



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

PERFIL DE EXPRESSÃO E DE METILAÇÃO DE GENES DOS COMPLEXOS
POLYCOMB 1 E 2 EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

FRANCISCO CANINDÉ FERREIRA DE LUNA

BELÉM - PA

2017

FRANCISCO CANINDÉ FERREIRA DE LUNA

**PERFIL DE EXPRESSÃO E DE METILAÇÃO DE GENES DOS COMPLEXOS
POLYCOMB 1 E 2 EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociência e Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges (UFPA)

BELÉM - PA

Fevereiro – 2017

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Luna, Francisco Canindé Ferreira de

Perfil de expressão e de metilação de genes dos complexos polycomb 1 e 2 em tumores mamários caninos / Francisco Canindé Ferreira de Luna; Orientadora, Bárbara do Nascimento Borges. - 2017.

60 f.: il.

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2017.

1. Epigenética. 2. Tumores em animais. 3. Cão - doenças. I. Borges, Bárbara do Nascimento, orientadora. II. Título.

CDD – 22 ed. 572.865

FRANCISCO CANINDÉ FERREIRA DE LUNA

**PERFIL DE EXPRESSÃO E DE METILAÇÃO DE GENES DOS COMPLEXOS
POLYCOMB 1 E 2 EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociência e Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges (UFPA)

Dissertação aprovada em 16 de Fevereiro de 2017

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Matos Carvalho Bastos

Prof. Dr. Rommel Mario Rodrigues Burbano

BELÉM - PA

Fevereiro – 2017

Dedico esta dissertação aos meus familiares por me mostrarem o
sentido real de união e pelo constante incentivo.

Agradecimentos

Sou grato a DEUS por me abençoar com uma bela família, pois, sem o amor, carinho e todo o apoio que sempre me deram ao longo dos anos, possivelmente não estaria aqui, e por ter amigos inesquecíveis.

Aos meus pais Francisco Canindé Nunes de Luna e Jovenila Ferreira de Luna, que sempre me deram liberdade para escolher o meu caminho, simultaneamente, mostraram-me bem cedo que essa liberdade tinha que acarretar em responsabilidade, por esta razão tenho orgulho deles. A minha irmã Pricila Ferreira de Luna, pessoa a qual amo demais nessa vida, aos meus primos-irmãos: Daniel, Artur e Gabriel, pela convivência e pela verdadeira amizade fraterna. Aos meus tios e padrinhos Pery Soares e Onedina Soares, pelos conselhos, e por demonstrarem total afeto a mim e minha irmã.

A orientadora Profª Drª. Bárbara do Nascimento Borges, pelo exemplo de profissionalismo, dedicação, paciência e conselhos. A Profª Drª Lúcia Harada pela oportunidade de ingresso ao LABIOMOL nos tempos da graduação e pela orientação durante os anos de iniciação científica. Agradeço aos membros do LABIOMOL (LOHC), em especial: ao grande amigo Wallax Augusto, com quem tive muito a aprender, ao Danilo pinheiro por estar sempre disposto a ajudar, a Thamirys Faro por seu bom humor tornando o ambiente muito mais agradável, a Raíssa Melo por sua simplicidade e ao Carlos Costa com seu jeito sempre tranquilo.

As pessoas que tive o prazer de conhecer ao ingressar na pós graduação e com o passar do tempo também chamá-los de amigos, Camila Rodrigues, Gabriel Cardoso, Maurício Ferreira e Nayara Oliveira. Aos amigos Marcelo Moraes, Michele Braga, Milena Moraes e Carol Santiago pelo companheirismo nos dias de ida aos jogos do Remo. Aos com quem pude presenciar e conhecer diversas histórias de vida me tornando uma pessoa muito melhor, uns desde de a graduação, outros de longas datas, em especial aos amigos e amigas: Alexandre Freire, Célio Bruno, Josyane Barros, Michelli Staudt, Luis Paulo, Luana Leão, Jamille Veiga, Rosi Serrão, André Sá, Raimundo Pacheco e aos amigos da xérox do ICB, Rael e André.

Ao meu grande amor Nayara Lima, por honrar os significados das palavras companheirismo, amizade e respeito.

“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, a dedicação, não existe meio termo; ou se faz uma coisa bem feita ou não se faz”. Ayrton Senna

Resumo

O complexo Polycomb (PcG) é constituído por fatores multiproteicos que medeiam a repressão de diversos genes no organismo. As proteínas PcG são divididas em dois complexos distintos, PRC1 e PRC2, sendo que PRC1 tem atividade ligase E3, catalisando a mono-ubiquitinação da histona H2A nos resíduos de lisina na posição 119 (H2AK119ub), enquanto PRC2 tem atividade metiltransferase, mediando a mono, di, e trimetilação na histona H3 nos resíduos de lisina na posição 27 (H3K27me_{2/3}). Sabe-se que PRC1 é subdividido em complexos não canônicos e canônicos, sendo este último composto por proteínas CBX (CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 ou CBX8). Já PRC2, compreende três proteínas centrais: SUZ12, EED e EZH1 ou EZH2, que é a proteína metiltransferase responsável por conferir a principal atividade enzimática ao complexo PRC2. Sabe-se que a desregulação das proteínas PcG pode alterar vias relacionadas ao desenvolvimento, ocasionando um aumento desordenado de proliferação celular, inibição da apoptose, e aumento das células tumorais. Dentre os tumores com alteração na expressão de PcG, estão os tumores mamários. Em caninos, este tipo de tumor é a neoplasia mais frequente em cadelas. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o padrão de metilação e expressão dos genes *CBX2* e *CBX7* (PRC1), e *EED*, *EZH2* e *SUZ12* (PRC2) em tumores de mama em cadelas do estado do Pará. Para isso, foram avaliadas 83 amostras de tecido neoplásico e não-neoplásico, provenientes de 40 animais, coletadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia. Para a análise do padrão de metilação, as amostras foram convertidas por ação do bissulfito de sódio e submetidas à técnica de *Bissulfite sequence* PCR para detecção das possíveis áreas metiladas. Para a análise da expressão de RNA, foi feita a conversão a cDNA e posterior quantificação dos transcritos usando a detecção por sonda *Taqman*. A emissão da fluorescência foi captada com o auxílio do *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System*. As análises estatísticas foram realizadas pelos testes *Kruskal-Wallis* e *Teste T Mann Whitnae*, para avaliar as associações dos padrões de metilação com os níveis de expressão, e destes com progressão tumoral e demais características clinicopatológicas, sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

Palavras-chave: PcG, Epigenética, Tumor de mama, Cães

Abstract

The Polycomb complex (PcG) consists of multiprotein factors that mediate the repression of various genes in the body. PcG proteins are divided into two distinct complexes, PRC1 and PRC2, with PRC1 having E3 ligase activity, catalyzing the mono-ubiquitination of histone H2A at lysine residues at position 119 (H2AK119ub), while PRC2 has methyltransferase activity, mediating mono, di, and trimethylation on histone H3 at lysine residues at position 27 (H3K27me₂ / 3). It is known that PRC1 is subdivided into non-canonical and canonical complexes, the latter being composed of CBX proteins (CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 or CBX8). Already PRC2, it comprises three central proteins: SUZ12, EED and EZH1 or EZH2, which is the methyltransferase protein responsible for conferring the main enzymatic activity to the PRC2 complex. It is known that deregulation of PcG proteins may alter developmental pathways, causing a disordered increase in cell proliferation, inhibition of apoptosis, and increase of tumor cells. Among the tumors with altered expression of PcG are mammary tumors. In canines, this type of tumor is the most frequent neoplasm in bitches. Thus, the objective of this study was to evaluate the methylation and expression pattern of the CBX2 and CBX7 (PRC1), and EED, EZH2 and SUZ12 (PRC2) genes in breast tumors in dogs from the state of Pará. Samples of neoplastic and non-neoplastic tissue from 40 animals collected at the Veterinary Hospital of the Federal Rural University of Amazônia. For the analysis of the methylation pattern, the samples were converted by sodium bisulfite and submitted to the Bisulfite sequence PCR technique to detect possible methylated areas. For analysis of RNA expression, cDNA conversion and subsequent quantification of transcripts were performed using Taqman probe detection. Fluorescence emission was captured with the aid of the ABI PRISM 7500 Sequence Detection System. Statistical analyzes were performed using the Kruskal-Wallis test and the Mann Whitnae test to evaluate the associations of methylation patterns with expression levels, and those with tumor progression and other clinicopathological characteristics. The results were considered significant when $p < 0,05$.

Keywords: PcG, Epigenetics, Breast tumor, Dogs

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Paisagem epigenética..... | 1 |
| Figura 2: Organização do genoma em mamíferos..... | 3 |
| Figura 3: Padrões de Metilação..... | 5 |
| Figura 4: Metilação do DNA..... | 6 |
| Figura 5: Complexo Repressivo Polycomb 1 (PRC1)..... | 8 |
| Figura 6: Complexo repressivo Polycomb 2 (PRC2)..... | 10 |
| Figura 7: Papel funcional de EZH2 em receptores superexpressos e receptores regulados negativamente em células cancerosas no câncer de mama..... | 12 |
| Figura 8: Modelo hierárquico de recrutamento do complexo polycomb..... | 13 |
| Figura 9: Modelo de recrutamento alternativo. | 14 |
| Figura 10: Diagrama indicando o padrão de metilação por sítio CpG do fragmento analisado do gene <i>CBX2</i> | 25 |
| Figura 11: Análise da metilação da região promotora do gene <i>CBX2</i> | 27 |
| Figura 12: Diagrama indicando o padrão de metilação por sítio CpG do fragmento analisado do gene <i>CBX7</i> | 28 |
| Figura 13: Análise da metilação da região promotora do gene <i>CBX7</i> | 30 |
| Figura 14: Alinhamento no Bioedit evidenciando duas alterações de base no último sítio CpG..... | 31 |
| Figura 15: Eletroferograma evidenciando as alterações observadas na porção final do fragmento analisado de <i>CBX7</i> | 31 |
| Figura 16: Diagrama indicando o padrão de metilação por sítio CpG do fragmento analisado do gene <i>EED</i> | 32 |
| Figura 17: Análise da metilação da região promotora do gene <i>EED</i> | 34 |
| Figura 18: Diagrama indicando o padrão de metilação por sítio CpG do fragmento analisado do gene <i>EZH2</i> | 35 |
| Figura 19: Análise da metilação da região promotora do gene <i>EZH2</i> | 38 |

| | |
|--|----|
| Figura 20: Expressão relativa de RNA mensageiro de <i>CBX2</i> em amostras normais e tumorais..... | 39 |
| Figura 21: Expressão relativa de RNA mensageiro de <i>CBX2</i> em amostras normais e tumorais, subdivididas de acordo com o tipo histológico..... | 40 |
| Figura 22: Expressão relativa de RNA mensageiro de <i>EZH2</i> em amostras normais e tumorais..... | 41 |
| Figura 23: Expressão relativa de RNA mensageiro de <i>EZH2</i> em amostras normais e tumorais, subdivididas de acordo com o tipo histológico..... | 41 |

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais modificações epigenéticas seguidas do alvo/local e função na expressão gênica.....2

Tabela 2: Iniciadores utilizados no presente trabalho.....20

Tabela 3: Amostras analisadas para metilação e expressão.....23

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 EPIGENÉTICA..... | 1 |
| 1.2 METILAÇÃO DO DNA E CÂNCER..... | 4 |
| 1.3 GRUPOS POLYCOMB..... | 7 |
| 1.4 AS PROTEÍNAS DO COMPLEXO POLYCOMB NA ONCOGÊNESE..... | 15 |
| 1.5 CÂNCER DE MAMA CANINO..... | 16 |
| 2. OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 18 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 18 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 3.1 COLETA DAS AMOSTRAS..... | 19 |
| 3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS..... | 19 |
| 3.2.1 Extração e Quantificação do DNA genômico..... | 19 |
| 3.2.2 Análise do Padrão de Metilação..... | 19 |
| 3.2.3 Sequenciamento e Critérios de Análise do perfil de Metilação..... | 20 |
| 3.2.4 Análise da Expressão gênica..... | 20 |
| 3.2.5 Análise estatística..... | 21 |
| 4. RESULTADOS | 22 |
| 4.1 Caracterização da População..... | 22 |
| 4.2 Padrão de metilação dos genes-alvo..... | 25 |
| 4.2.1 Metilação em <i>CBX2</i> | 25 |
| 4.2.2 Metilação em <i>CBX7</i> | 28 |
| 4.2.3 Metilação em <i>EED</i> | 32 |
| 4.2.4 Metilação em <i>EZH2</i> | 35 |
| 4.3 PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES <i>CBX2</i> 2 <i>EZH2</i> | 39 |
| 4.3.1 Expressão de <i>CBX2</i> | 39 |
| 4.3.2 Expressão de <i>EZH2</i> | 40 |
| 5. DISCUSSÃO | 42 |
| 6. CONCLUSÃO | 46 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 47 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIGENÉTICA

Em 1940, o biólogo britânico Conrad Waddington, propôs um modelo metafórico, chamado “paisagem epigenética”, para os diferentes fenótipos de tórax e asas que começaram a ser expressos por *Drosophila melanogaster* em resposta a estímulos externos (temperatura), e que após algumas gerações continuavam a se perpetuar mesmo sem receber os estímulos de outrora. Este modelo propunha que os genes são capazes de moldar o processo de diferenciação embrionária de cada organismo, e que a influência desses fatores externos afeta a atividade dos mesmos (Figura 1) (Rajagopal & Stanger, 2016; Noble, 2015). Emergia assim, o conceito da Epigenética, definido como estudo da expressão gênica relacionada às características ou modificações herdáveis e reversíveis através de divisões celulares sem alterar a sequência de DNA (Lee *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2013).

