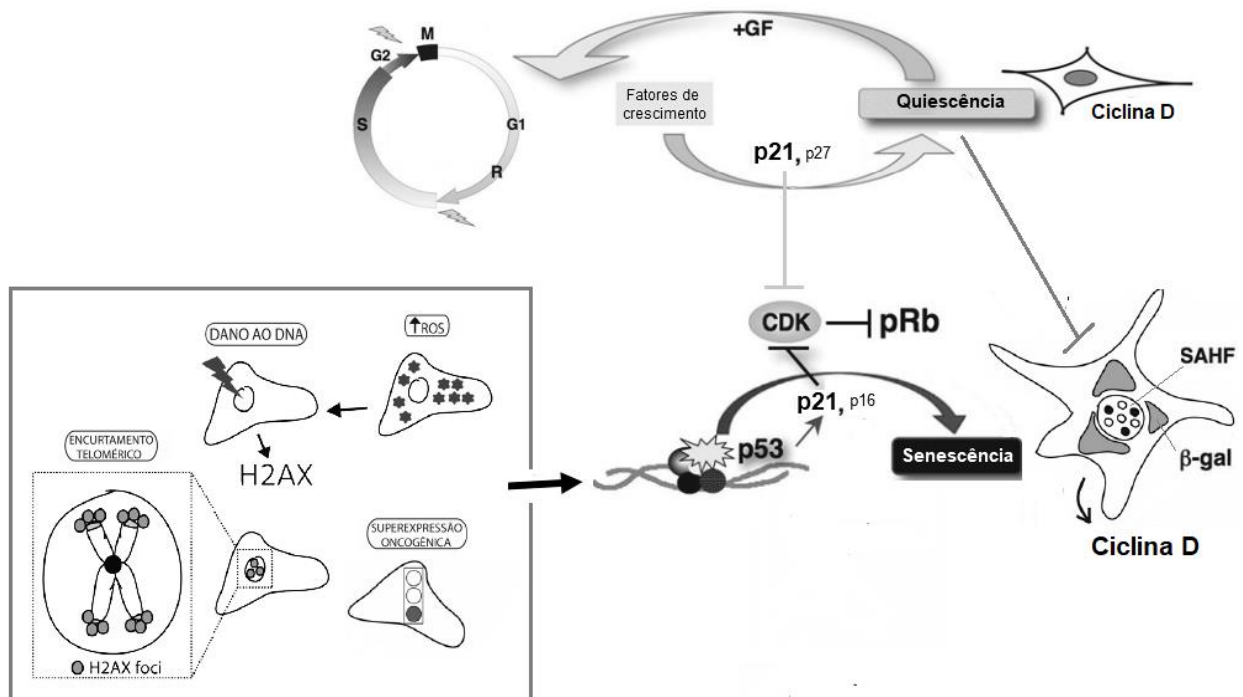
2.5.6 Atuações na senescência e quiescência de células tronco tumorais.

A senescência é caracterizada pela parada permanente do ciclo celular, sendo um processo irreversível. Contudo, uma forma de regulação desse estado ocorre pela via p53-p21, que naturalmente induz a senescência em células saudáveis, mas que também pode atuar em células tumorais (FANG et al., 1999; JUNG et al., 2010). A superexpressão de p21 também facilita a entrada da célula em um estado quiescente, justamente pela inibição de Cdks no ciclo celular, sendo que esse estado é reversível e, dependendo da ativação, a célula poderá entrar ou continuar no ciclo celular (SPENCER et al., 2013).

O acúmulo de p21 leva a indução da senescência prematura, principalmente nos casos em que a célula passa por um grande estresse, atuando como um marcador da ativação das vias senescentes em conjunto com a proteína p16 (Figura 18) (VÁVROVÁ; REZÁCOVÁ, 2011). Uma quantidade citoplasmática elevada de p21 é observada durante a formação ROS, ocasionando danos ao DNA que culminam com a ativação da via p53-p21 (PASSOS et al., 2010).

O ganho de função e a desregulação do controle proliferativo podem favorecer a transformação de células tronco adultas (ASCs), do epitélio mamário, em células tronco tumorais (CSCs) (MANI et al., 2008; WARFEL; EL-DEIREY et al., 2013).

FIGURA 18 - ATUAÇÃO DA P21 NA QUIESCÊNCIA E SENESCÊNCIA.



Fonte: Adaptado de Dulic (2013) e Vigna (2017)

Notas: Comparação dos principais mecanismos indutores de quiescência e senescência, mostrando que ambos necessitam da atuação da Rb, por meio da expressão de p53-p21 ou p16. Essas células têm características como: altos níveis de ciclina D, B- galactosidase e uma cromatina diferenciada do tipo SAHF (Foci Nucleares Associados à Heterocromatina).

Os primeiros mecanismos de inibição da proliferação de células tronco pela proteína p21, foram relatados em células hematopoiéticas e nos casos de leucemias, nos quais a p21 atuava na manutenção do estado quiescente de células tronco, por inibir o ciclo celular (LIU et al., 2009).

A maioria dos fatores de transcrição que controlam as células tronco embrionárias (ESCs) e ASCs, também são ativados nos tumores (CHEN et al., 2017). Segundo Liu et al. (2009), o aumento da expressão dos fatores de Yamanaka: Sox2 (*SRY-related high mobility*) e Klf4 (*kruppelike fator 4*), foram detectados em dois tipos de modelos tumorais, Ras- p21^{-/-} e c-myc- p21^{-/-}, demonstrando que a perda de p21 pode induzir a uma transição epitélio-mesênquimal (EMT). As células tronco tumorais do epitélio mamário ganham propriedades durante a EMT, devido a perda da adesão celular, favorecendo a capacidade de invasão e metástase (MANI et al., 2008).

A atuação de p21 na regulação da EMT das células tronco envolve a participação de c-Myc (*myelocytomatosis protein*), que juntamente com Max (*Myc associated factor X*), são

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de metilação e expressão do gene *P21* em tumores mamários de cadelas do estado do Pará.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Caracterizar o perfil de metilação e de expressão do gene *P21* nas amostras avaliadas;
- Correlacionar os perfis de metilação e expressão observados com os dados histopatológicos, de perfil clínico, raça e idade;
- Correlacionar o perfil de metilação com o nível de expressão;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRA) sob número 001/2013, e as amostras coletadas com o consentimento dos tutores dos animais

Foram coletadas, de animais submetidos a procedimento cirúrgico no hospital veterinário Professor Mário Dias Teixeira da UFRA (HOVET), 83 amostras (tecido tumoral e tecido não tumoral) de 40 animais para análise de expressão, enquanto para análise de metilação foram avaliadas apenas 50 amostras de 24 animais. Os tecidos neoplásicos e não neoplásicos foram obtidos por técnicas operatórias sem originar riscos adicionais e nem aumento no tempo do exame e operação do animal. O diagnóstico histopatológico, foi realizado pelo patologista do HOVET seguindo a classificação de Cassali et al. (2011). Também foram coletadas duas amostras de tecido mamário sem neoplasia e anormalidades de duas cadelas saudáveis, servindo como controle para o presente estudo, visto que é muito difícil obter tecido de animais ainda vivos, pois o tutor reluta em um procedimento cirúrgico adicional na região mamária, devido a apresentação estética. Parte das amostras coletadas foram armazenadas em microtubos contendo solução de RNA Later® (*Ambion Inc.*), para uma ideal conservação e qualidade das células para extração dos ácidos nucléicos.

4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

O kit comercial AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) foi utilizado para etapa de extração do DNA total, conforme as recomendações do fabricante. A integridade do DNA foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 2%, com o corante *GelRed*™ (UNISCIENCE), com posterior exposição a luz ultravioleta. A análise em Espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) permitiu a quantificação de cada amostra.

4.3 MODIFICAÇÃO E PCR DO DNA PARA SEQUENCIAMENTO

O DNA foi submetido ao kit EZ DNA *Methylation Lightning*, conforme as recomendações do fabricante (Zymo Research). Os iniciadores específicos para o gene *P21*, foram desenhados no software *Methyl Primer Express* v. 1.0 (Thermo Fisher Scientific). O protocolo para cada PCR é: 1 µl DNA; 2,5 µl de solução tampão 10X; 1 µl de MgCl₂ (1,5 mM); 4 µl de dNTPs (10 mM); 0,5 µl de cada primer (10 mM) e 0,3 µl de Taq DNA polimerase. A água ultrapura foi utilizada para completar um volume final de 25 µl. Com identificação de duas ilhas CpGs, a ilha 1 localizada no íntron e ilha 2 localizada no éxon do gene *P21*. O resultado dessa amplificação foi avaliado em

gel de agarose 2%, corado com GelRed™. As amostras foram purificadas com o kit Spin Column PCR *Product Purification* (Bio Basic, Ludwig Biotec), conforme as recomendações do fabricante.

Para reação de sequenciamento foi utilizado o kit *BigDye Terminator* (Thermo Fisher Scientific). O DNA foi sequenciado pelo método Sanger no sequenciador automático *ABI 310* (Thermo Fisher Scientific). A análise do perfil de metilação ocorreu no software *BiQ Analyzer* (BOCK et al., 2005).