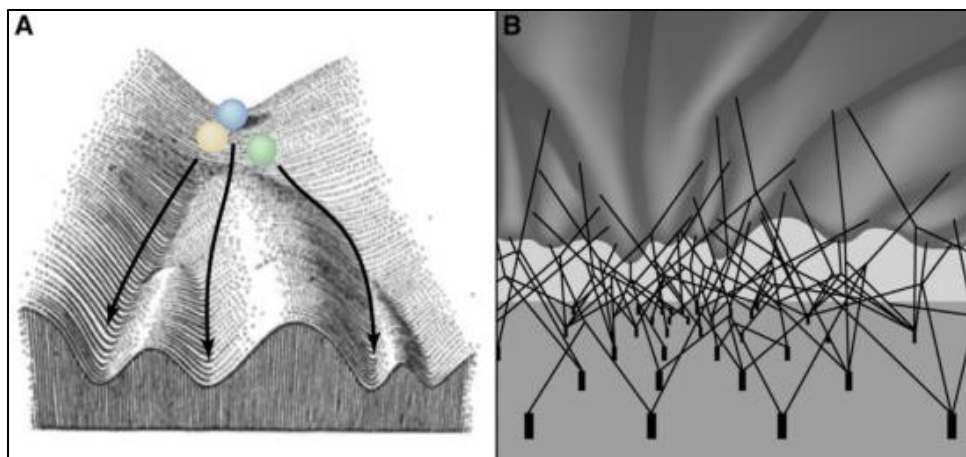


Figura 1. Paisagem epigenética. A- A superfície da paisagem epigenética. Processo de diferenciação celular onde as bolas representam as células embrionárias, que seguem por vários caminhos representados como vales até se tornar um tipo de célula específica. B- Os pinos (cavilhas) representam os genes e os fios representam a saída de sinalização dos genes (expressão) moldando assim a paisagem epigenética acima (Adaptado de Rajagopal & Stanger, 2016).

Todas as células que compõem um organismo contêm o mesmo genoma, ou seja, apresentam a mesma informação genética, mas apesar disto seus genes não são expressos simultaneamente por todos os tipos de células e nem o tempo todo. O padrão de expressão diferencial dos genes depende da função que será exercida pela célula, sendo os mecanismos epigenéticos capazes de intermediar o perfil de expressão dos genes em células e em tecidos multicelulares (Moore *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2015).

A regulação epigenética da expressão de genes ocorre por modificações pós-traducionais de proteínas (histonas), modificação química no DNA e posicionamento do nucleossomo, que, em conjunto, são capazes de determinar a acessibilidade de fatores de transcrição (Spruijt & Vermeulen, 2014; Portela *et al.*, 2010). Os RNAs não codificantes (ncRNA) através da interação com proteínas, complexos modificadores de histonas, ou com DNA metiltransferase, são capazes de modular a expressão gênica silenciando ou ativando genes alvos (Prete *et al.*, 2015; Peschansky & Wahlestedt 2014; Lee *et al.*, 2015).

As principais modificações epigenéticas são: metilação do DNA; e Acetilação, ADP-ribosilação, metilação, fosforilação, sumoilação e ubiquitinação das histonas (Tessarz *et al.*, 2014; Cadet *et al.*, 2016) (Tabela 1). Estas modificações não influenciam apenas a estrutura da cromatina, mas também são reconhecidas por proteínas adaptadoras específicas que, por sua vez, recrutam complexos proteicos, afetando de forma positiva ou negativa a regulação gênica (Tessarz *et al.*, 2014; Haricumar *et al.*, 2015).

Tabela 1. Principais modificações epigenéticas seguidas do alvo/local e função na expressão gênica (Zakhari *et al.*, 2013; Cadet *et al.*, 2016).

| Modificações Epigenéticas | | |
|---------------------------|--------------------------|--|
| Modificações no DNA | Local | Função |
| Metilação do DNA | Ilhas CpGs | Repressão |
| Modificações na cromatina | Resíduos | Função |
| Acetilação | Lisina | Reparo/ Replicação/ Transcrição |
| Metilação | Lisina | Reparo/ Transcrição |
| Fosforilação | Serina/Treonina | Condensação/ Transcrição |
| Ubiquitinação | Lisina | Reparo/ Transcrição |
| Sumoilação | Lisina | Transcrição |
| ADP-ribosilação | Glutamato/ Lisina | Reparo/ Replicação/ Transcrição |
| ncRNA | Interação | Função |
| Metilação/ Acetilação | Modificadores de histona | Recrutando ou removendo os grupos metil e acetil |
| Metilação | DNA metiltransferase | Repressão |

O genoma eucarionte é empacotado e compactado no núcleo da célula em um complexo macromolecular chamado cromatina, formado por DNA, proteínas histonas e proteínas não histonas. Ao longo de sua estrutura, a fibra de cromatina apresenta o DNA envolvido em unidades repetitivas denominadas nucleossomo, onde cada um apresenta aproximadamente 200 pares de bases, sendo composto por um par de dímeros das respectivas histonas H2A, H2B, H3 e H4, formando assim um núcleo de oito histonas (octâmero) (Harikumar *et al.*, 2015; Aranda *et al.*, 2015; Sparmann & Lohuizen, 2006). A histona H1 é responsável por estabilizar a organização da cromatina e dar suporte as outras histonas do octâmero, isso acontece devido a presença de um domínio curvo presente em H1 que a difere das outras proteínas histônicas portadoras de domínios globulares, este domínio interage diretamente com o DNA atuando como ligante entre os nucleossomos condensando os mesmo, compactando assim a fibra de cromatina (Song *et al.*, 2014; Hilliard & Dahr 2016). Experimentos relacionados a estrutura e interação do genoma descrevem que a cromatina armazenada nos cromossomos apresenta regiões chamadas domínios topologicamente associados (TADs), formados por elementos regulatórios como acentuadores, e que aproximam as regiões promotoras dos genes formando um “loop” na cromatina. Os TADs arquitetam o processo transcricional participando de vários processos fisiológicos como a identidade celular (Figura 2) (Aranda *et al.*, 2015; Williamson *et al.*, 2016; Ong *et al.*, 2014; Sexton *et al.*, 2015).

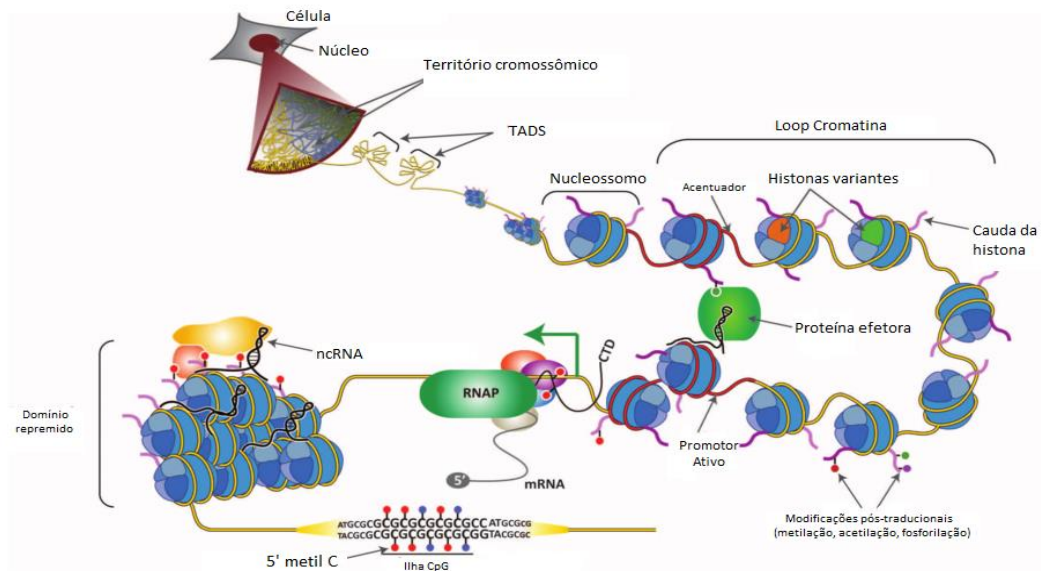


Figura 2. Organização do genoma em mamíferos. Os cromossomos são formados por domínios topologicamente associados (TADS). Os TADS possuem um acervo de elementos indispensáveis para o processo transcricional, sendo muitas das vezes um alvo de certas proteínas (Ex: Polycomb), estando sujeito também a uma variedade de processos epigenéticos. (Adaptado de Aranda *et al.*, 2015).

1.2 METILAÇÃO DO DNA E CÂNCER

A metilação do DNA foi a primeira modificação epigenética a ser descrita. Em 1948, o bioquímico Rollin Hotchkiss, com auxílio da técnica de cromatografia em papel, realizou um experimento com timo de bezerro para analisar a composição das bases do DNA. Foi através deste estudo que Hotchkiss descobriu a metilação nos resíduos de citosina (5-metilcitosina ou 5mC), propondo que esta citosina modificada existia espontaneamente no DNA (Moore *et al.*, 2013).

Esse processo foi, posteriormente, observado tanto em eucariontes, quanto em procariontes, e até o momento foram descritas três tipos de metilação em diferentes nucleotídeos: N6-metiladenina (6mA), N4-metilcitosina (4mC), e 5-metilcitosina (5mC). A 5mC é a modificação epigenética predominante no DNA eucariótico, enquanto que 6mA e 4mC estão restritas a procariontes e certos eucariontes (Ye Fu *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Greer *et al.*, 2015; I. Hernando *et al.*, 2015).

A metilação do DNA desempenha um papel crítico no controle de atividade gênica e arquitetura nuclear, estando envolvida na regulação de vários processos biológicos como: diferenciação celular, embriogênese, inativação do cromossomo X, expressão de microRNAs, supressão de elementos transponíveis e *imprinting genômico* (Portela *et al.*, 2010; I. Hernando *et al.*, 2015; Parry *et al.*, 2011). A metilação do DNA é uma marca epigenética relacionada com o silenciamento gênico, pois afeta a estrutura da cromatina e bloqueia o acesso de fatores de ligação, impedindo assim que haja a expressão gênica. Este padrão pode ser mantido de forma estável ao longo da vida, mas também sofre alterações durante o envelhecimento (Bergman *et al.*, 2013).

Em mamíferos, a metilação do DNA ocorre nas citosinas seguidas de guaninas, formando os chamados dinucleotídeos CpG, que tendem a se formar regiões chamadas Ilhas CpG, regiões com mais de 500 pares de bases e um percentual de GC maior que 50%. Em humanos, cerca de 60% das Ilhas CpG estão localizadas nas regiões promotoras (Ning *et al.*, 2015; Portela *et al.*, 2010).

Normalmente, a transcrição gênica é inibida quando as ilhas CpG estão metiladas (silenciamento gênico), enquanto que as ilhas não metiladas estão acessíveis à maquinaria transcritiva (Miozzo *et al.*, 2015).

A metilação do DNA não ocorre exclusivamente nas ilhas CpGs (Figura 3a). Ela pode ocorrer em diferentes regiões do genoma. O padrão de metilação pode ser observado em regiões chamadas *Shores*, que são localizadas a 2 kb à montante das ilhas CpGs (Figura 3b). A metilação também pode ocorrer no corpo do gene o que impede o início de falsas transcrições (Figura 3c), sendo comum em algumas doenças esta região do gene estar desmetilada, permitindo que a transcrição tenha início em vários locais errôneos de uma maneira desordenada.

A metilação do DNA não exerce seu papel apenas no processo transcricional. Uma fração significativa de CpGs são encontradas metiladas em sequências de elementos repetitivos, preservando a integridade cromossômica, evitando assim a instabilidade, translocação e reativações de sequências de endoparasitas (Figura 3d) (Portela *et al.*, 2010).

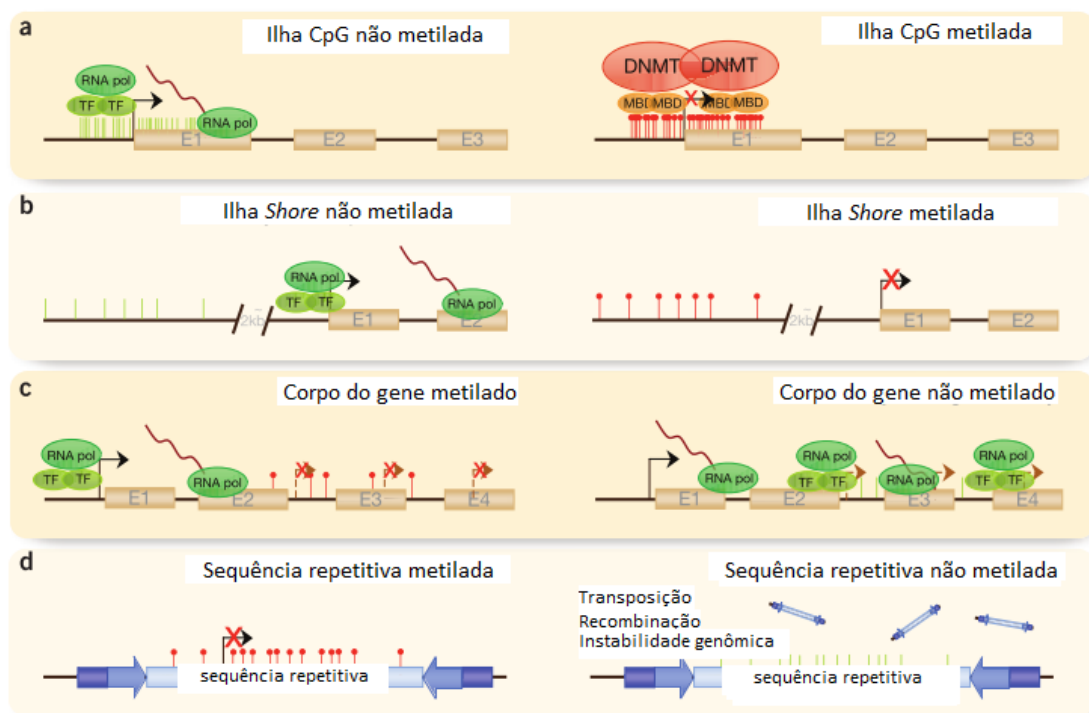


Figura 3. Padrões de Metilação. A metilação do DNA pode ocorrer em várias regiões do genoma: A- Em Ilhas CpGs nas regiões promotoras dos genes; B- Shores; C- corpo do gene; D-sequências repetitivas (Adaptado de Portela *et al.*, 2010).

A metilação do DNA é mediada por uma família de enzimas chamadas de DNA metiltransferases (DNMTs), que catalisam a transferência de um grupo metil doado do cofator enzimático S-adenosil-L- metionina (SAM), para o carbono 5 da citosina nos dinucleotídeos CpGs, resultando assim na 5-metilcitosina (5-mC) (Figura4) (Zakhari,2013; Cadet *et al.*, 2016).

Nos mamíferos, já foram descritas cinco integrantes da família DNMTs: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L, mas apenas DNMT1, DNMT3a e DNMT3b possuem atividade metiltransferase. DNMT1 mantém o padrão de metilação já existente e as DNMT3s transferem grupo metil para citosinas não metiladas (Portela *et al.*, 2010; Miozzo *et al.*, 2015).

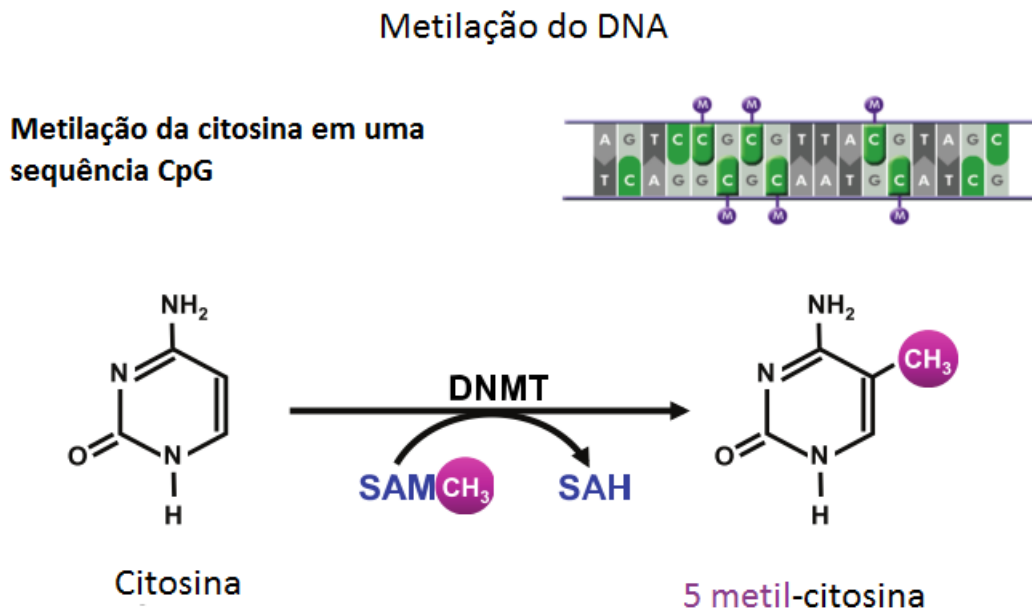


Figura 4. Metilação do DNA. Conversão da citosina em em 5-metil-citosina por ação das DNA metiltransferases (DNMT), após a transferência do grupo de metil doado por S-adenosil-L- metionina (SAM), SAM é convertido em S-adenosil-L-homocisteína (SAH) (Adaptado de Zakhari, 2013).

A hipermetilação das ilhas CpG na região promotora de genes supressores de tumores é um acontecimento inicial em vários tipos de cânceres, geralmente afetando genes com funções relacionadas ao controle do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose e angiogênese (Ning *et al.*, 2015; Caputo *et al.*, 2012; Stefansson *et al.*, 2013). A hipometilação global do genoma também desencadeia a transformação neoplásica, causando uma instabilidade cromossômica que resulta na reativação ou ativação de oncogenes (Zakhari, 2013).

1.3 GRUPOS POLYCOMB

O grupo Polycomb (PcG) é determinado como um subconjunto multiproteico que funciona como regulador do desenvolvimento, garantindo assim, o funcionamento da proliferação e identidade celular. Dentre o grupo de reguladores, os grupos Polycomb (PcG) e Trithorax (TrxG), medeiam respectivamente a repressão e ativação de genes tidos como mestres de controle (Aranda *et al.*, 2015; Pasini & Di Croce, 2016; Kondo *et al.*, 2016; Steffen & Ringrose, 2014).

O complexo PcG foi identificado em *Drosophila melanogaster* por Edward B. Lewis em 1978, e descrito como um repressor transcricional de genes homeóticos (genes *HOX*), os quais são genes envolvidos no processo de desenvolvimento embrionário animal (Schwartz & Pirrota, 2007). A mutação deste complexo em moscas levou a um aumento anormal da expressão dos genes *HOX*, conferindo uma má formação dos segmentos no eixo antero-posterior (Simon *et al.*, 2009; Kondo *et al.*, 2016; Kim & Sung, 2014). Entretanto, Scelfo *et al.*, (2015) analisando o processo transcricional do complexo Polycomb em neoplasias hematológicas, evidenciou que estas exercem a capacidade de manter genes em estado transcricional ativo.

Provas bioquímicas e genéticas mostraram que as proteínas PcG funcionam em dois complexos repressivos distintos, PRC1 e PRC2, e que os mesmos são funcionalmente conservados em invertebrados e vertebrados (Bajusz *et al.*, 2015; Boyer *et al.*, 2006). Ambos os complexos apresentam agrupamentos de proteínas acessórias que são capazes de guiar o recrutamento para locais específicos no DNA. Cada família tem atividade catalítica diferente: PRC1 tem atividade ligase E3, catalisando a mono-ubiquitinação da histona H2A nos resíduos de lisina na posição 119 (H2AK119ub). PRC2 tem atividade metiltransferase, mediando a mono, di, e trimetilação na histona H3 nos resíduos de lisina na posição 27 (H3K27me2/3), sendo reconhecidas como marcas epigenéticas repressivas (Aranda *et al.*, 2015; Pasini *et al.*, 2016).

O complexo repressivo Polycomb 1 (PRC1), tem como componentes centrais uma proteína RING1 (RING1A e RING1B), também conhecido como RNF, e uma proteína PCG *ring finger* (PCGF1-6). RING1A e RING1B exigem interação estável com um dos seis tipos distintos de *ring finger* (PCGF), as quais caracterizam bioquimicamente os diferentes complexos PRC1 (PRC1.1-6).

A capacidade de PRC1 promover ubiquitinação (H2AK119ub) como mencionado acima é devido a RING1 apresentar domínios de ação catalítica Ubiquina ligase E3.

O PRC1 é subdividido em complexo repressivo canônico (cPRC1) e complexo repressivo não canônico (ncPRC1) (Figura 5). Essa classificação se baseia na presença de um grupo de proteínas Cromobox (CBX) que reconhecem e se ligam a marca epigenética (H3K27me3) depositada por PRC2, compondo complexo canônico (cPRC1). Enquanto que o complexo repressivo não canônico (ncPRC1) possui a proteína de ligação (RYBP) ou seu homólogo (YAF) (Aranda *et al.*, 2015; Entrevan *et al.*, 2016; Aloia *et al.*, 2013; Poynter *et al.*, 2016).

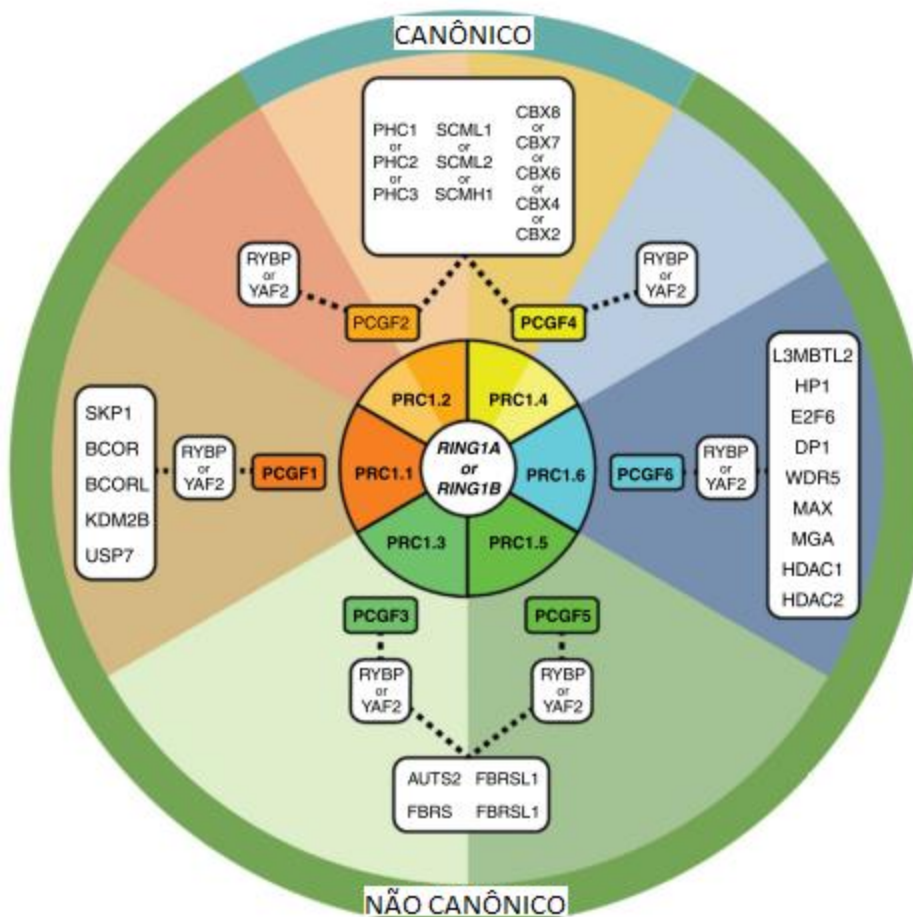


Figura 5. Complexo Repressivo Polycomb 1 (PRC1). Divisão de PRC1 canônica e não canônica (Adaptado Pasini *et al.*, 2016).

Gao *et al.* (2012) classificaram PRC1 em seis grupos diferentes (PRC1.1-6). Assim, de acordo com esta classificação, os complexos PRC1 canônicos (PRC1.2 e PRC1.4) contêm associação entre proteínas CBX (CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 ou CBX8), Ring1B, (PCGF4/BMI1) ou (PCGF/Mel-18) e uma proteína homóloga polihomética (HPH1-3) (Kondo *et al.*, 2016). Já os complexos PRC1 não canônicos (ncPRC1), PRC1.1, PRC1.3, PRC1.5, e PRC1.6 possuem a proteína ligação Rybp ou seu homólogo (YAF), Ring1B e suas respectivas PCGF's (Nspc1/PCGF1; PCGF3; PCGF5; e PCGF6/MBLR6) (Aranda *et al.*, 2015; Aloia *et al.*, 2013). Dentre as proteínas CBX citadas, destacam-se CBX2 e CBX7.