4.4 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO

O RNA total das amostras foi obtido utilizando AllPrep DNA/RNA Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante, com posterior quantificação do RNA total em espectrofotômetro. A conversão a cDNA foi realizada com o auxílio do kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific) *TaqMan*. A fluorescência foi captada pelo sistema *StepOne-Plus™ Real-Time PCR* (Thermo Fisher Scientific).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

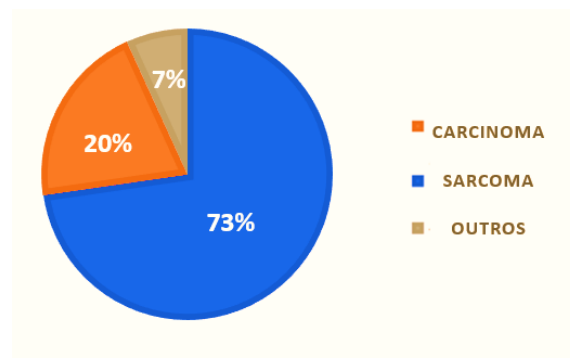
Os resultados das análises de metilação foram comparados com os de expressão, bem como com os dados histopatológicos dos pacientes, utilizando os testes Exato de Fisher, *Odds Ratio* e Mann-Whitney no programa GraphPad Prism 7 (www.graphpad.com), com resultados considerados significativos quando $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

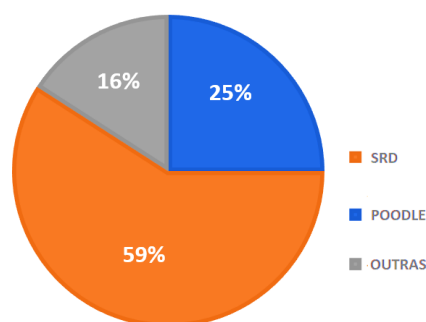
Foram analisadas 83 amostras de tecido mamário obtidas de 40 cadelas, sendo 44 amostras tumorais e 39 amostras não tumorais, além de 2 animais como controles saudáveis sem histórico de neoplasia mamária. O tipo histopatológico mais frequente foi o sarcoma, representando 72,7% (32/44) dos casos, seguido por carcinomas com 20% (9/44) e tumores mistos com 6,8% (3/44). Na população atendida, foram detectados os graus I, II e III do carcinosarcoma, além de diferentes tipos tumorais na cadeia mamária de um mesmo animal (Figura 20).

FIGURA 20 - DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS TUMORAIS



Em relação a faixa etária dos animais, foi observado que quase todos, exceto por um animal, são idosos (>6 a) com idades variando entre 7 - 16 anos, com média geral de 10.92 anos de idade, ou 10 anos e 11 meses. A maioria dessas cadelas são SRDs 59% (26/44), enquanto que 41% (18/44) são animais de raça definida (puros), com a prevalência de poodles 25% (11/18) (Figura 21).

FIGURA 21- DISTRIBUIÇÃO DAS RAÇAS



Muitos desses animais não apresentam os dados clínicos completos sobre o uso de hormônios exógenos (anticoncepcionais), histórico de pseudociese e gestação, bem como da cirurgia Ovário Salpingo Histerectomia (OSH). A maioria dos animais só recebeu o tratamento

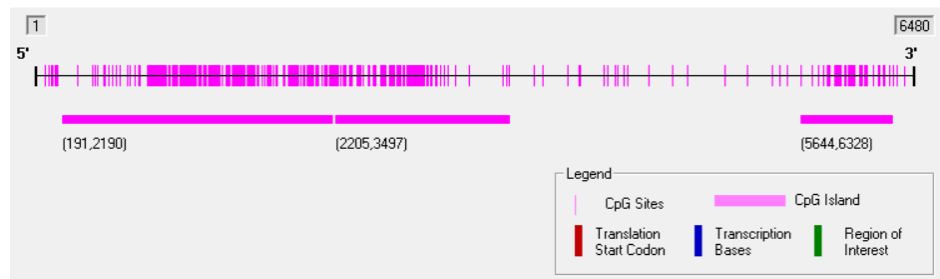
cirúrgico com a mastectomia parcial ou total. Os animais também foram subdivididos em dois grupos: os com sobrevida menor que 12 meses e o grupo com sobrevida maior que 12 meses, afim de comparar os valores de metilação e expressão.

5.2. PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE *P21*

5.2.1 Caracterização das Ilhas CpGs

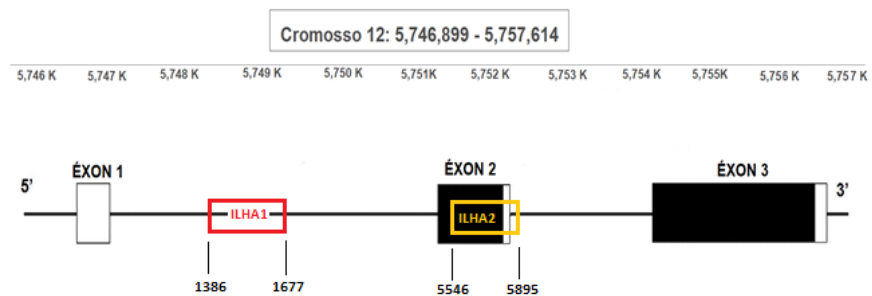
A sequência do gene *P21* foi submetida ao programa Methyl Primer Express v. 1.0 (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4376041>), no qual foi possível observar três ilhas CpGs distintas ao longo do gene. Para o presente estudo, foram analisadas somente duas delas, a ilha 1 e 2, visto que a região de uma das ilhas continha muitas sequências repetitivas. A ilha 1, localizada em um íntron na porção inicial do gene, tem um tamanho de 2000pb, com o total de nucleotídeos divididos em: A (15.20%); T (17.20%); C (29.95%); G (37.65%); C+G (67.60%); A+T/C+G (0.48%) e CpG (9.70%). Enquanto que a ilha 2, localizada no éxon 2 tem 685pb com: A (15.91%); T (16.06%); C (30.80%); G (37.23%); C+G (68.03%); A+T/C+G (0.47%) e CpG (5.85%) (Figura 22 e 23).

FIGURA 22 - ILHAS CPGS DO GENE *P21*



Notas: ao programa Methyl Primer Express v. 1.0 (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4376041>)

FIGURA 23 - LOCALIZAÇÃO DAS ILHAS 1 E 2 NO GENE *P21*



No mesmo *software*, foram desenhados os iniciadores específicos para avaliação do padrão de metilação no gene *P21* de caninos, e após *Bisulfite Sequencing PCR* e visualização em gel de agarose 2% foram obtidos fragmentos com tamanho aproximado de 313pb para ilha 1 e 344pb para ilha 2 (Tabela 2).

TABELA 2 – INICIADORES DE METILAÇÃO

Gene <i>P21</i>	Sequência dos Iniciadores 5' - 3'	Tamanho pb	Nº CGs
Ilha 1	F: GTGATTGTTTGGTTGGTATAAA R: AACCTCCAAATAAAACCTCTC	313	34
Ilha 2	F: TGGTTAGTTGTGTGTAAGAGGTT R: CCCATCCTCACCTATCATACTA	344	22

5.2.2 Status de Metilação na Ilha 1

Foi sequenciada uma região de ~300pb com 34 sítios CpGs, em 40 amostras do total, sendo 19 de tecido tumoral, 19 de tecido não tumoral e controles para verificar e comprovar o *status* de metilação e a eficiência da conversão das citosinas não metiladas em timina (Figura 24 e Figura 25).

FIGURA 24 - ALINHAMENTO DAS AMOSTRAS DA ILHA 1 DO GENE *P21*

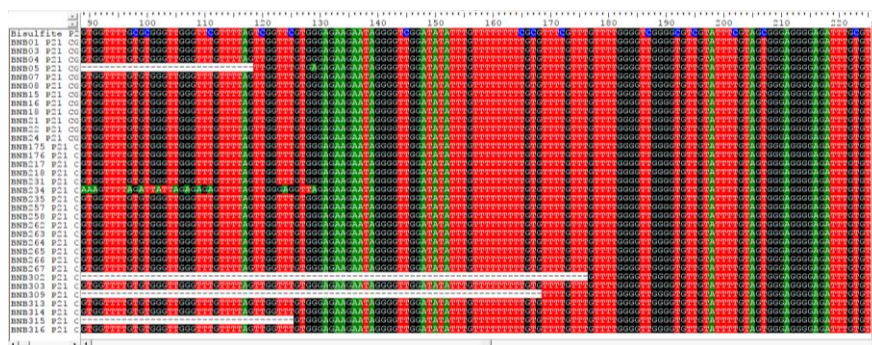
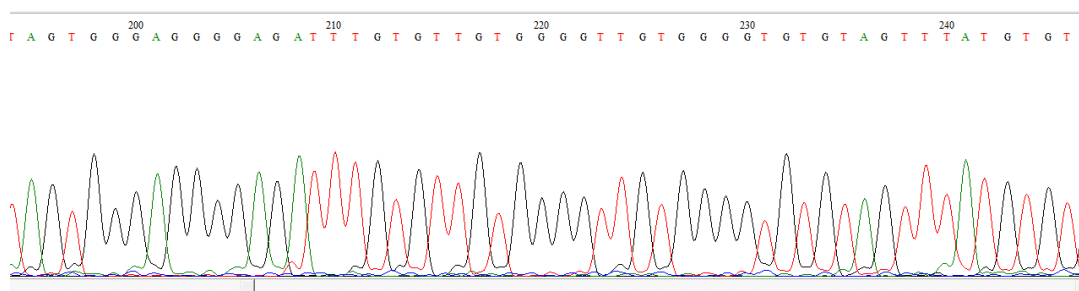
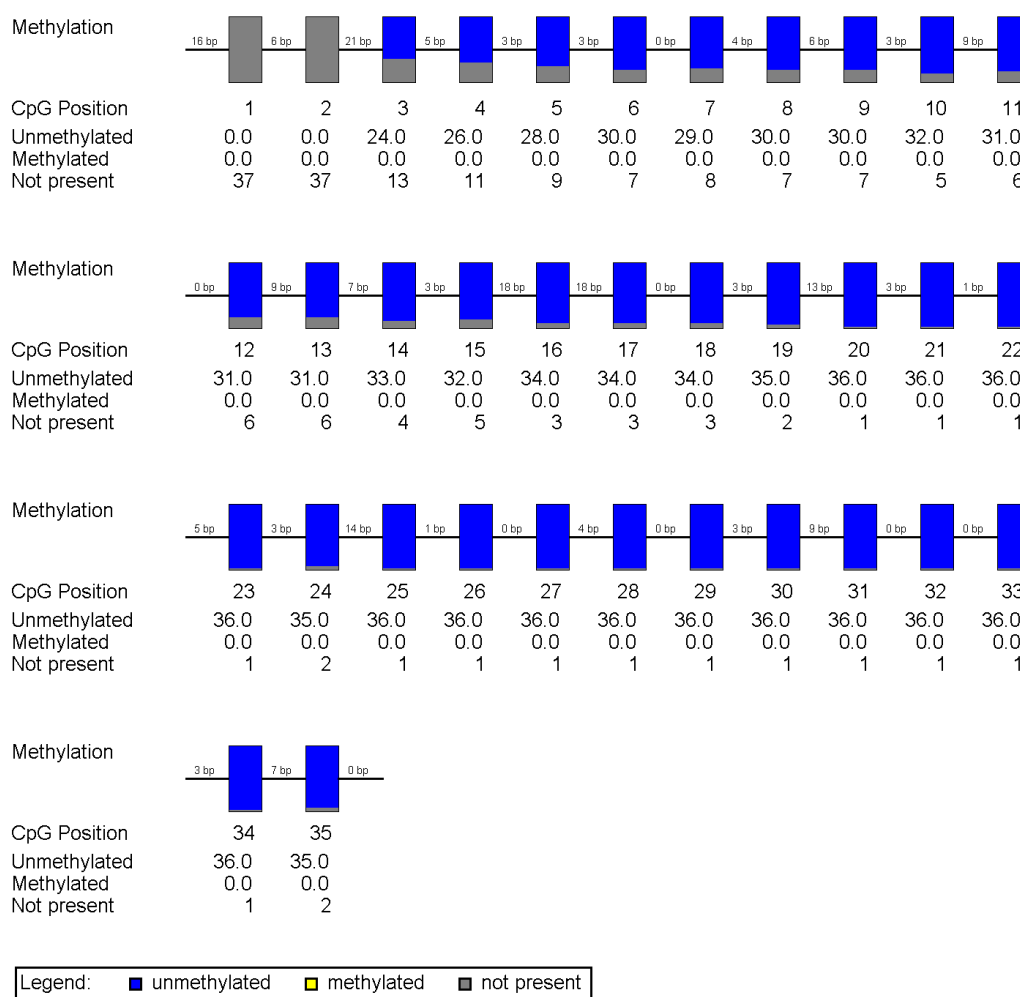