O gene *CBX2* (Cromobox 2) é membro do complexo repressivo polycomb 1 (PRC1), sendo componente crítico no processo de repressão transcricional. Em seres humanos, o gene *CBX2* localiza-se no braço longo do cromossomo 17, região 2, banda 5, sub-banda 3 (17q25.3), contendo 7 éxons. A proteína codificada por este gene é a principal integrante da família cromobox que se mantém ligada a cromossomos mitóticos, tendo um papel de destaque no recrutamento de PRC1 (Zhen *et al.*, 2014).

As análises do complexo PRC1 evidenciam que alguns integrantes da família CBX, dentre eles CBX2, estão associados com o processo de desenvolvimento tumoral. No entanto, seu papel específico permanece não caracterizado (Ruddock-D'Cruz *et al.*, 2008; Clermont *et al.*, 2014).

Mudanças no padrão de expressão de *CBX2* o caracterizam como um oncogene. Clermont *et al.* (2014) analisaram 29 tipos tumorais diferentes, e não observando um número alto de mutações pontuais em *CBX2*. Os resultados também demonstraram um recorrente aumento na expressão de *CBX2* relacionada com a metástase e menor sobrevivência em vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama, sugerindo um perfil molecular oncogênico.

O Cromobox 7 (*CBX7*) tem sido relatado como um gene que codifica uma proteína capaz de regular de forma distinta a expressão de genes implicados no desenvolvimento da carcinogênese (Pallante *et al.*, 2014). Além de exercer relevância na transcrição gênica, *CBX7* está envolvido no prolongamento de vida celular, atraso da senescência, auto-renovação e diferenciação de células-tronco na progressão tumoral (Simhadri *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2015).

Em cães, o gene *CBX7* está localizado no cromossomo 10, contendo 6 éxons. Em seres humanos, o gene *CBX7* localiza-se no braço longo do cromossomo 22, na região 1, banda 3, sub-banda 1 (22q13.1), contendo 6 éxons.

O nível de expressão de *CBX7* é baixo para alguns tipos de neoplasias humanas, como câncer de tireoide, pulmão, próstata e mama (Forzati *et al.*, 2012; Hinz *et al.*, 2008), e apesar de alguns estudos relatarem *CBX7* como um supressor tumoral, outros o relatam como oncogene, visto que ele é capaz de prolongar a vida útil de células normais humanas através da regulação negativa do locus supressor tumoral *INK4A/ARF* (Zhang *et al.*, 2010; Gil *et al.*, 2004).

O complexo repressivo polycomb 2 (PRC2), compreende três proteínas como componentes centrais: SUZ12 (Supressor de zeste), que contém um domínio dedo de zinco; Eed (ectoderme embrionário de desenvolvimento), que contém um domínio de repetição WD40 (responsável pela regulação da transcrição) responsável por reconhecer peptídeos trimetilados; e EZH1 ou EZH2 (acentuador homólogo de zeste), proteína metiltransferase responsável por conferir a principal atividade enzimática ao complexo PRC2 (Figura 6). Em mamíferos, os componentes centrais de PRC2 inclui EED, EZH2, SUZ12, e as proteínas de ligação Retinoblastoma RbAP46/48 (também conhecidas como RBBP 7/4) respectivamente (Aloia *et al.*, 2013; Aranda *et al.*, 2015; Entrevan *et al.*, 2016; Pasini *et al.*, 2016; Schwartz & Pirrotta, 2013).

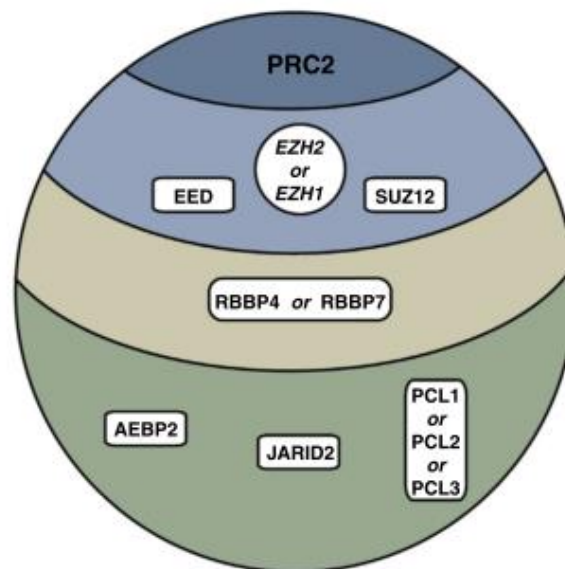


Figura 6. Complexo repressivo Polycomb 2 (PRC2). Subunidades nucleares PRC2 (Eed, Ezh1 ou Ezh2 e Suz12), e sua interação com proteínas adicionais (Adaptado Pasini *et al.*, 2016).

PRC2 está envolvido na diferenciação, manutenção da identidade e proliferação celular e na plasticidade das células-tronco, causando o silenciamento de alguns genes (Wassef & Margueron, 2016; Kuzmichev *et al.*, 2004; Margueron & Reinberg, 2011).

O gene *EED* (Desenvolvimento do ectoderma embrionário), codifica uma proteína integrante do complexo repressivo polycomb 2 (PRC2) e localiza-se, em humanos, no cromossomo 21. Codifica uma proteína (EED) que possui um domínio de repetição WD40 de reconhecimento, o qual em sua extremidade N-terminal, é composto por 40-60 resíduos de aminoácidos, iniciando com um dipeptídeo Gly-His (GH) e terminando com o dipeptídeo Trp-Asp (WD). Esse tipo de domínio é conservado nos eucariontes e está envolvido em vários processos celulares, tais como: regulação transcricional, ciclo celular, transmissão de sinais e apoptose (Han *et al.*, 2007).

A interação entre EED e uma outra proteína de PRC2, a EZH2, também é mediada pelo domínio WD40. Han *et al.* (2007) relatam que o peptídeo de 30 resíduos de EZH2 se liga ao domínio de repetição de WD. Mutações nestes domínios de repetição causam o bloqueio da interação entre as proteínas, apresentando um fenótipo letal em camundongos (Denisenko *et al.*, 1998).

Os níveis de expressão de *EED* estão relacionados com a transição epitélio mesenquimal (EMT) induzidas pelo fator de crescimento TGF- β , pois a célula sofre alterações bioquímicas e moleculares no tecido epitelial, resultando em um fenótipo mesenquimal com capacidade de migração invasiva. Durante a EMT em células tumorais induzidas por TGF- β , os níveis da expressão de *EED* são elevados, contribuindo para a proliferação celular. No entanto, quando *EED* apresenta baixos níveis de expressão (*knockdown*), o passa a desempenhar uma função antagonista a de outrora, inibindo a EMT e alterando o padrão de expressão de alguns genes relacionados com este processo, tais como: E-caderina (*CDH1*), família E-box (*ZEB*), e família *miR-200* (Oktyabri *et al.*, 2014).

O gene *EZH2* (acentuador homólogo de zeste 2) está localizado, em cães, no cromossomo 16 contendo 25 éxons. Em seres humanos este gene está localizado no braço longo do cromossomo sete na região 3; banda 6; sub-banda 1 (7q36.1).

EZH2 é a subunidade de PRC2 que detém atividade catalítica metiltransferase, e é descrito na literatura por silenciar genes supressores de tumor através da trimetilação da lisina na histona 3, que serve como um ponto de ancoragem para a DNA metiltransferase (Deb *et al.*, 2014). No entanto, *EZH2* não consegue desempenhar sua função enzimática estando só. Para que sua função seja desempenhada com eficiência, a mesma requer associação com EED e SUZ12. Desta forma qualquer perturbação pode inibir a atividade e a proliferação celular desordenada dependente de *EZH2* (Tan *et al.*, 2014; Cao & Zhang 2004).

Vários estudos descrevem que a expressão gênica de *EZH2* está correlacionada com o desenvolvimento e progressão de neoplasias, já que enquanto *EZH1* é consideravelmente expresso em tecidos não proliferativos, *EZH2* é envolvido em vários processos celulares como: progressão do ciclo celular, diferenciação celular e apoptose (Christofides *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2014).

Em tumores de mama, *EZH2* pode induzir a expressão de genes dependendo do estado dos receptores hormonais. Quando os receptores de estrogênio ($ER\alpha$) estão superexpressos, *EZH2* funciona como um ativador de transcrição, agindo como um elo de ligação para os receptores ($ER\alpha$), integrantes da via Wnt, e fatores de transcrição nas regiões promotoras dos genes ciclina B1 (*CCNB1*), ciclina D1 (*CCND1*) e *MYC*. *EZH2* também é capaz de se e aumentar a atividade transcricional da RNA polimerase II. Em células com expressão negativa de ($ER\alpha$), *EZH2* forma um complexo com o fator de transcrição NF-kB (Rel A e Rel B), e ativa a transcrição de genes alvos da via NF-kB, tais como: TNF e IL6 (Figura 9) (Deb *et al.*, 2013).

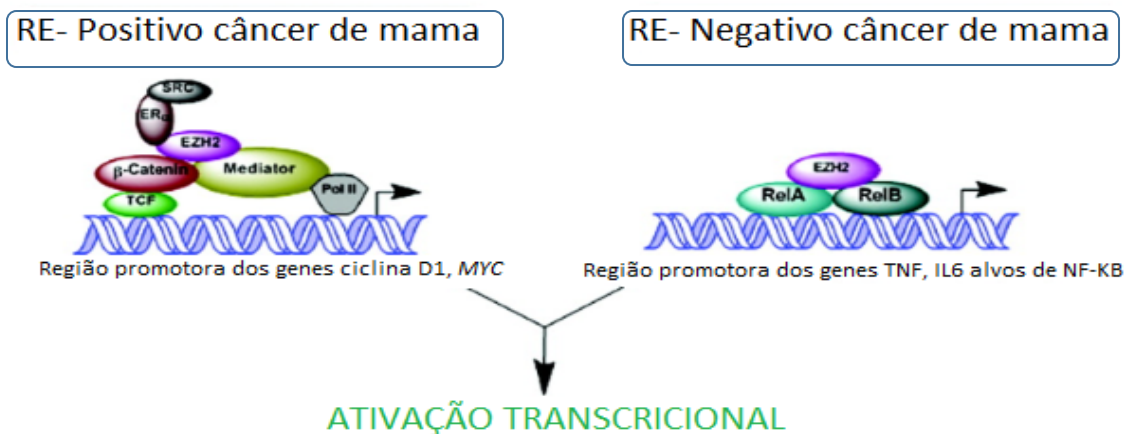


Figura 7. Papel funcional de *EZH2* em receptores superexpressos e receptores regulados negativamente em células cancerosas no câncer de mama (Deb *et al.*, 2013).

Em seres humanos, *EZH2* exerce uma função oncogênica nas neoplasias incluindo o câncer de mama, como já exposto. O primeiro estudo realizado por Choi *et al.* (2016) envolvendo a análise de expressão da proteína *EZH2* em tumores mamários de cães, constatou que *EZH2* é superexpresso neste tumor, da mesma forma que no câncer de mama em seres humanos. Múltiplas proteínas podem se ligar as subunidades principais de PRC2. As proteínas PCL estimulam a atividade metiltransferase de *EZH2*, enquanto que as proteínas de ligação dedo anelar de zinco AEBP2 (acentuador de adipócito 2) são necessárias para promover a estabilidade do complexo. Já a proteína JARID2 (Domínio de interação Jumonji) desempenha um papel catalítico dentro do complexo (Entrevan *et al.*, 2016; Pallante *et al.*, 2015).

Os genes participantes de PRC2 tem assumido uma característica dúbia no estudo do câncer, se apresentando como supressor tumoral ou como oncogene dependendo do tipo de célula (Baude *et al.*, 2014).

Em *Drosophila*, sequências específicas contidas no DNA, conhecidas como elementos de resposta Polycomb (PREs), são responsáveis pelo recrutamento do complexo Polycomb (PCG) até o gene alvo. Este processo acontece por intermédio dos fatores de transcrição dedo de zinco Pleiohomeóticos (PHO) que se ligam a estas sequências específicas (Entrevan *et al.*, 2015; Simon *et al.*, 2009).

Em mamíferos, os mecanismos pelos os quais os complexos Polycomb são recrutados não estão bem elucidados. Um modelo de recrutamento foi proposto baseado nos moldes de *Drosophila*, o qual o fator de transcrição PHO recruta PRC2 através da interação com EZH, sendo assim depositada a marca epigenética (H3K27me3), que é reconhecida pelo cromodomínio da subunidade PC do PRC1, oferecendo um ponto de ancoragem. Isto cria um nível hierárquico funcional do complexo canônico (cPRC-CBX), pois neste recrutamento PRC2 se liga primeiro ao DNA formando H3K27me3, que é então reconhecida pela subunidade CBX do complexo PRC1 canônico, permitindo assim a ligação e ubiquitinação. Tal modelo foi chamado de modelo hierárquico de recrutamento polycomb (Figura 8).