FIGURA 25 - CONVERSÃO DAS CITOSINAS NÃO METILADAS DA ILHA 1 DO GENE *P21*



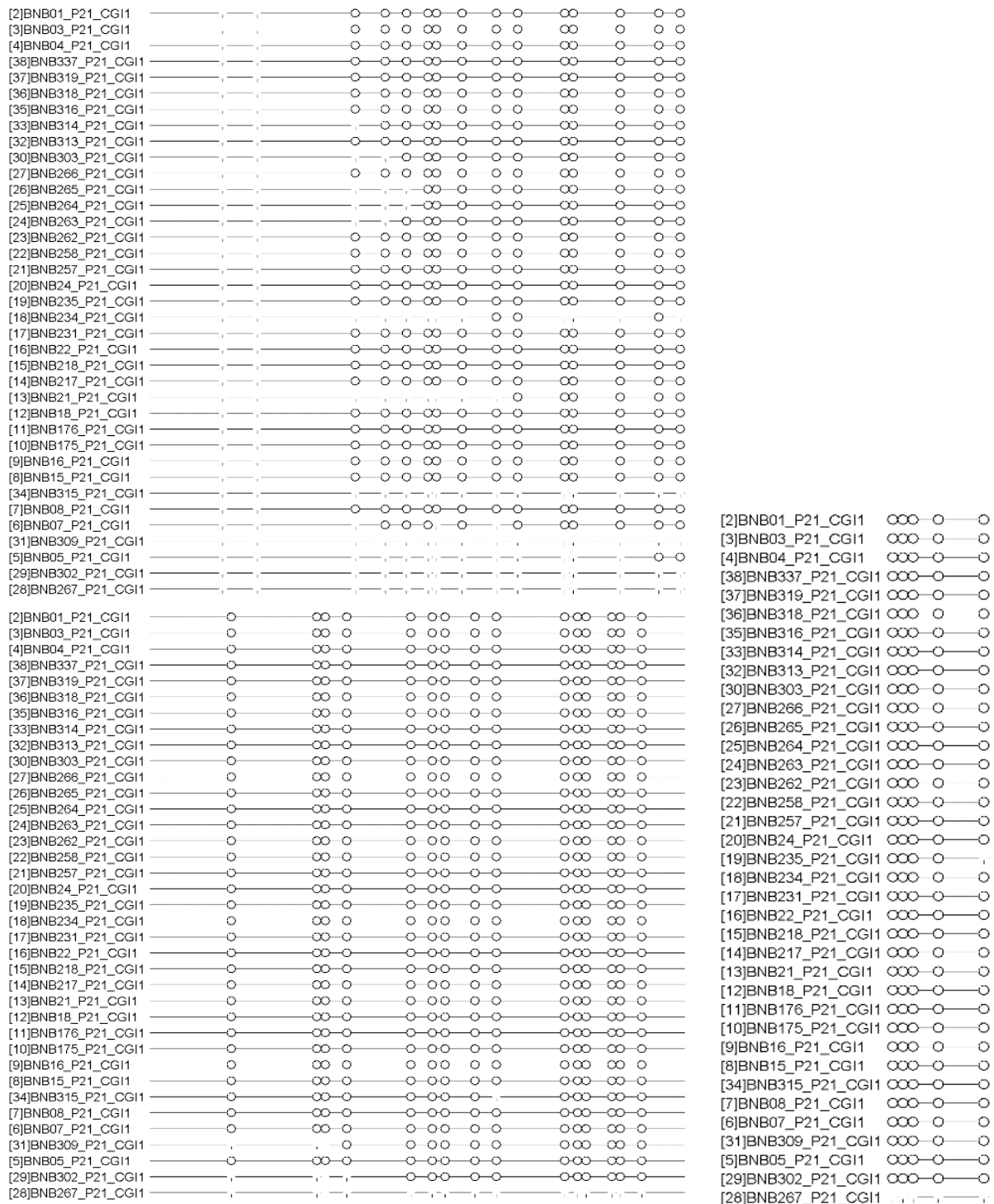
Todas as sequências analisadas não estavam metiladas conforme a análise pelo BiQ Analyzer, não sendo observada metilação diferencial entre os tecidos tumoral e não tumoral, bem como sua relação com os dados clínicos dos animais (Figura 26 e Figura 27).

FIGURA 26 - DIAGRAMA COM AS REGIÕES NÃO METILADAS DA ILHA 1



Notas: Azul (não metilado), amarelo (metilado), cinza (não detectado).

FIGURA 27- DIAGRAMA DA ILHA 1 NÃO METILADA DO P21



5.2.2 Status De Metilação na Ilha 2

Foi sequenciada uma região de ~340pb com 22 sítios CpGs, em um total de 50 amostras, sendo 27 de tecido tumoral, 21 de tecido não tumoral e controles para verificar e comprovar o status de metilação, com a não conversão das citosinas metiladas (Figura 28 e Figura 29).

FIGURA 28 - CITOSINAS METILADAS DA ILHA 2

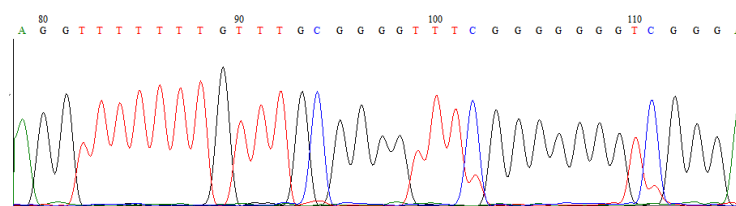
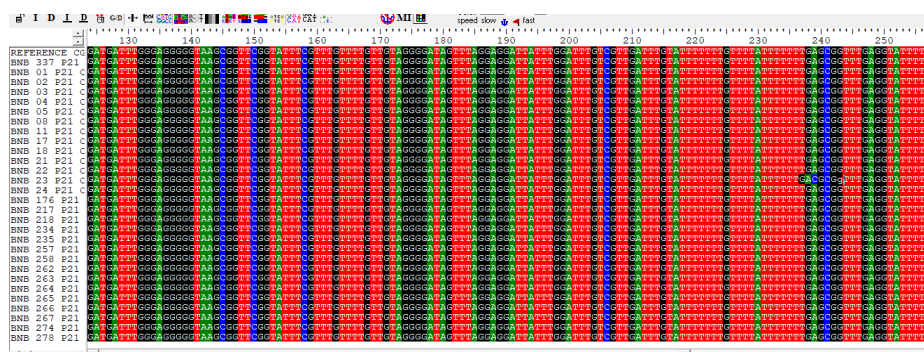
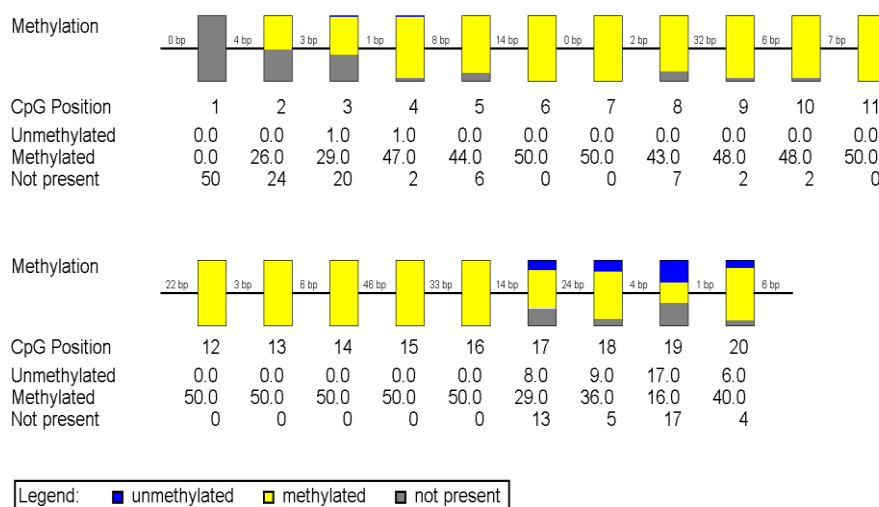


FIGURA 29 - ALINHAMENTO DAS AMOSTRAS DA ILHA 2



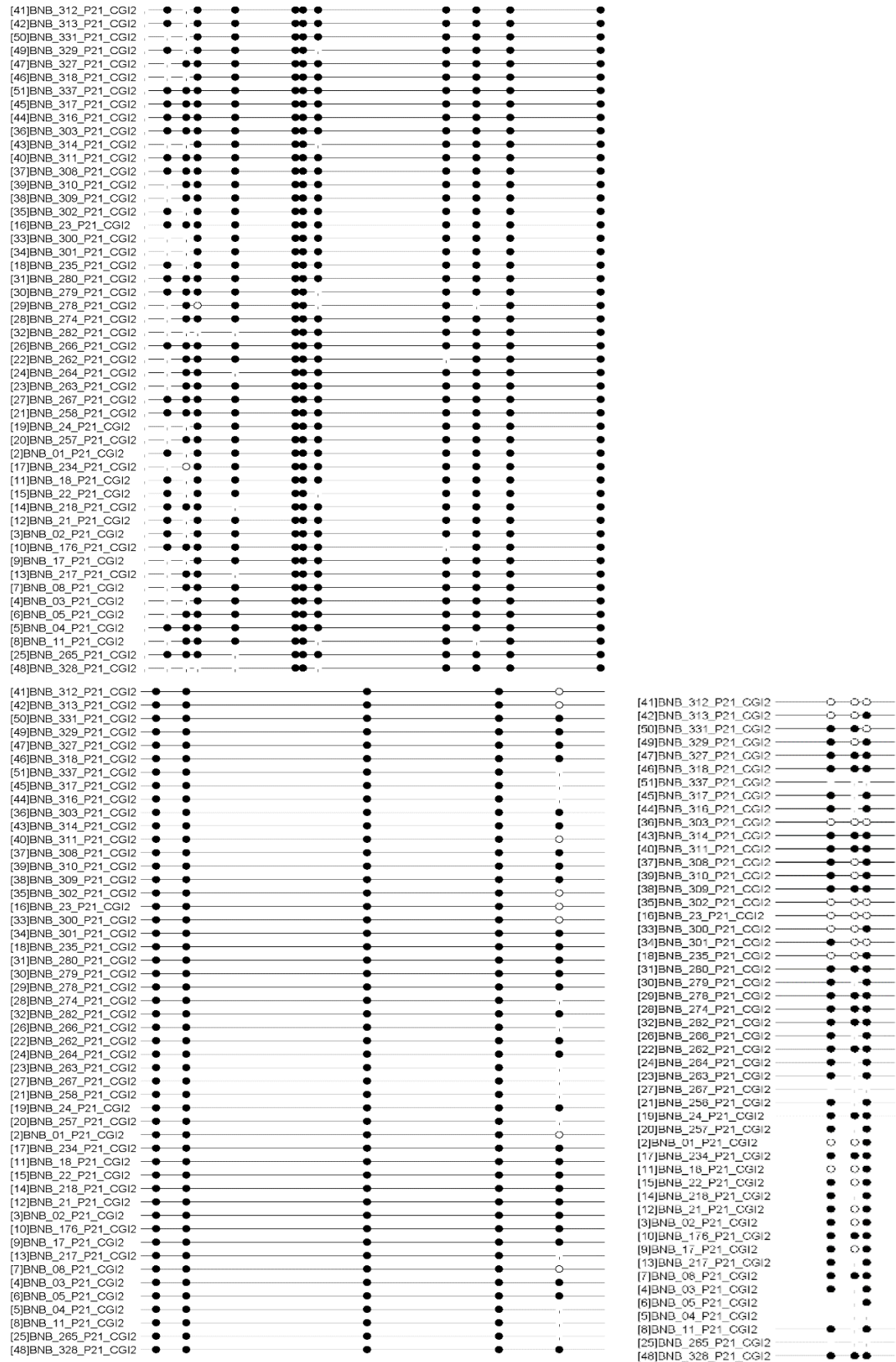
Todas as sequencias analisadas estavam metiladas conforme a análise pelo software BiQ Analyzer (<http://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>), não sendo observadas metilação diferencial entre os tecidos tumoral e não tumoral, bem como sua relação com os dados clínicos dos animais. Apesar de alguns sítios parcialmente desmetilados, essas amostras não foram estatisticamente significantes (Figura 30 e Figura 31).

FIGURA 30 - DIAGRAMA COM AS REGIÕES METILADAS DA ILHA 2



Notas: Azul (não metilado), amarelo (metilado), cinza (não detectado).

FIGURA 31 - DIAGRAMA DA ILHA 2 METILADA DO P21

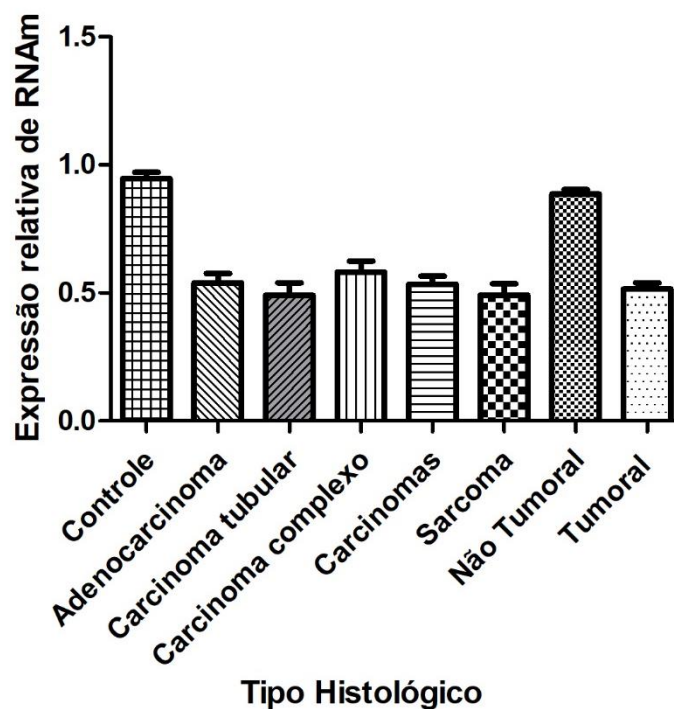


5.3 PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE *P21*

Com o intuito de comparar o padrão de metilação com o nível de expressão do gene *p21*, bem como correlacionar a expressão no contexto clínico dos animais, foi realizada a PCR em tempo real de 83 amostras de tecido mamário obtidas de 40 cadelas, sendo 44 amostras tumorais e 39 amostras não tumorais, além de 2 animais como controles. Foi utilizado como controles constitutivos os genes *GAPDH* e *HPRT1*, normalizando o nível de expressão da análise.

Comparando o nível de expressão de *p21* das amostras tumorais com as não tumorais pode-se verificar uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.0001$) entre esses dois tipos de tecidos, demonstrando que a expressão de *p21* está reduzida em todas as amostras tumorais (Média=0,515019214), bem como em relação as amostras tumorais e dos controles ($p=0.0065$). Não foi observada nas amostras não tumorais (Média= 0,885244675) diferença de expressão em relação as amostras controles (Média= 0,946750033) ($p=0.2626$). Em relação aos grupos tumorais, o nível de expressão entre carcinomas e sarcomas foi similar e sem significância estatística ($p=0.4116$) (Figura 32).

FIGURA 32 - ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO DO GENE *P21*



Considerando os animais SRDs (Média=0,502) e os puros (Média=0,533), a diferença do nível de expressão também não foi estatisticamente significantes entre eles ($p=0.2990$). Já a correlação entre os dados clínicos no uso de anticoncepcionais ($p=0.7995$), pseudociese ($p=0,6255$), castração ($p=0.8456$), gestação ($p=0.4542$) e metástase (0.1192) também não foram estatisticamente significantes (Quadro 1). Em relação a sobrevida, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre amostras com sobrevida superior a 12 meses e sobrevida menor que 12 meses (O.R= 0.8889; $P=0.6770$).

QUADRO 1 – VALORES DE EXPRESSÃO DP GENE *P21*

Grupos	Média	p Valor
Tumoral	0,515019214	< 0.0001
Não tumoral	0,885244675	
Controle	0,946750033	0,2626
Não tumoral	0,885244675	
Sarcoma	0,492013211	0,4116
Carcinomas	0,533944465	
SRD	0,502546173	0,299
Puros	0,533033828	
Idade<10.92	0,520337863	0,9896
Idade>10.92	0,513169273	
Sem Anticoncepcional	0,486781111	0,7995
Anticoncepcional	0,449351558	
Sem Pseudociese	0,470087833	0,6255
Pseudociese	0,48623505	
Castradas	0,48606814	0,8456
Inteiras	0,46895752	
Metástase	0,38574152	0,1192
Sem Metástase	0,489022844	
Gestação	0,49010935	0,4542
Sem Gestação	0,455796738	
Sobrevida<1ano	0,527065083	0,6770
Sobrevida>1ano	0,394123543	

6 DISCUSSÃO

A maioria dos animais analisados nesse trabalho são idosos, com média de 10.9 anos de idade, diferentemente do observado por Gupta et al. (2012), no qual as cadelas tinham em média 8.8 anos de idade. Essa diferença pode ser explicada pelo diagnóstico tardio de câncer de mama dos animais na região de Belém, devido as questões sociais e econômicas. No entanto, nossos dados corroboram com os dados observados na população do México por Salas et al. (2015), no qual as cadelas foram diagnosticadas entre os 9-12 anos de idade. Em relação a essa idade, tanto na avaliação do perfil de metilação quando o nível de expressão, não se teve uma diferença estatisticamente significativa, visto que a maioria dos animais eram idosos com uma idade similar.