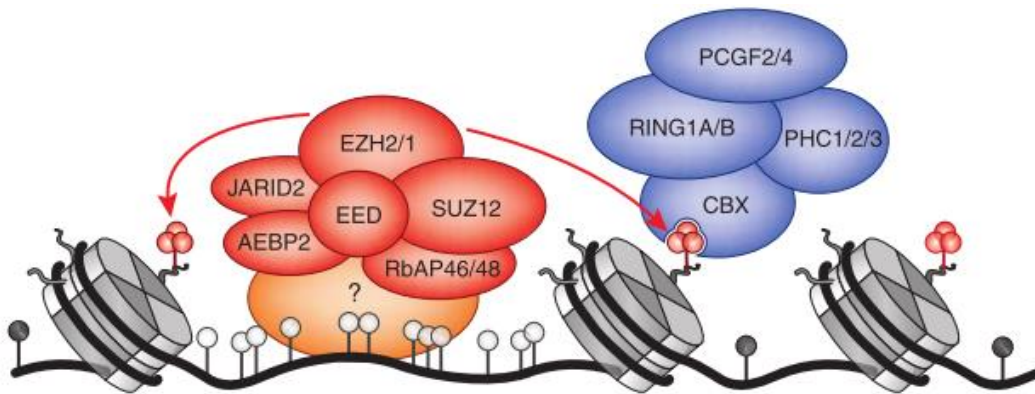


Figura 8. Modelo hierárquico de recrutamento do complexo polycomb. O complexo PRC2 é recrutado para ilhas CpGs através de um mecanismo não totalmente compreendido. É sugerido que este recrutamento é intermediado por proteínas de ligação de DNA. PRC2 então deposita a marca H3K27me3 (vermelho). A subunidade CBX do complexo canônico (cPRC1) se liga a marca H3K27me3 regendo o recrutamento de PRC1 (Adaptado de Comet & Helin, 2014).

Entretanto, algumas considerações colocam este modelo em cheque, pois: a subunidade PC de *Drosophila* tem baixa afinidade por H3K27me3; e também por PRC1 apresentar uma pequena distribuição sobre os elementos de resposta polycomb. Além disso, nos vertebrados essa hierarquia pode ser invertida uma vez que PRC1 catalisa a ubiquitinação promovendo o recrutamento de PRC2 (Entrevan *et al.*, 2016; Blackledge *et al.*, 2015).

Vários mecanismos têm sido propostos para o estudo do recrutamento de PcG na tentativa de compreender a interação destas proteínas junto as seqüências específicas de DNA, ilhas CpGs, modificação de histonas e RNAs não codificantes (ncRNA) (Di Croce *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014.)

O complexo não canônico (ncPRC1-RYBP) não apresenta cromodomínio, e, por isso, sua subunidade RYBP por si só não se liga à Histona 3 trimetilada (H3K27me3). Por outro lado, tal complexo dispõe de proteínas que se ligam em seqüências específicas de DNA (E2F6, KDM2B, etc), sendo atraídos para as ilhas CpGs, e catalisando assim a ubiquitinação da Histona 2A (H2AK119ub1) independentemente da atividade de PRC2. Tal mecanismo é conhecido como modelo alternativo de recrutamento de PRC1 (Figura 9) (Di Croce *et al.*, 2013; Entrevan *et al.*, 2016; Pasini *et al.*, 2016; Blackledge *et al.*, 2015).

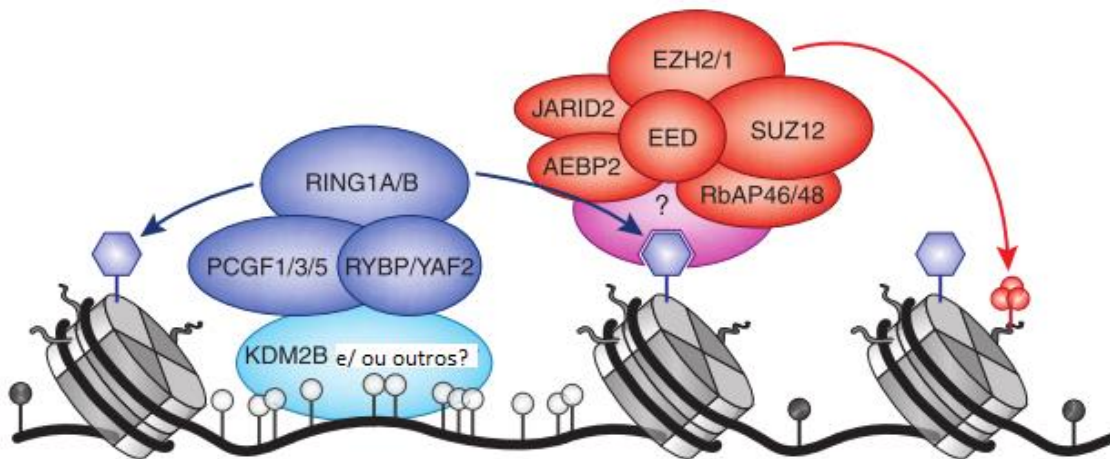


Figura 9. Modelo de recrutamento alternativo. O complexo repressivo não canônico (ncPRC1) é recrutado para as ilhas CpGs por meio da subunidade KDM2B, acontecendo assim a monoubiquitinação (H2AK119ub) e o recrutamento de PRC2 através de um mecanismo desconhecido (Adaptado Comet & Helin, 2014).

O reconhecimento de áreas metiladas por PRC2 é realizado pelo domínio WD40 da subunidade EED. Tal interação recruta PRC2 para as regiões metiladas, além do que outras proteínas integrantes do PRC2, como a família PCL de fatores de transcrição, também são capazes de se ligar a sequências específicas de DNA reconhecendo outras histonas metiladas (H3K36me2 e H3K36me3). As subunidades AEBP2 e JARID também são capazes de dirigir o complexo PRC2 até as ilhas CpGs independente de KDM2B (Di Croce *et al.*, 2013; Entrevan *et al.*, 2016; Blackledge *et al.*, 2015). Além dos fatores de transcrição específicos envolvidos no recrutamento, tem sido sugerido que, nos mamíferos, os RNAs não codificantes tais como HOTAIR e Xist, são capazes de recrutar os complexos PRC1 e PRC2 ao se ligarem aos complexos, guiando-os até os promotores de genes alvos (Wang *et al.*, 2015; Entrevan *et al.*, 2016; Scharwitz *et al.*, 2013; Blackledge *et al.*, 2015; Klose *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014).

1.4 AS PROTEÍNAS DO COMPLEXO POLYCOMB NA ONCOGÊNESE

O desenvolvimento do câncer é, muitas vezes considerado uma desordem exclusivamente genética que tem início mediante a alguns tipos de mutações, estimulando assim alteração na função dos proto oncogenes e dos genes supressores de tumor.

Contudo, a carcinogênese também está relacionada aos eventos epigenéticos, que compreendem a modificação de histonas e padrões aberrantes de metilação no DNA, alterando a expressão gênica sem modificar a sequência de DNA, e levando a progressão do câncer. Sendo assim, as proteínas que regulam processos epigenéticos como as PcG podem ser tidas como um ponto chave no estudo do câncer (Sparmann & Lohuizen, 2006; Wei Wang *et al.*, 2015). O grupo Polycomb está envolvido em diversos processos fisiológicos nas células dos mamíferos, tais como: manutenção da pluripotência; auto-renovação celular; memória celular; controle do desenvolvimento; inativação do cromossomo X; e controle do ciclo celular (L Aloia *et al.*, 2013; A. Scelfo *et al.*, 2015; Casa & Gabellini 2012).

A desregulação das proteínas PcG pode bloquear ou ativar certas vias relacionadas ao desenvolvimento, ocasionando um aumento desordenado de proliferação celular, inibição da apoptose, e aumento das células tumorais. Vários tipos de proteínas PcGs são expressas de forma anormal em tecidos malignos quando comparado o grau de expressão com o tecido normal, sendo consideradas como um biomarcador molecular no diagnóstico e prognóstico do câncer auxiliando, também, em terapias (Wang *et al.*, 2015).

A primeira ligação entre PcG e câncer foi descrita pela caracterização funcional da PCGF-4 (BMI) atuando como um proto-oncogene. BMI reprime o locus inibidor de quinases dependentes de ciclina 2A (*CDKN2A*), o qual codifica as proteínas supressoras de tumores *INK4* e *ARF*, inibindo assim o ciclo celular. Essa repressão tem sido considerada um dos principais eventos no desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Bracken *et al.*, 2007; Bracken & Helin, 2009; Sauvageau M, & Sauvageau G, 2008; Koppens *et al.*, 2015; Abdouh *et al.*, 2016). Além disso, vários membros integrantes de PRC1 (BMI, PCGF1, PCGF-2/MEL, RING, CBX2, CBX7) e PRC2 (EED, SUZ12 e EZH2) foram associados ao processo de desenvolvimento tumoral (Aguilo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015; Gil *et al.*, 2005), incluindo carcinomas mamários (Raaphorst *et al.*, 2003).

1.5 CÂNCER DE MAMA CANINO

O câncer é a causa mais comum de morte em cães, atingindo cerca de 4 milhões de indivíduos por ano. Nos Estados Unidos mais de 1,66 milhões de seres humanos (aproximadamente 500 casos/100 mil) e 4,2 milhões de cães (aproximadamente 5300 casos/100 mil) são diagnosticados anualmente com câncer (Schiffman & Breen, 2015; Gardner *et al.*, 2016). Os tumores mamários são o tipo de neoplasia mais frequentes em cadelas, sendo que cerca de 50% destes tumores são malignos (Sleeckx *et al.*, 2011; Lavalle *et al.*, 2009; Sorenmo *et al.*, 2011).

Da mesma forma que em seres humanos, a neoplasia mamária em cadelas está associada a alguns fatores de risco como: raça, dieta, idade avançada, e fatores ambientais (carcinógenos químicos). Contudo, o principal fator atribuído a esta neoplasia é o hormonal (Sorenmo *et al.*, 2011). Os hormônios ovarianos desempenham papel fundamental na carcinogênese mamária canina. Sabe-se que o uso de anticoncepcionais aumenta a incidência de tumores mamários em cadelas, visto que estrógeno e progesterona estimulam o desenvolvimento do epitélio mamário, propiciando erros no momento da divisão celular (Sorenmo, 2003; Kristiansen *et al.*, 2016; Cirillo, 2008). O diagnóstico da neoplasia mamária é confirmado através de biópsia e exame histopatológico, mas exames de radiografia torácica também devem ser realizados para identificar possíveis metástases. O tratamento se baseia na excisão cirúrgica do tumor seguido de quimioterapia na tentativa de precaver evento metastático, prolongando assim a vida do paciente (Cirillo, 2008).

Em relação as raças mais afetadas, Komazawa *et al.* (2016) descreveu que cães de menor porte apresentam uma tendência maior para desenvolver tumores mamários. Tais dados foram corroborados pelo trabalho de Zatloukal *et al.* (2005) que sugere que as raças Poodles, Cocker Spaniel Inglês e Dachshund apresentam um risco estatisticamente significativo para o desenvolvimento de tumores benignos e malignos nas glândulas mamárias. Já Jitpean *et al.* (2012) relacionam uma maior incidência de tumores mamários cães de grande porte.

A obesidade em cães jovens influencia no desenvolvimento e progressão do câncer pelo aumento da produção de estrógeno nas glândulas mamárias. Apesar dos mecanismos fisiológicos ainda não serem bem conhecidos, a expressão de vários receptores secretados pelos adipócitos, como os de leptina, estão correlacionados com os receptores de estrógeno em câncer mamário canino (Lim *et al.*, 2015).

Os cães tem sido considerados como um modelo de estudo muito promissor no campo da genética médica, pois apresentam várias características biológicas e clínicas similares aos dos seres humanos (Hayward *et al.*, 2016; Pinho *et al.*, 2012). Assim, o estudo da oncologia comparada entre cães e seres humanos envolvendo análises moleculares podem proporcionar descobertas científicas no campo das terapias contra o câncer, trazendo assim benefícios para ambos (Schiffman & Breen, 2015). Além disso, os tumores mamários são os mais frequentemente observados em cães, e a compreensão de tal neoplasia se torna fundamental para traçar medidas terapêuticas adequadas (Schiffman & Breen, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão e o padrão de metilação de genes constituintes dos Complexos Polycomb 1 e 2 em tumores mamários caninos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Avaliar o padrão de metilação dos genes do PRC1 (*CBX2* e *CBX7*) e PRC 2 (*EED*, *EZH2*) em tumores mamários caninos;
- ii. Avaliar a expressão dos genes supracitados em tumores mamários de cadelas;
- iii. Correlacionar os resultados encontrados e avaliar a existência de associação dos mesmos com o diagnóstico histopatológico, visando a identificação de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram analisadas 83 amostras coletadas provenientes de 40 animais submetidos à mastectomia no Hospital Veterinário da UFRA (HOVET). As amostras são compostas por fragmentos de tecido neoplásico e não-neoplásico do mesmo animal, sendo os mesmos armazenados em microtubos contendo solução de *RNA Later*[®] (Ambion Inc.) até a extração de ácidos nucléicos. Ressalta-se que este estudo possui aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal Rural da Amazônia (Protocolo 001/2013 CEUA – 23084.000265/2013-53 UFRA) e que os donos dos animais assinarão um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de doação das amostras (TCLE).

3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

3.2.1 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit comercial AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen), seguindo a especificações do fabricante. A concentração de DNA foi determinada por análise espectrofotométrica (Espectrofotômetro Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Para verificar a integridade do DNA genômico extraído, todas as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% corado com *GelRed*[™] (UNISCIENCE) e expostas à luz ultra-violeta para visualização dos fragmentos.

3.2.2 Análise do Padrão de Metilação

A modificação do DNA genômico foi realizada pelo EZ DNA *Methylation Lightning kit* (Zymo Research), utilizando as especificações do fabricante. Para a amplificação dos fragmentos desejados, foram desenhados iniciadores utilizando o software *Methyl Primer Express* v. 1.0 (Thermo Fisher Scientific) (Tabela 2). Cada PCR realizada teve um volume final de 25 µl contendo 2 µl de DNA tratado com bissulfato de sódio; 2,5 µl de solução tampão de reação 10X; 1µl de MgCl₂ (1,5 mM); 0,5 µl de dNTPs (10 mM) (Life); 1µl de cada primer (10 mM) e 0,3 µl de Taq DNA polimerase (Promega, Inc) e H₂O ultra pura para completar um volume final da reação.

Os produtos da amplificação da PCR foram analisados em gel de agarose 3% corado com *GelRed*TM (UNISCIENCE), e posteriormente purificados com o kit EZ-10 Spin Column PCR *Product Purification* (Bio Basic/Ludwig Biotec), seguindo as instruções do fabricante.

Tabela 2. Iniciadores utilizados no presente trabalho

| Gene | Sequência dos Iniciadores (5' – 3') |
|--------------------|--|
| <i>CBX2</i> | F5'GGTGGTTATAGGGTGTAGTAA3' R5'ACAACCTCTACCCACTTCTACAA3' |
| <i>CBX7</i> | F5'TAGAGTTGGAGATTAGGATTAG3' R5'CCTCCTTAAATTACAAAATAAA3' |
| <i>EED</i> | F5' TTTGTGGAATGGATTAGATTA3' R5'AAACAATCCTCAAAAATTTAAA3' |
| <i>EZH2</i> | F5'TTAATGTGTTGGAGTTTAAGGA3' R5'CAACCACAAAATTAACCAA 3' |

3.2.3 Sequenciamento e Critérios de Análise do Perfil de Metilação

O DNA purificado foi sequenciado pelo método didesoxiterminal, de acordo com a metodologia descrita por Sanger *et al.* (1977). A reação de sequenciamento foi feita utilizando o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard* (Thermo Fisher Scientific) versão 3.1 e analisada no sequenciador automático *ABI 3130* (Thermo Fisher Scientific).

Foram consideradas metiladas, amostras que apresentaram uma porcentagem maior ou igual a 20% de sítios metilados, de acordo com Akiyama (2009) e Schug e Overton (2009). A análise da metilação foi feita no software *BiQ Analyzer* (BOCK et al., 2008).

3.2.4 Análise da expressão gênica

O RNA total das amostras foi obtido utilizando TRIZOL (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. A conversão a cDNA foi realizada com o auxílio do kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific) usando a detecção por sonda *Taqman*.

Para a detecção dos níveis de RNA mensageiros de cada gene, foram escolhidas sondas comerciais (Thermo Fisher Scientific), enquanto que a emissão da fluorescência foi captada com o auxílio do sistema *StepOnePlus™ Real-Time PCR* (Thermo Fisher Scientific).

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

3.2.5 Análise estatística

A análise de significância estatística, para avaliar as associações dos padrões de metilação com os níveis de expressão, e destes com progressão tumoral e demais características clinicopatológicas, foi realizada no programa *GraphPad Prism* versão 5.01 (www.graphpad.com) pelos testes estatísticos *Kruskal-Wallis* e Teste T *Mann Whitnae*, sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Foram analisadas 83 amostras obtidas de 40 animais (Tabela 3), sendo 40 não tumorais e 43 tumorais. Dentre as amostras tumorais, 12 eram sarcomas e 31 carcinomas.

Em relação a idade, com exceção de um único animal, todos foram diagnosticados com uma idade superior a 7 anos sendo, portanto, considerados idosos. A idade mínima observada foi de 1 ano enquanto que a máxima foi de 16 anos (média de 10,9 anos).

Em relação as raças, 24 animais eram sem raça definida (SRD), enquanto que os demais estavam distribuídos entre as raças Poodle (9/40), Cocker (2/40), Pinscher (2/40), Bulldog (1/40), Doberman (1/40) e Daschund (1/40).

Tabela 3. Amostras analisadas para metilação e expressão

| Amostras | Animais | Cód.LOHC | HOVET | Raça | Idade | Metilação | | | | Expressão | |
|----------|---------|--------------|-------|----------------|-------|-----------|------|-----|------|-----------|------|
| | | | | | | CBX2 | CBX7 | EED | EZH2 | CBX2 | EZH2 |
| 1 | 1 | BNB 01 (NT) | 10881 | SRD | 15 | X | X | X | | | |
| 2 | | BNB 02 (T) | 10881 | | | X | X | X | X | | |
| 3 | 2 | BNB 03 (NT) | 11072 | SRD | 10 | X | X | X | | | |
| 4 | | BNB 04 (T) | 11072 | | | X | X | X | | | |
| 5 | 3 | BNB 05 (NT) | 10702 | SRD | 7 | X | X | | X | X | X |
| 6 | | BNB 06 (T) | 10702 | | | X | X | X | | X | X |
| 7 | 4 | BNB 07 (NT) | 8963 | Poodle | 10 | X | X | X | | X | X |
| 8 | | BNB 08 (T) | 8963 | | | X | X | X | | X | X |
| 9 | 5 | BNB 10 (NT) | 11352 | SRD | 12 | X | X | X | | | |
| 10 | | BNB 11 (T) | 11352 | | | X | X | X | | | |
| 11 | 6 | BNB 12 (NT) | 11440 | SRD | 12 | X | X | X | X | X | X |
| 12 | | BNB 13 (T) | 11440 | | | X | X | | X | X | X |
| 13 | 7 | BNB 15 (NT) | 11756 | Pincher | 10 | X | X | X | X | X | X |
| 14 | | BNB 16 (T) | 11756 | | | | X | X | | X | X |
| 15 | 8 | BNB 17 (NT) | 11841 | SRD | 10 | X | | | X | X | X |
| 16 | | BNB 18 (T) | 11841 | | | X | X | | X | X | X |
| 17 | 9 | BNB 21 (NT) | 11876 | SRD | 15 | X | X | X | X | | |
| 18 | | BNB 22 (T) | 11876 | | | X | X | X | X | | |
| 19 | 10 | BNB 23 (NT) | 12102 | SRD | 15 | X | X | X | | | |
| 20 | | BNB 24 (T) | 12102 | | | X | X | X | X | | |
| 21 | 11 | BNB 45 (NT) | 12606 | SRD | 15 | | X | X | X | X | X |
| 22 | | BNB 46 (T) | 12606 | | | X | X | X | X | X | X |
| 23 | 12 | BNB 50 (NT) | 13411 | SRD | 8 | X | | X | X | X | X |
| 24 | | N71 (T) | 13411 | | | X | X | X | | X | X |
| 25 | 13 | BNB 175 (NT) | - | Poodle | ? | X | X | X | | | |
| 26 | | BNB 176 (T) | - | | | X | X | X | X | | |
| 27 | 14 | BNB 217 (T) | 17366 | Poodle | 13 | X | X | | X | | |
| 28 | | BNB 218 (NT) | 17366 | | | X | X | | X | | |
| 29 | 15 | BNB 229 (T) | 7351 | SRD | 11 | X | | | X | | |
| 30 | | BNB 231 (NT) | 7351 | | | X | | | | | |
| 31 | 16 | BNB 234 (NT) | 17989 | Cocker Spaniel | ? | X | | | X | X | X |
| 32 | | BNB 235 (T) | 17989 | | | X | | X | X | X | X |
| 33 | 17 | BNB 240 (T) | 18088 | Poodle | 12 | X | | | | X | X |
| 34 | | BNB 241 (NT) | 18088 | | | X | X | X | | X | X |
| 35 | 18 | BNB 257 (NT) | 19000 | Doberman | 12 | | X | X | X | X | X |
| 36 | | BNB 258 (T) | 19000 | | | X | X | X | X | X | X |
| 37 | 19 | BNB 262 (NT) | - | SRD | 14 | X | X | X | X | X | X |
| 38 | | BNB 263 (T) | - | | | X | X | X | X | X | X |
| 39 | 20 | BNB 264 (NT) | 17980 | Dachshund | 12 | X | X | X | X | X | X |
| 40 | | BNB 265 (T) | 17980 | | | X | X | X | X | X | X |
| 41 | 21 | BNB 266 (NT) | 20362 | SRD | 10 | X | X | X | X | X | X |

| | | | | | | | | | | | |
|----|----|--------------|-------|----------|-------|---|---|---|---|---|---|
| 42 | | BNB267 (T) | 20362 | | | X | X | X | X | X | X |
| 43 | 22 | BNB 273 (NT) | 10177 | SRD | ? | X | X | | X | X | X |
| 44 | | BNB 274 (T) | 10177 | | | X | X | X | X | X | X |
| 45 | | BNB 275 (T) | 10177 | | | X | X | X | X | X | X |
| 46 | 23 | BNB 278 (NT) | 20362 | SRD | 10 | X | X | X | X | X | X |
| 47 | | BNB 279 (T) | 20362 | | | X | X | X | X | X | X |
| 48 | | BNB 280 (T) | 20362 | | | X | X | X | X | X | X |
| 49 | 24 | BNB 281 (NT) | 15556 | SRD | 9 | X | | X | | X | X |
| 50 | | BNB 282 (T) | 15556 | | | X | | X | X | X | X |
| 51 | 25 | BNB 300 (NT) | 13501 | SRD | 12 | X | X | X | X | X | X |
| 52 | | BNB 301 (T) | 13501 | | | X | X | X | X | X | X |
| 53 | 26 | BNB 302 (NT) | 21834 | Poodle | 12 | X | X | X | X | | |
| 54 | | BNB 303 (T) | 21834 | | | X | X | X | X | | |
| 55 | 27 | BNB 308 (NT) | 21712 | SRD | 10 | X | X | | X | | |
| 56 | | BNB 309 (T) | 21712 | | | X | X | X | X | | |
| 57 | 28 | BNB 310 (NT) | 21743 | Poodle | 9 | X | X | X | X | | |
| 58 | | BNB 311 (T) | 21743 | | | | X | X | X | | |
| 59 | 29 | BNB 312 (NT) | 22000 | Poodle | 10 | X | X | X | X | | |
| 60 | | BNB 313 (T) | 22000 | | | X | | X | X | | |
| 61 | 30 | BNB 314 (NT) | 21894 | SRD | 8 | X | X | X | X | | |
| 62 | | BNB 315 (T) | 21894 | | | X | X | X | X | | |
| 63 | 31 | BNB 316 (NT) | 4900 | Poodle | 16 | X | X | X | X | | |
| 64 | | BNB 317 (T) | 4900 | | | X | X | X | X | | |
| 65 | | BNB 318 (T) | 4900 | | | X | X | X | X | | |
| 66 | 32 | BNB 319 (NT) | NI | SRD | 12 | X | X | | | | |
| 67 | 33 | BNB 327 (T) | NI | SRD | 10 | | X | | X | | |
| 68 | | BNB 328 (NT) | NI | | | | X | | X | | |
| 69 | 34 | BNB 329 (NT) | NI | Cocker | 9 | X | X | | | | |
| 70 | | BNB 330 (T) | NI | | | | X | | X | | |
| 71 | 35 | BNB 333 (T) | NI | Poodle | 13 | | X | | X | | |
| 72 | | BNB 334 (T) | NI | | | | X | | X | | |
| 73 | | BNB 335 (NT) | NI | | | X | X | | X | | |
| 74 | 36 | BNB 338 (T) | NI | SRD | 1a 3m | X | | | | | |
| 75 | | BNB 339 (NT) | NI | | | | X | | X | | |
| 76 | 37 | BNB 340 (T) | NI | SRD | 12 | | | | X | | |
| 77 | | BNB 341 (NT) | NI | | | | | | X | | |
| 78 | 38 | N 72 (T) | - | Pinscher | 10 | X | | | | | |
| 79 | | N73 (NT) | - | | | X | | | | | |
| 80 | 39 | N 75 (NT) | - | Bulldog | 8 | X | X | | | | |
| 81 | | N 76 (T) | - | | | X | X | | X | | |
| 82 | 40 | N 77 (NT) | - | SRD | 12 | | | | | | |
| 83 | | N 78 (T) | - | | | | X | X | X | | |

X- amostras analisadas / SRD- sem raça definida

4.2 PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES-ALVO

4.2.1 Metilação em *CBX2*

Para verificar o padrão de metilação do gene *CBX2*, foi sequenciada uma região de 357 pb contendo 22 sítios CpGs, em um total de 69 amostras de tecidos tumorais e não tumorais. Das sequências analisadas, todas apresentaram-se metiladas, sendo que não foi observada uma metilação diferencial entre os tecidos tumoral e não tumoral (Figuras 10 e 11).