Mais da metade dos animais analisados neste estudo não tem raça definida (SRD), pois essa é a demanda local dos atendidos no Hospital Veterinário da UFRA. Os resultados de metilação e expressão também demonstraram semelhança entre os animais puros e SRDs. De acordo com Cassali et al. (2014), algumas raças puras têm um risco maior de desenvolver o câncer de mama, mas esse risco não ocorreu na população estudada. O tipo tumoral mais frequente em nossa população foi o carcinoma, cuja a média de expressão (0,533944465) foi levemente maior que em sarcomas (0,492013211), mas sem significância estatística.

Foi possível avaliar mais de 34 sítios CGs em uma CGI intrônica e uma CGI em região codificadora. Segundo Han e Zhao (2009) o genoma canino contém um maior número e densidade de CGIs do que em humanos e ratos, tendo proporcionalmente poucos CGIs associados a região promotora. Portanto grande parte das ilhas CpGs estão em regiões não codificantes e são pouco conhecidas na literatura. Tal característica em cães é correlacionada com as altas taxas de recombinação e o número elevado de cromossomos.

Na ilha 1 e ilha 2 do gene *P21* não foram detectadas alterações no padrão de metilação entre as amostras tumorais, não tumorais e controles em na população analisada. Trabalhos na Suíça e Índia, em mulheres com câncer de mama, relatam que a região promotora do gene *P21* está geralmente hipermetilada. Na Índia, o risco para desenvolver câncer de mama chega a dobrar em pacientes com essa hipermetilação (RADPOUR et al., 2010, ASKARI et al., 2013). Ainda na Índia, segundo AKHTER et al. (2014), em 150 pacientes com câncer de mama, o promotor de *P21* está hipermetilado em estágios mais avançados, levando a uma expressão reduzida de p21. Contudo, segundo ZOHNY et al. (2017), o promotor de *P21* não está

hipermetilado nas amostras de câncer de mama em mulheres do Egito, corroborando com os resultados de Staalesen et al. (2004) na Noruega, que não foram detectadas hipermetilação no promotor de *P21* em pacientes tratados com doxorubicina, mitomicina e 5-fluorouracil.

Mesmo não sendo possível estabelecer uma relação do padrão de metilação com o nível de expressão das amostras, os resultados de expressão do *P21* permitem avaliar a importância do gene em diferentes mecanismos celulares. Klopfeisch e Gruber (2009) avaliaram a expressão dos genes *P21*, *P27* e *P53* com o mRNA de 110 cadelas com câncer de mama na Alemanha, os resultados demonstraram que a expressão de *P21* estava reduzida nas amostras tumorais de forma geral, especialmente nas metastáticas, porém com a expressão aumentada somente nos adenocarcinomas. Tal resultado pode indicar diferenças de expressão em diferentes tipos histológicos, sendo que apenas 9.5% (20/210) dos animais avaliados eram sem raça definida. Kim et al. (2017) avaliaram 188 amostras de tumores mamários benignos e malignos, na população de cadelas da Coreia do Sul, por meio de imunohistoquímica (IHQ) e verificaram a ausência de expressão nuclear e citoplasmática da proteína p21 na maioria (54.4%) das suas amostras totais. As amostras que tinham a expressão de p21 eram, em sua maioria, de tumores benignos. A diferença de expressão entre um tumor benigno e um maligno, sugere um pior prognóstico associado a redução de p21.

Em nosso trabalho todas as amostras tumorais são malignas, mas também apresentaram uma expressão reduzida de *P21* quando comparadas com os tecidos não tumorais do mesmo animal e controles. Relatamos a redução da expressão das amostras com metástase (0,38574152), quando comparadas com as amostras sem metástase (0,489022844), não sendo estatisticamente significativa. Em nossas amostras, a expressão de p21 foi similar entre os diferentes tipos tumorais e entre animais de diferentes raças, sugerindo a ocorrência de vias similares de progressão tumoral em nossa população. Nos animais dessa pesquisa foi possível correlacionar o nível de expressão com a sobrevida do paciente: menor que 12 meses (0,527065083) e com a sobrevida maior que 12 meses (0,394123543), sugerindo um pior prognóstico com o aumento da expressão de *P21*.

Poucos trabalhos avaliam a expressão de *P21* em tumor mamário canino e alguns estudos com linhagens desses tumores oriundas do tumor misto benigno canino (CMT-U229), carcinoma maligno (P114) e osteossarcoma (CMT-U335) fornecem informações interessantes, de uma maior expressão de *P21* (cRNA) em carcinomas (RAO et al., 2008), similar aos nossos resultados, que demonstram um leve aumento da expressão de p21 nas amostras de carcinoma

(0,533944465). Deinnocentes et al. (2009), avaliaram a expressão (mRNA) correlacionada entre *P53* e *P21* em três linhagens (CMT12, CMT27 e CMT28) originadas de cânceres espontâneos mamários caninos, sendo que em uma delas não foi observada expressão de *P21*, diferentemente dos nossos dados em que a menor expressão detectada foi em um carcinoma misto (0,2344).

A expressão de p21 também é diferente em outros tumores caninos. No câncer gástrico de cães na Espanha, as análises por imunohistoquímica demonstram uma expressão reduzida de p21, principalmente em carcinomas indiferenciados, além de uma expressão nuclear aumentada em 58.8% dos 17 casos (CARRASCO et al., 2011). Na análise de 22 casos de gliomas espontâneos em caninos e mais três linhagens de gliomas, a expressão de p21 foram reduzidas ou ausente na maioria dos casos (BOUDREAU et al., 2017). Segundo Koenig et al. (2002) após análise de imunoexpressão e mRNA de 31 amostras de parafina de melanoma canino e uma de linhagem de melanoma primário, foi possível verificar que a expressão de p21 estava aumentada (moderada-forte) no citoplasma e no núcleo.

As causas para diminuição da expressão nas amostras tumorais podem ocorrer pelo controle direto de p53, como fator de transcrição ou controle indireto por outros genes e proteínas, alterações diretas nos nucleotídeos e eventos epigenéticos como a metilação na região promotora e microRNAs (DALECK; DE NADIR, 2009; KIM et al., 2014; BISWAS; RAO, 2017). Em relação a metilação em nosso trabalho, não foi identificada uma correlação entre o perfil de metilação das ilhas CpGs no corpo do gene com a expressão de *P21*, porém isso não inviabiliza a possibilidade de que o padrão de metilação na região promotora do gene esteja alterado e influencie na expressão.

As consequências dessa expressão reduzida podem favorecer a continuidade do ciclo celular, sem os mecanismos adequados de reparo, assim como auxiliar na invasão e crescimento da massa tumoral (CAZZALINI et al., 2010). O papel positivo de p21 no complexo DREAM e nos mecanismos de apoptose também podem ficar comprometidos, resultando em desregulação de genes, pela não ligação do complexo nas regiões promotoras conservadas (E2F) de genes responsáveis pela replicação, adesão celular e instabilidade genômica (ENGELAND, 2017).

Os estudos sobre a ausência ou presença do p21 em tumores mamários geram resultados divergentes em humanos. Segundo Frommowitz et al. (1987), a expressão de p21 no câncer de mama em mulheres varia com a localização do tumor. Wei et al. (2015) relatam que em 65

amostras de câncer de mama em mulheres na China, o *P21* está superexpresso (mRNA e proteínas), para isso eles compararam as amostras tumorais com o tecido adjacente não tumoral, demonstrando uma correlação positiva entre o nível de expressão e o tamanho do tumor, bem como com o grau, a metástase em linfonodos e um pior prognóstico. Segundo Zohny et al. (2017), por meio da comparação de 85 mulheres do Egito com câncer de mama e 36 mulheres com lesões mamárias iniciais, o gene *P21* se encontra superexpresso, em nível proteico, nos tumores de maior grau e nas pacientes com comprometimento dos linfonodos.

Na pesquisa de Jiang et al. (1997) na China, eles detectaram baixos níveis de expressão de p21, principalmente nos tumores de maior grau, em metástases e linfonodos comprometidos, concluindo que a baixa expressão de p21 era um sinal de pior prognóstico para as mulheres. Mais recentemente, em 81 amostras de tumor de mama na China, por meio de imunohistoquímica foram detectadas cerca de 66 amostras com expressão negativa para p21 (WANG et al., 2017). Corroborando com esses resultados, níveis reduzidos da expressão de p21 também ocorrem no carcinoma ductal e lobular de mulheres na Finlândia, mas sem relação com progressão tumoral nas pacientes (PELLIKAINEN et al., 2003). Na população indiana, a expressão de p21 (mRNA) foi baixa na detecção através do sangue periférico (ASKARI et al., 2013). Nos tumores de mama e no tumor gástrico também ocorre uma perda da expressão do *P21* e um aumento de *P53*. Apesar dessa diminuição geral de p21, altos níveis citoplasmáticos foram associados com a evasão da apoptose, proliferação celular e um pior prognóstico (GEORGAKILAS et al., 2017).

Já na linhagem celular (MCF-7) de câncer de mama em humanos, o receptor de estrogênio (ER) atua nos promotores de *P53/P21*, especificamente em uma parte da região de resposta a estrógenos (ERE), suprimindo a transcrição desses genes, levando a baixos níveis de mRNAs e proteínas. O ER alfa também atua no promotor de *PCNA*, mas estimulando a expressão de mRNAs e proteínas e assim promove a entrada da célula na fase S e na fase G2/M, levando a uma maior proliferação. Para facilitar a atuação livre de *PCNA* na síntese de DNA, o receptor de estrogênio também promove a ativação transcricional na região ERE no promotor do gene de microRNA: miR-17-5p, com o intuito de silenciar o mRNA de *P21* na região 3' UTR' (LIAO et al., 2014). Enquanto que os tumores no cérebro, próstata, ovário e esôfago são detectados com níveis elevados na expressão de *P21* em humanos, (ABBAS; DUTTA, 2009; ELLIS et al., 1997; GREEN et al., 2014).