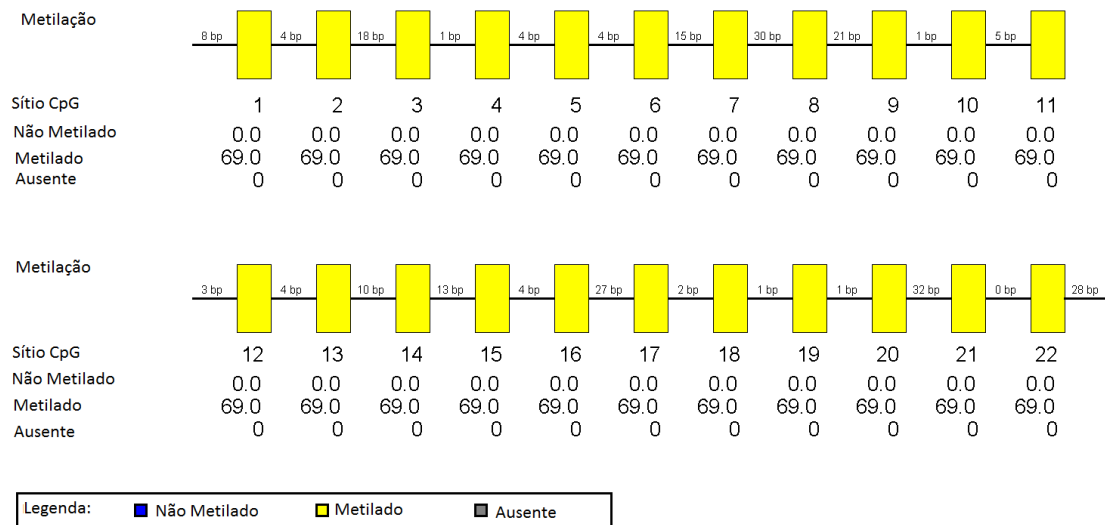


Figura 10: Diagrama indicando o padrão de metilação por sítio CpG do fragmento analisado do gene *CBX2*.

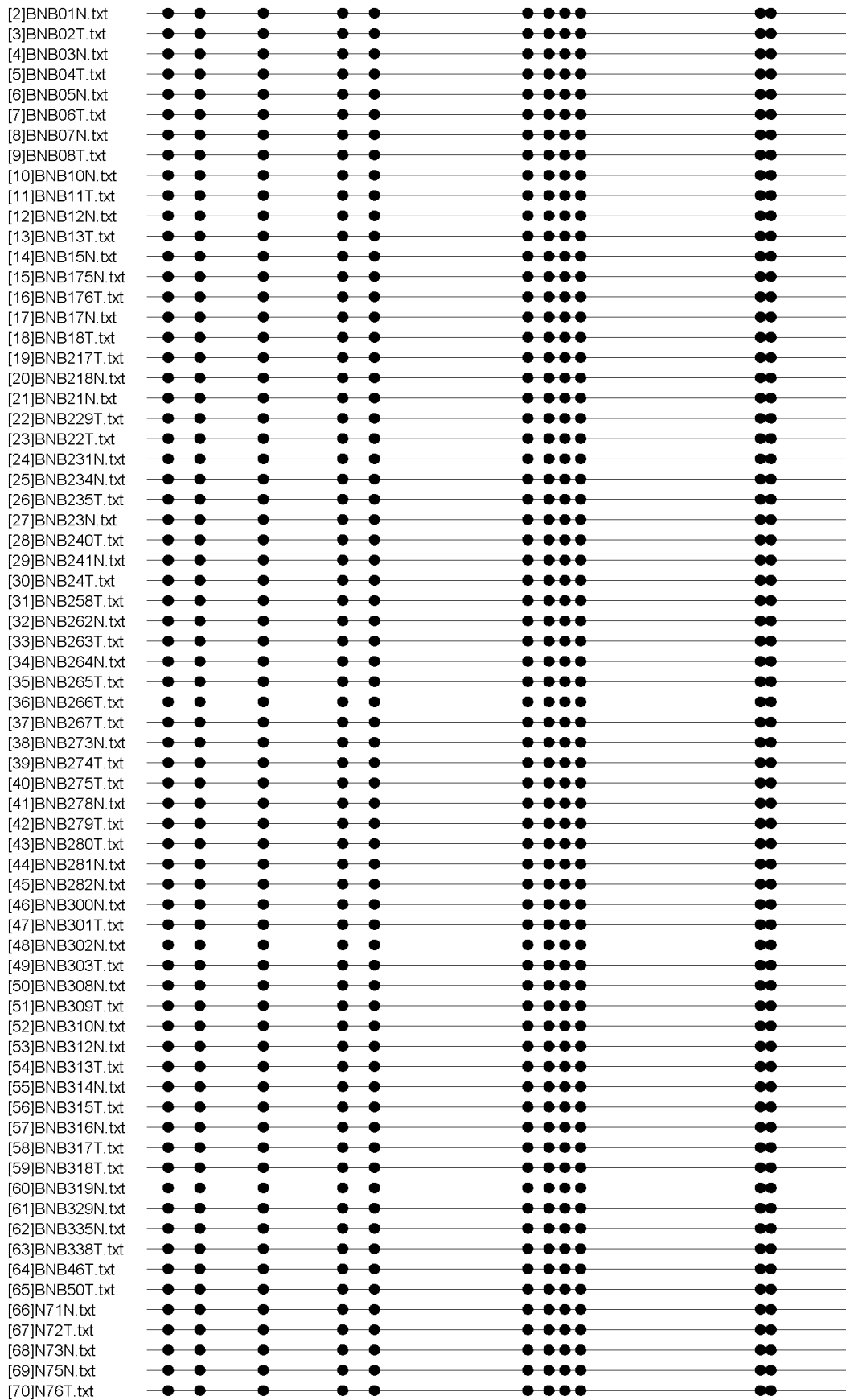


Figura 11: Análise da metilação da região promotora do gene *CBX2*. Cada linha representa uma amostra e cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Os círculos em negrito indicam CpGs metilados.

4.2.2 Metilação em *CBX7*

Para o gene *CBX7*, foi sequenciada uma região de 423 pb contendo 14 sítios CpGs, somando um total de 67 amostras de tecidos tumorais e não tumorais. Não foram observados sítios metilados em nenhuma das amostras analisadas (Figura 12 e 13).

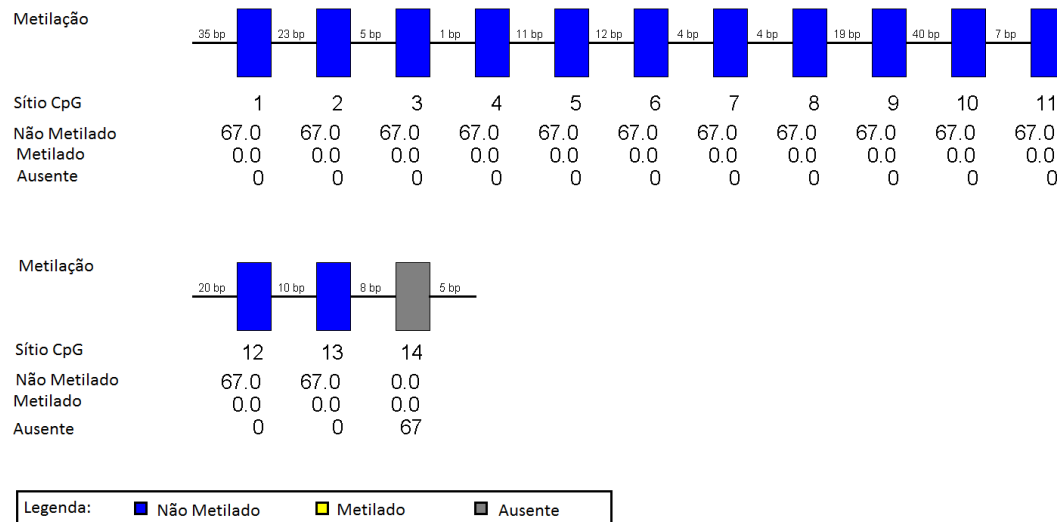


Figura 12: Diagrama indicando o padrão de metilação por sítio CpG do fragmento analisado do gene *CBX7*.

Apesar de não ter sido observada metilação no gene *CBX7*, foram identificadas, em todas as amostras sequenciadas, duas alterações de base na porção 3' do fragmento analisado, sendo que uma delas foi responsável pela eliminação do último sítio CpG (sítio 14). Estas alterações foram observadas nas posições genômicas 25.896.627 (uma transversão C→G) e 25.876.629 (uma transversão T→A) (Figura 14). Em ambos os casos, as alterações apareceram em heterozigose, o que pode sugerir a heterogeneidade das populações celulares estudadas (Figura 14 e 15).

| | | | | | | | |
|-----------------|---|---|----|---|---|---|---|
| [2]BNB01N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [3]BNB02T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [4]BNB03N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [5]BNB04T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [6]BNB05N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [7]BNB06T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [8]BNB07N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [9]BNB08.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [10]BNB10N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [11]BNB11T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [12]BNB12N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [13]BNB13T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [14]BNB15N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [15]BNB16T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [16]BNB175N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [17]BNB176T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [18]BNB18T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [19]BNB217T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [20]BNB218N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [21]BNB21N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [22]BNB22T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [23]BNB23N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [24]BNB241N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [25]BNB24T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [26]BNB257N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [27]BNB258T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [28]BNB262N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [29]BNB263T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [30]BNB264N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [31]BNB265T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [32]BNB266T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [33]BNB267T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [34]BNB273N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [35]BNB274T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [36]BNB275T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [37]BNB278N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [38]BNB279T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [39]BNB280T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [40]BNB300N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [41]BNB301T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [42]BNB302.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [43]BNB303T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [44]BNB308N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [45]BNB309T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [46]BNB310N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [47]BNB311T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [48]BNB312N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [49]BNB314N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [50]BNB315T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [51]BNB316N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [52]BNB317T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [53]BNB318T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [54]BNB319N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [55]BNB327T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [56]BNB328N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [57]BNB329N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [58]BNB330T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [59]BNB333T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [60]BNB334T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [61]BNB335N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [62]BNB339N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [63]BNB45N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [64]BNB46T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [65]N71N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [66]N75N.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [67]N76T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| [68]N78T.txt | ○ | ○ | ○○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

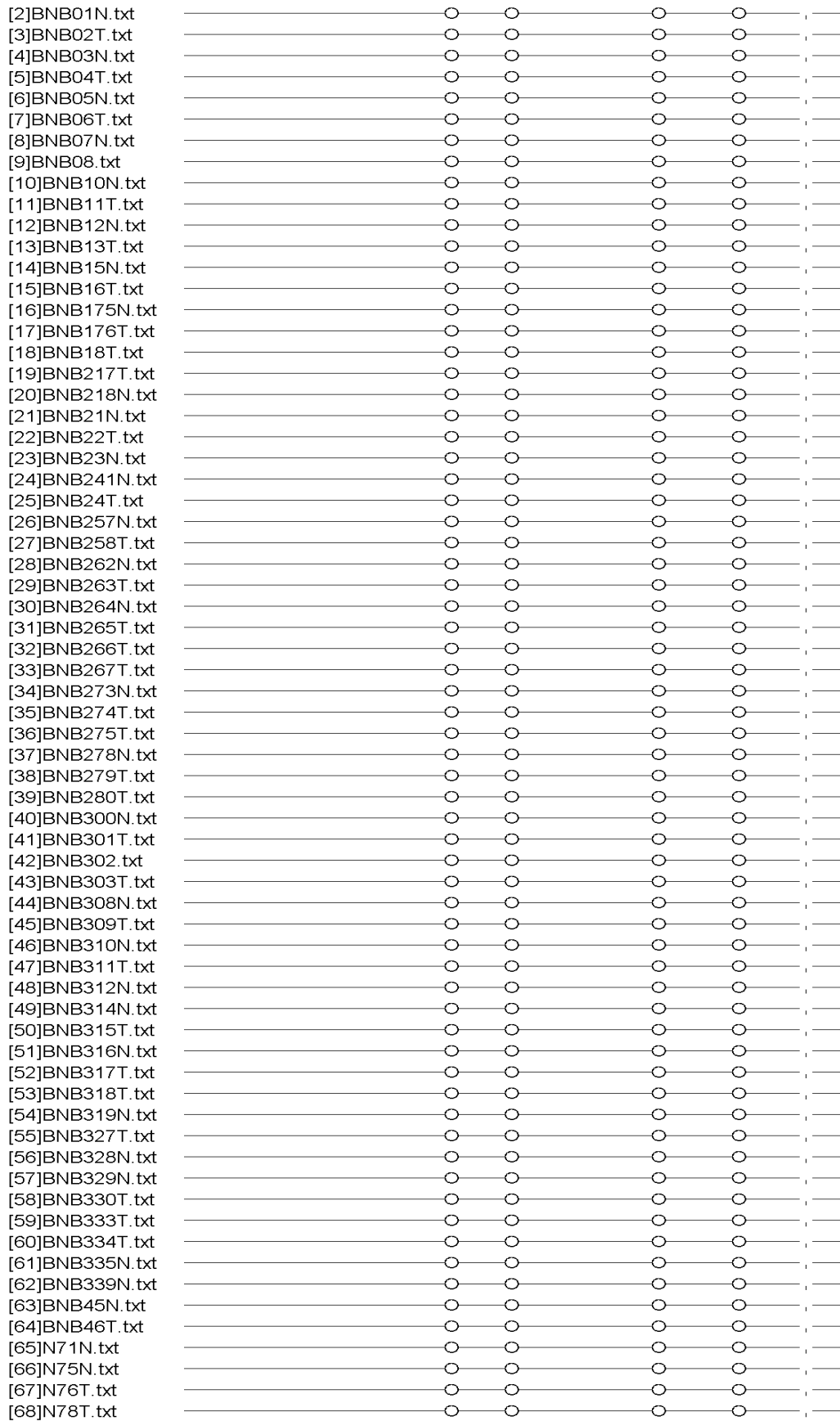


Figura 13: Análise da metilação da região promotora do gene *CBX7*. Cada linha representa uma amostra e cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Os círculos em negrito indicam CpGs metilados.