A expressão de proteínas relacionadas nas vias de atuação de p21 em tumores mamários caninos são importantes para avaliar possíveis causas na redução de expressão de *P21*, bem como as prováveis consequências na cascata de ativação de p21. Segundo Oliveira et al. (2017), o nível de expressão do mRNA de *TP53* não foi diferente entre amostras não tumorais e amostras tumorais de 40 de cães no RJ-Brasil, indicando não existir correlação do nível de expressão desse gene com a agressividade tumoral. Para Tong et al. (2016) na linhagem de células caninas de origem metastáticas (CHMm) o p53 é responsável por aumentar a expressão de p21, com isso o ciclo celular para na fase G1/S e o processo de reparo é realizado.

Por outro lado, Dolka et al. (2016) relatam, em 40 cadelas na Polônia, uma expressão positiva de p53 em apenas 30% (12/40) das amostras, sendo a maioria nos tumores malignos, já que na maioria dos animais sem metástase a expressão de p53 foi negativa. Em nossas amostras uma das possíveis causas da redução na expressão pode ser a desregulação das funções da p53 como fator de transcrição, levando também a alterações na senescência, invasão celular, apoptose e na regulação do complexo DREAM. Borge et al. (2015) avaliaram 22 cadelas com tumores mamários no Japão e verificaram por meio de imuno-histoquímica a expressão aumentada de c-myc na maioria das amostras. Um efeito inibitório de c-myc no promotor de *P21* pode ser visto no trabalho de Peter Jung e Heiko Hermeking (2009)

A expressão de procaspases permanece alta nas amostras normais e nos 45 casos de cães com tumor mamário na região da Itália, exceto nos casos de carcinoma tubulopapilar (BONGIOVANNI et al., 2017). Para Dolka et al. (2016) a caspase 3 estava presente na maioria dos tumores benignos, conjuntamente com bcl, enquanto bax e p53 eram expressas nos tumores malignos. A função da procaspases em clivar o p21 e aumentar sua expressão citoplasmática para evadir da apoptose também não pode ser descartada como uma forte influência na atuação de p21.

A expressão de PCNA está aumentada nos tumores mamários caninos do tipo carcinoma que tenham alguma metástase para linfonodos adjacentes, indicando uma correlação positiva da expressão de PCNA com a proliferação e malignidade celular (KLOSE et al., 2011), visto que a boa parte da proteína associada a proliferação celular deveria ser bloqueada pela proteína p21, para evitar a replicação do material genético sem pontos de checagem.

7 CONCLUSÃO

Foram identificadas duas ilhas CpG no corpo do gene *P21*: uma localizada no íntron 1 e outra no éxon 2;

Não foi detectado alteração entre o perfil de metilação das ilhas 1 e 2 entre as amostras tumorais, não tumorais e controles;

O nível de expressão do gene *P21* em amostras tumorais e não tumorais foi estatisticamente significativo ($p=0.0001$), bem como entre as amostras tumorais e controles (0.0065), sugerindo um papel diagnóstico da expressão deste gene em tumores de mama caninos;

Não houve correlação entre o perfil de metilação com os dados histopatológicos, de perfil clínico, raça e idade, bem como com o padrão de expressão de *P21*;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Tarek; DUTTA, Anindya. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400-414, 2009.
- AGRAWAL, Sudesh et al. Stat1-dependent, p53-independent expression of p21waf1 modulates oxysterol-induced apoptosis. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 7, p. 1981-1992, 2002.
- AKHTER, Naseem et al. Association of mutation and hypermethylation of p21 gene with susceptibility to breast cancer: a study from north India. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 5, p. 2999-3007, 2014.
- ALI, Muhammad Akhtar; SJÖBLOM, Tobias. Molecular pathways in tumor progression: from discovery to functional understanding. **Molecular BioSystems**, v. 5, n. 9, p. 902-908, 2009.
- ANDERS, Lars et al. A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. **Cancer cell**, v. 20, n. 5, p. 620-634, 2011.
- BARR, Alexis R. et al. DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. **Nature communications**, v. 8, p. 14728, 2017.
- BAUER, Nicholas C.; CORBETT, Anita H.; DOETSCH, Paul W. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 21, p. 10083-10101, 2015.
- BESSON, Arnaud et al. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. **Genes & development**, v. 18, n. 8, p. 862-876, 2004.
- BESSON, Arnaud; DOWDY, Steven F.; ROBERTS, James M. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. **Developmental cell**, v. 14, n. 2, p. 159-169, 2008.
- BISWAS, Kuntal et al. The E3 Ligase CHIP Mediates p21 Degradation to Maintain Radioreistance. **Molecular Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. 651-659, 2017.b
- BISWAS, Subhankar; RAO, C. Mallikarjuna. Epigenetics in cancer: Fundamentals and beyond. **Pharmacology & therapeutics**, 2017.a
- BLUNDELL, Renald A. The biology of p21Waf1/Cip1-review paper. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v. 2, n. 1, p. 33-40, 2006.
- BOCK, Christoph et al. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. **Bioinformatics**, v. 21, n. 21, p. 4067-4068, 2005.
- BONGIOVANNI, Laura et al. Survivin and related proteins in canine mammary tumors: immunohistochemical expression. *Veterinary pathology*, v. 52, n. 2, p. 269-275, 2015.
- BORGE, K. S.; BØRRESEN-DALE, A. L.; LINGAAS, F. Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumors. **Veterinary and comparative oncology**, v. 9, n. 4, p. 241-250, 2011.

BORGE, Kaja S. et al. Canine mammary tumours are affected by frequent copy number aberrations, including amplification of MYC and loss of PTEN. *PloS one*, v. 10, n. 5, p. e0126371, 2015.

BORGES, Barbara Do Nascimento et al. Promoter polymorphisms and methylation of E-cadherin (CDH1) and KIT in gastric cancer patients from northern Brazil. **Anticancer research**, v. 30, n. 6, p. 2225-2233, 2010.

BOUDREAU, C. E. et al. Molecular signalling pathways in canine gliomas. *Veterinary and comparative oncology*, v. 15, n. 1, p. 133-150, 2017.

BRISTOW, Robert G.; HILL, Richard P. Hypoxia and metabolism: hypoxia, DNA repair and genetic instability. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 3, p. 180-192, 2008.

CARRASCO, V. et al. Canine gastric carcinoma: immunohistochemical expression of cell cycle proteins (p53, p21, and p16) and heat shock proteins (Hsp27 and Hsp70). *Veterinary pathology*, v. 48, n. 1, p. 322-329, 2011.

CASSALI, Geovanni Dantas et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2011.

CAZZALINI, Ornella et al. DDB2 association with PCNA is required for its degradation after UV-induced DNA damage. **Cell Cycle**, v. 13, n. 2, p. 240-248, 2014.

CAZZALINI, Ornella et al. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21 CDKN1A in the DNA damage response. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 704, n. 1, p. 12-20, 2010.

CHEN, I.-Tsuen et al. Characterization of p21Cip1/Waf1 peptide domains required for cyclin E/Cdk2 and PCNA interaction. **Oncogene**, v. 12, n. 3, p. 595, 1996.

CHEN, Jun et al. Contribution of p16 INK4a and p21 CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 4, p. H1575-H1586, 2006.

CHEN, Junjie et al. Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. **Molecular and cellular biology**, v. 16, n. 9, p. 4673-4682, 1996.

CHEN, Junjie et al. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. **Nature**, v. 374, n. 6520, p. 386-388, 1995.

CHEN, Tong et al. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): A Biological Process in the Development, Stem Cell Differentiation and Tumorigenesis. **Journal of cellular physiology**, 2017.

CHOUAIB, Salem et al. Tumor plasticity interferes with anti-tumor immunity. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 34, n. 2, 2014.

ČMIELOVÁ, Jana; ŘEZÁČOVÁ, M. Protein and its function based on a subcellular localization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 12, p. 3502-3506, 2011.

COLEMAN, Mathew L.; MARSHALL, Christopher J.; OLSON, Michael F. Ras promotes p21 Waf1/Cip1 protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation. **The EMBO journal**, v. 22, n. 9, p. 2036-2046, 2003.

DALECK, Carlos Roberto; DE NARDI, Andriago Barboza; RODASKI, Suely. Oncologia em cães e gatos. **São Paulo: Roca**, v. 1, p. 8, 2009.

DEICHMANN, Ute. Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. **Developmental biology**, v. 416, n. 1, p. 249-254, 2016.

DEINNOCENTES, Patricia; AGARWAL, Payal; BIRD, R. Curtis. Phenotype-rescue of cyclin-dependent kinase inhibitor p16/INK4A defects in a spontaneous canine cell model of breast cancer. *Journal of cellular biochemistry*, v. 106, n. 3, p. 491-505, 2009.

DENG, Chuxia et al. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, v. 82, n. 4, p. 675-684, 1995.

DOLKA, Izabella; KRÓL, Magdalena; SAPIERZYŃSKI, Rafał. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: an immunohistochemical and prognostic study. *Research in veterinary science*, v. 105, p. 124-133, 2016.

DOMINGO-SANANES, Maria Rosa et al. Switches and latches: a biochemical tug-of-war between the kinases and phosphatases that control mitosis. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 366, n. 1584, p. 3584-3594, 2011.

DOMINGUEZ-BRAUER, Carmen et al. Targeting mitosis in cancer: emerging strategies. **Molecular cell**, v. 60, n. 4, p. 524-536, 2015.

DOTTO, G. Paolo. p21 WAF1/Cip1: more than a break to the cell cycle?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1471, n. 1, p. M43-M56, 2000.

DULIC, Vjekoslav. Senescence regulation by mTOR. **Cell Senescence: Methods and Protocols**, p. 15-35, 2013.

DUPONT, Cathérine; ARMANT, D. Randall; BRENNER, Carol A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. In: **Seminars in reproductive medicine**. © Thieme Medical Publishers, 2009. p. 351-357.

DUTTO, Ilaria et al. Biology of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. **Archives of toxicology**, v. 89, n. 2, p. 155-178, 2015.

DUTTO, Ilaria et al. p21CDKN1A Regulates the Binding of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 to DNA Repair Intermediates. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. e0146031, 2016.

EL-DEIRY, Wafik S. p21 (WAF1) Mediates cell-cycle inhibition, relevant to cancer suppression and therapy. *Cancer research*, v. 76, n. 18, p. 5189-5191, 2016.

ELLIS, P. A. et al. Absence of p21 expression is associated with abnormal p53 in human breast carcinomas. *British journal of cancer*, v. 76, n. 4, p. 480, 1997.

ENGELAND, Kurt. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. **Cell Death and Differentiation**, p. cdd2017172, 2017.

ESTELLER, Manel. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5427, 2002.

EŽERSKYTĖ, Akvilė et al. The retrospective analysis of mammary tumors in dogs. **Vet Med Zoot**, v. 53, n. 75, p. 3-8, 2011.

FANG, Li et al. p21 Waf1/Cip1/Sdi1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53. **Oncogene**, v. 18, n. 18, 1999.

FEINBERG, Andrew P.; OHLSSON, Rolf; HENIKOFF, Steven. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature reviews genetics**, v. 7, n. 1, p. 21-33, 2006.

FISCHER, Martin et al. Integration of TP53, DREAM, MMB-FOXO1 and RB-E2F target gene analyses identifies cell cycle gene regulatory networks. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 13, p. 6070-6086, 2016..

GARTEL, Andrei L. The conflicting roles of the cdk inhibitor p21 (CIP1/WAF1) in apoptosis. **Leukemia research**, v. 29, n. 11, p. 1237-1238, 2005.

GARTEL, Andrei L.; TYNER, Angela L. Transcriptional regulation of the p21 (WAF1/CIP1) gene. **Experimental cell research**, v. 246, n. 2, p. 280-289, 1999.

GAUTAM, S.; SOOD, N. K.; GUPTA, K. Aberrant cytoplasmic accumulation of retinoblastoma protein in basal cells may lead to increased survival in malignant canine mammary tumours. *Veterinarni Medicina*, v. 59, n. 2, 2014.

GAVET, Olivier; PINES, Jonathon. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. **Developmental cell**, v. 18, n. 4, p. 533-543, 2010.

GEORGAKILAS, Alexandros G.; MARTIN, Olga A.; BONNER, William M. p21: A two-faced genome guardian. *Trends in molecular medicine*, v. 23, n. 4, p. 310-319, 2017.

GOLDSCHMIDT, Michael H.; PEÑA, Laura; ZAPPULLI, Valentina. Tumors of the Mammary Gland. **Tumors in Domestic Animals**, p. 723-765, 2017.

GREEN, Andrew R. et al. HER2/HER3 heterodimers and p21 expression are capable of predicting adjuvant trastuzumab response in HER2+ breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, v. 145, n. 1, p. 33-44, 2014.

GUPTA, K. et al. Epidemiological studies on canine mammary tumour and its relevance for breast cancer studies. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 322-333, 2012.

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

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARPER, J. Wade et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. **Molecular biology of the cell**, v. 6, n. 4, p. 387-400, 1995

HEO, Jee-In et al. ERK mediates anti-apoptotic effect through phosphorylation and cytoplasmic localization of p21Waf1/Cip1/Sdi in response to DNA damage in normal human embryonic fibroblast (HEF) cells. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 4, p. 2785-2791, 2011.

HOEIJMAKERS, Jan HJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **nature**, v. 411, n. 6835, p. 366-374, 2001.

HWANG, Chae Young; LEE, Cheolju; KWON, Ki-Sun. Extracellular signal-regulated kinase 2-dependent phosphorylation induces cytoplasmic localization and degradation of p21Cip1. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 12, p. 3379-3389, 2009.

HYDBRING, Per; MALUMBRES, Marcos; SICINSKI, Piotr. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 17, n. 5, p. 280-292, 2016.

JÄNICKE, Reiner U. et al. The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. **Cell Cycle**, v. 6, n. 4, p. 407-413, 2007.

JIANG, Ming et al. p21/waf1/cip1 and mdm-2 expression in breast carcinoma patients as related to prognosis. **International journal of cancer**, v. 74, n. 5, p. 529-534, 1997.

JIN, Yetao et al. MDM2 promotes p21 waf1/cip1 proteasomal turnover independently of ubiquitylation. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 23, p. 6365-6377, 2003.

JIN, Ying Hua et al. Caspase 3-mediated cleavage of p21 WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 39, p. 30256-30263, 2000.

JOHNSON, Treat B.; COGHILL, Robert D. Researches on pyrimidines. C111. The discovery of 5-methyl-cytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 47, n. 11, p. 2838-2844, 1925.

JU, Zhenyu; CHOUDHURY, Aaheli Roy; RUDOLPH, K. Lenhard. A dual role of p21 in stem cell aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, n. 1, p. 333-344, 2007.

JUNG, Peter; HERMEKING, Heiko. The c-MYC-AP4-p21 cascade. **Cell cycle**, v. 8, n. 7, p. 982-989, 2009.

KACEM, Slim; FEIL, Robert. Chromatin mechanisms in genomic imprinting. **Mammalian genome**, v. 20, n. 9-10, p. 544-556, 2009.

KIM, Eun Mi et al. The p53/p21 complex regulates cancer cell invasion and apoptosis by targeting Bcl-2 family proteins. **Cancer Research**, v. 77, n. 11, p. 3092-3100, 2017.

KIM, Hyun-Woo et al. Differential and correlated expressions of p16/p21/p27/p38 in mammary gland tumors of aged dogs. **Journal of veterinary science**, v. 18, n. 4, p. 479-485, 2017.

KIM, Jongdoo et al. Cooperative actions of p21 WAF 1 and p53 induce Slug protein degradation and suppress cell invasion. **EMBO reports**, p. e201438587, 2014.

KLOPFLEISCH, R. et al. The metastatic cascade is reflected in the transcriptome of metastatic canine mammary carcinomas. *The Veterinary Journal*, v. 190, n. 2, p. 236-243, 2011.

KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. *Research in veterinary science*, v. 87, n. 1, p. 91-96, 2009.

KLOSE, Patricia et al. Is there a malignant progression associated with a linear change in protein expression levels from normal canine mammary gland to metastatic mammary tumors?. *Journal of proteome research*, v. 10, n. 10, p. 4405-4415, 2011.

KOENIG, A. et al. Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Veterinary pathology*, v. 39, n. 4, p. 458-472, 2002.

KRESO, Antonija; DICK, John E. Evolution of the cancer stem cell model. **Cell stem cell**, v. 14, n. 3, p. 275-291, 2014.

LENG, Xiaohong et al. Reversal of growth suppression by p107 via direct phosphorylation by cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 7, p. 2242-2254, 2002.

LEVITT, Nicola C.; HICKSON, Ian D. Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. **Trends in molecular medicine**, v. 8, n. 4, p. 179-186, 2002.

LI, Long-Cheng; DAHIYA, Rajvir. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v. 18, n. 11, p. 1427-1431, 2002.

LIAO, Xing-Hua et al. Estrogen receptor α mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway. *The FEBS journal*, v. 281, n. 3, p. 927-942, 2014.

LISTER, Ryan et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **nature**, v. 462, n. 7271, p. 315-322, 2009.

LIU, Manran et al. p21CIP1 attenuates Ras-and c-Myc-dependent breast tumor epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like gene expression in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 45, p. 19035-19039, 2009.

LU, Hao et al. HSP27 knockdown increases cytoplasmic p21 and cisplatin sensitivity in ovarian carcinoma cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, v. 23, n. 3, p. 119-128, 2016.

LUCA, Maria De; LAVIA, Patrizia; GUARGUAGLINI, Giulia. A functional interplay between Aurora-A, Plk1 and TPX2 at spindle poles: Plk1 controls centrosomal localization of Aurora-A and TPX2 spindle association. **Cell Cycle**, v. 5, n. 3, p. 296-303, 2006.

MARINELLI, Lieta et al. Mammary steroid metabolizing enzymes in relation to hyperplasia and tumorigenesis in the dog. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 92, n. 3, p. 167-173, 2004.

MARQUÉS-TORREJÓN, M. Ángeles et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression. **Cell stem cell**, v. 12, n. 1, p. 88-100, 2013.

MARTÍN, Alberto et al. Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27 Kip1 and p21 Cip1. **Cancer cell**, v. 7, n. 6, p. 591-598, 2005.

MARUSYK, Andriy; ALMENDRO, Vanessa; POLYAK, Kornelia. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 5, p. 323-334, 2012.

MASGRAS, Ionica et al. Reactive oxygen species and mitochondrial sensitivity to oxidative stress determine induction of cancer cell death by p21. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 13, p. 9845-9854, 2012.

MAURO, Maurizio et al. p21 promotes error-free replication-coupled DNA double-strand break repair. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 17, p. 8348-8360, 2012.

MENG, Huan et al. DNA methylation, its mediators and genome integrity. **International journal of biological sciences**, v. 11, n. 5, p. 604, 2015.

NICOLAY, Brandon N. et al. Proteomic analysis of pRb loss highlights a signature of decreased mitochondrial oxidative phosphorylation. **Genes & development**, v. 29, n. 17, p. 1875-1889, 2015.

NORBURY, Chris; NURSE, Paul. Animal cell cycles and their control. **Annual review of biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 441-468, 1992.

OLIVEIRA, Táya F. et al. TP53 gene expression levels and tumor aggressiveness in canine mammary carcinomas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 29, n. 6, p. 865-868, 2017.

OTTO, Tobias; SICINSKI, Piotr. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93-115, 2017.

PELLIKAINEN, M. J. et al. p21WAF1 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis. **Journal of clinical pathology**, v. 56, n. 3, p. 214-220, 2003.

PASSOS, Joao F. et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. **Molecular systems biology**, v. 6, n. 1, p. 347, 2010.

PORLAN, Eva et al. Transcriptional repression of Bmp2 by p21Waf1/Cip1 links quiescence to neural stem cell maintenance. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 1567-1575, 2013.

PORTELA, Anna; ESTELLER, Manel. Epigenetic modifications and human disease. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057-1068, 2010.

PROSCHOWSKY, Helle Friis; RUGBJERG, Helene; ERSBOLL, Annette Kjær. Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. **Preventive veterinary medicine**, v. 58, n. 1, p. 63-74, 2003.

PROSPERI, Ennio; SCOVASSI, A. Ivana. Dynamic interaction between PARP-1, PCNA and p21waf1/cip1. In: **Poly (ADP-ribosyl) ation**. Springer US, 2006. p. 67-74.

QIAN, Yingjuan; CHEN, Xinbin. Senescence regulation by the p53 protein family. **Cell Senescence: Methods and Protocols**, p. 37-61, 2013.

QUEIROGA, F. L. et al. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 94, n. 1, p. 181-187, 2005.

RADPOUR, Ramin et al. Correlation of telomere length shortening with promoter methylation profile of p16/Rb and p53/p21 pathways in breast cancer. **Modern pathology**, v. 23, n. 5, p. 763, 2010.

RAO, N. A. et al. Gene expression profiles of progestin-induced canine mammary hyperplasia and spontaneous mammary tumors. *J Physiol Pharmacol*, v. 60, n. Suppl 1, p. 73-84, 2009.

RAO, N. A. S. et al. cDNA microarray profiles of canine mammary tumour cell lines reveal deregulated pathways pertaining to their phenotype. *Animal genetics*, v. 39, n. 4, p. 333-345, 2008.

ROMANOV, V. S.; POSPELOV, V. A.; POSPELOVA, T. V. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21Waf1: Contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. **Biochemistry (Moscow)**, v. 77, n. 6, p. 575-584, 2012.

RONINSON, Igor B. Oncogenic functions of tumour suppressor p21 Waf1/Cip1/Sdi1: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. **Cancer letters**, v. 179, n. 1, p. 1-14, 2002.

ROUSSEAU, Denis et al. Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene*, v. 18, n. 30, p. 4313, 1999.

SADASIVAM, Subhashini; DECAPRIO, James A. The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 8, p. 585-595, 2013.

SANTAMARÍA, David et al. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. **Nature**, v. 448, n. 7155, p. 811-815, 2007.

SATYANARAYANA, Ande; HILTON, Mary Beth; KALDIS, Philipp. p21 Inhibits Cdk1 in the absence of Cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint. **Molecular biology of the cell**, v. 19, n. 1, p. 65-77, 2008.

SEOANE, Joan; LE, Hong-Van; MASSAGUE, Joan. Myc suppression of the p21Cip1 Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. **Nature**, v. 419, n. 6908, p. 729-734, 2002.

SHERR, Charles J.; BARTEK, Jiri. *Cell Cycle—Targeted Cancer Therapies*. 2017.

SHERR, Charles J.; ROBERTS, James M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. **Genes & development**, v. 18, n. 22, p. 2699-2711, 2004.

SHIBATA, A.; JEGGO, P. A. DNA double-strand break repair in a cellular context. **Clinical oncology**, v. 26, n. 5, p. 243-249, 2014.

SONNENSCHN, Elizabeth G. et al. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. **American journal of epidemiology**, v. 133, n. 7, p. 694-703, 1991.

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

SORIA, Gastón; GOTTIFREDI, Vanesa. PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: The exception that confirms the rule?. **DNA repair**, v. 9, n. 4, p. 358-364, 2010.

SPENCER, Sabrina L. et al. The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. **Cell**, v. 155, n. 2, p. 369-383, 2013.

STAALESEN, Vidar et al. Genetic and epigenetic changes in p21 and p21B do not correlate with resistance to doxorubicin or mitomycin and 5-fluorouracil in locally advanced breast cancer. **Clinical cancer research**, v. 10, n. 10, p. 3438-3443, 2004.

STRICKER, Stefan H.; KÖFERLE, Anna; BECK, Stephan. From profiles to function in epigenomics. **Nature Reviews Genetics**, 2016.

SUETAKE, Isao et al. The Molecular Basis of DNA Methylation. In: **DNA and Histone Methylation as Cancer Targets**. Humana Press, Cham, 2017. p. 19-51.

SUZUKI, Atsushi et al. Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. **Oncogene**, v. 18, n. 5, p. 1239-1244, 1999.

TABY, Rodolphe; ISSA, Jean-Pierre J. Cancer epigenetics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 60, n. 6, p. 376-392, 2010.

TAMURA, Dai et al. Celecoxib exerts antitumor effects in canine mammary tumor cells via COX 2 independent mechanisms. *International journal of oncology*, v. 46, n. 3, p. 1393-1404, 2015.

TAYLOR, William R.; STARK, George R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v. 20, n. 15, p. 1803, 2001.

TILLHON, Micol et al. p21CDKN1A and DNA repair systems: recent findings and future perspectives. In: **New Research Directions in DNA Repair**. InTech, 2013.

TILLHON, Micol et al. p300/CBP acetyl transferases interact with and acetylate the nucleotide excision repair factor XPG. **DNA repair**, v. 11, n. 10, p. 844-852, 2012.

TOM, Samson et al. Regulatory roles of p21 and apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 in base excision repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 52, p. 48781-48789, 2001.

TONG, Jinjin et al. Serum starvation and thymidine double blocking achieved efficient cell cycle synchronization and altered the expression of p27, p53, bcl-2 in canine breast cancer cells. **Research in veterinary science**, v. 105, p. 10-14, 2016.

VÁVROVÁ, J.; REZACOVA, M. The importance of senescence in ionizing radiation-induced tumour suppression. **Folia biologica**, v. 57, n. 2, p. 41, 2011.

VIGNA, Alexandra Souza. Avaliação do papel da proteína ATR na indução de autofagia e senescência por temozolomida em células de glioblastoma. 2017.

VOGELSTEIN, Bert; KINZLER, Kenneth W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature medicine**, v. 10, n. 8, p. 789-799, 2004.

WADDINGTON, Conrad Hal et al. The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. With an appendix by H. Kacser. **The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. With an appendix by H. Kacser.**, 1957.

WANG, Yuefeng et al. Intrinsic disorder mediates the diverse regulatory functions of the Cdk inhibitor p21. **Nature chemical biology**, v. 7, n. 4, p. 214-221, 2011.

WANG, Ya-Wen et al. HPV Status and Its Correlation with BCL2, p21, p53, Rb, and Survivin Expression in Breast Cancer in a Chinese Population. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

WARD, Laura Sterian et al. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2002.

WARFEL, Noel A.; EL-DEIRY, Wafik S. p21WAF1 and tumourigenesis: 20 years after. **Current opinion in oncology**, v. 25, n. 1, p. 52-58, 2013.

WATANABE, Nobumoto; BROOME, M.; HUNTER, T. Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. **The EMBO journal**, v. 14, n. 9, p. 1878, 1995.

WEI, Chang-Yuan et al. Expression of CDKN1A/p21 and TGFBR2 in breast cancer and their prognostic significance. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 11, p. 14619, 2015.

WERNIG, Marius et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. **nature**, v. 448, n. 7151, p. 318-324, 2007.

YANG, Wenjun et al. Polymorphisms in the 5' upstream regulatory region of p21WAF1/CIP1 and susceptibility to oesophageal squamous cell carcinoma. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

YEELES, Joseph TP et al. Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. **Nature**, v. 519, n. 7544, p. 431-435, 2015.

YOON, Mi-Kyung et al. Cell cycle regulation by the intrinsically disordered proteins p21 and p27. 2012.

YOSHIKAWA, Yasunaga et al. Reduced canine BRCA2 expression levels in mammary gland tumors. **BMC veterinary research**, v. 11, n. 1, p. 159, 2015.

YOSHIMURA, Shusaku et al. UBE2S associated with OSCC proliferation by promotion of P21 degradation via the ubiquitin-proteasome system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 485, n. 4, p. 820-825, 2017.

ZARZYNSKA, Joanna Magdalena. The Role of Stem Cells in Breast Cancer. In: **Breast Cancer-From Biology to Medicine**. InTech, 2017.

ZHANG, Jin et al. Establishment of a dog model for the p53 family pathway and identification of a novel isoform of p21 cyclin-dependent kinase inhibitor. **Molecular Cancer Research**, v. 7, n. 1, p. 67-78, 2009.

ZHANG, Yongke; FUJITA, Naoya; TSURUO, Takashi. Caspase-mediated cleavage of p21 Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. **Oncogene**, v. 18, n. 5, 1999.

ZOHNY, Samir F. et al. The KIP/CIP family members p21^{Waf1/Cip1} and p57^{Kip2} as diagnostic markers for breast cancer. **Cancer Biomarkers**, v. 18, n. 4, p. 413-423, 2017.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1

Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTI- MENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Universidade Federal do Pará e 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 Profª. 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:

9.2 ANEXO 2

Aprovação do comitê de ética


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

ATESTADO

Protocolo 001/2013 (CEUA) – 23084.000265/2013-53 (UFRA)

Título do Projeto/Plano de Aulas: **Análises moleculares em tumores caninos.**

Docente/Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Bárbara Borges
Instituição: UFRA
Data do Parecer: 18 de fevereiro de 2013.

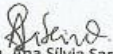
PARECER

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRA apreciou o protocolo acima e verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794/2008, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do COBEA. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

Liberado para o início da pesquisa, sendo obrigatório a entrega nesta CEUA do relatório semestral e de conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no Projeto.

Belém, 08 de março de 2013.


Profa. Dra. Ana Silvia Sardinha Ribeiro
Coordenadora CEUA/UFRA

 **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA**
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
Av. Tancredo Neves, nº 2501, Bairro Montese, Belém – PA. CEP: 66.077-901
Contatos: (11)3210-5165 ceua@ufra.edu.br www.comissao.ufra.edu.br/ceua