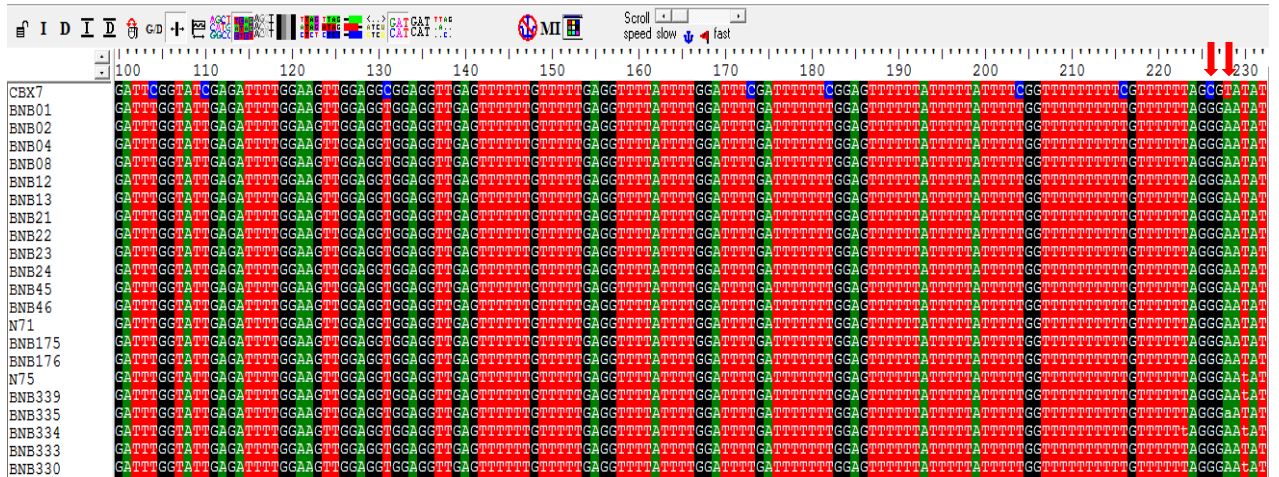


Figura 14: Alinhamento no Bioedit evidenciando duas alterações de base no último sítio CpG.

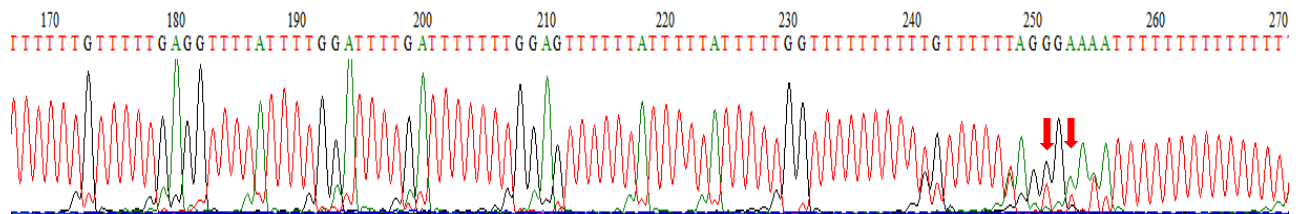


Figura 15. Eletroferograma evidenciando as alterações observadas na porção final do fragmento analisado de *CBX7*.

4.2.3 Metilação em *EED*

Para o gene *EED*, foi sequenciada uma região de 424 pb contendo 18 sítios CpGs, em um total de 54 amostras, sendo que em nenhuma foi observada metilação (Figuras 16 e 17).

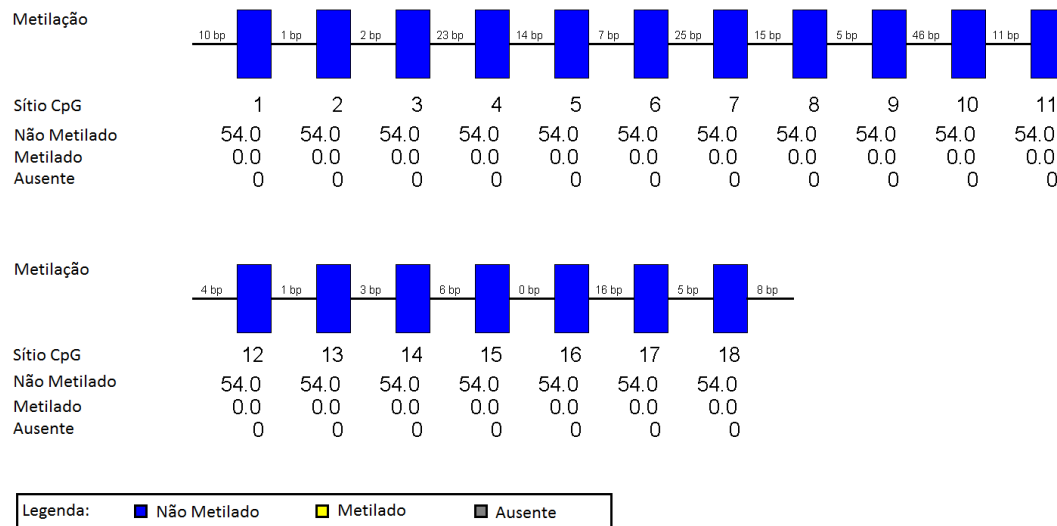


Figura 16: Diagrama indicando o padrão de metilação por sítio CpG do fragmento analisado do gene *EED*.

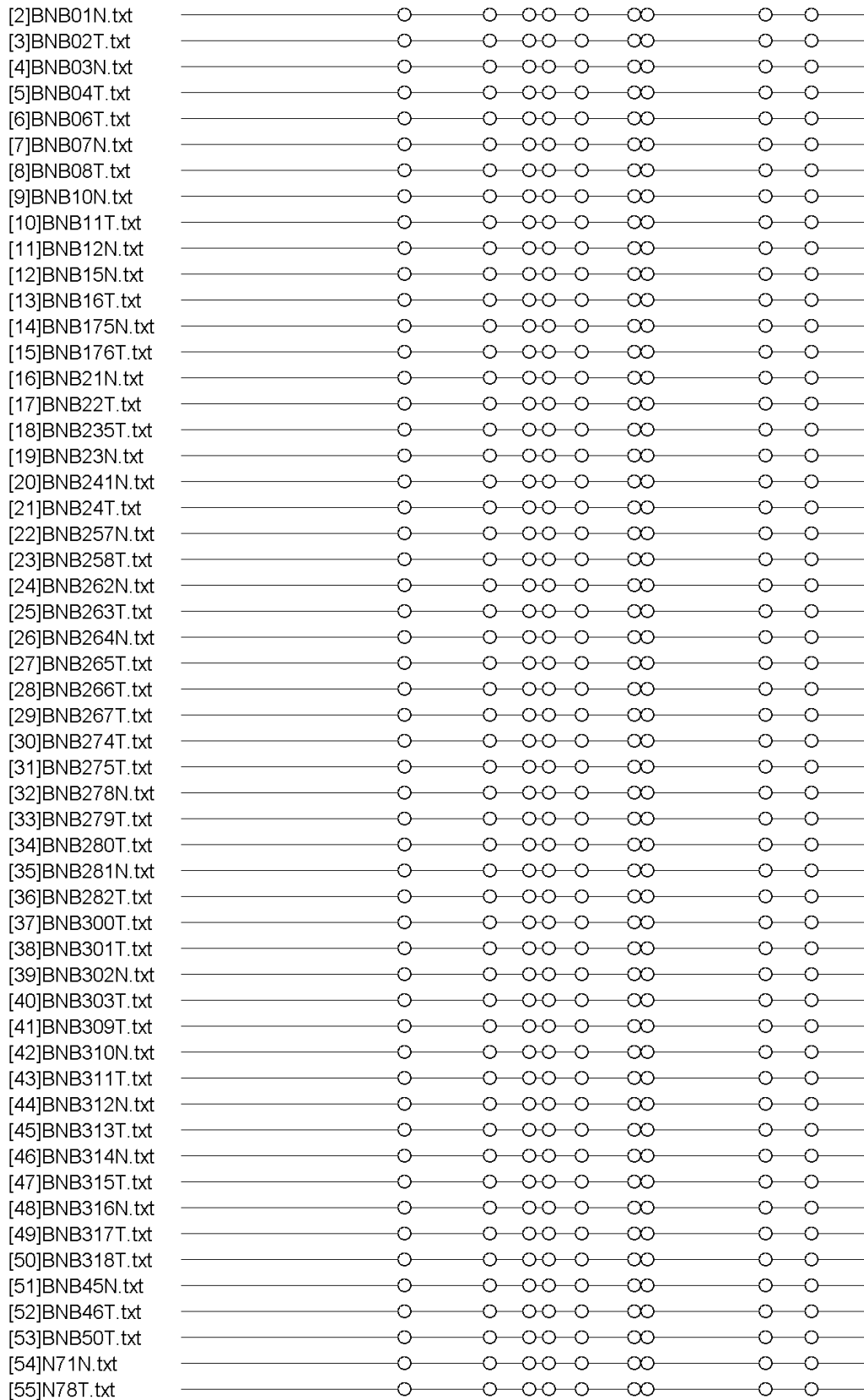


Figura 17: Análise da metilação da região promotora do gene *EED*. Cada linha representa uma amostra e cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Os círculos em negrito indicam CpGs metilados.

4.2.4 Metilação em *EZH2*

Para a análise do padrão de metilação do gene *EZH2*, foi sequenciada uma região de 377 pb contendo 21 sítios CpGs. Das 60 amostras analisadas observou-se que todas apresentaram metilação similar entre tecido tumoral e não tumoral (100% metiladas) (Figuras 18 e 19).

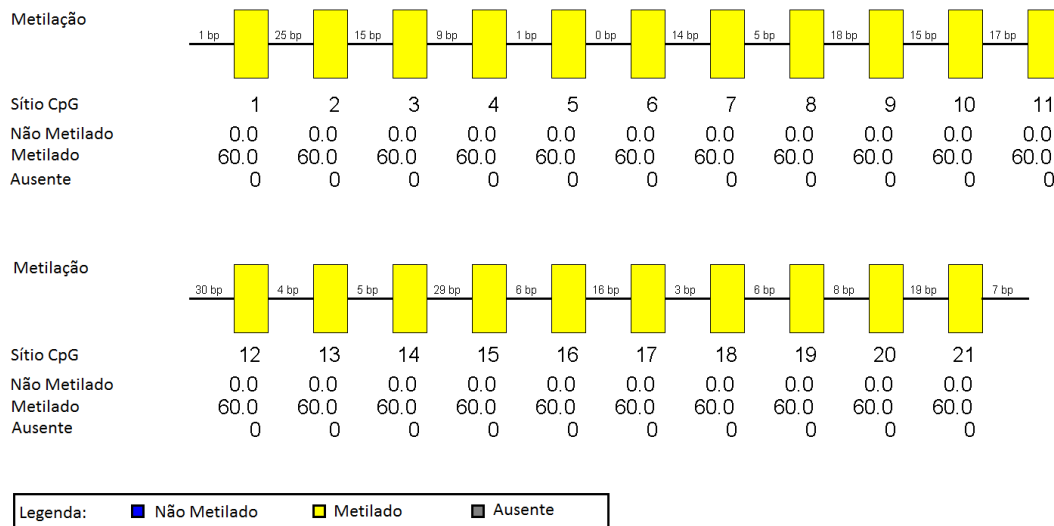


Figura 18: Diagrama indicando o padrão de metilação por sítio CpG do fragmento analisado do gene *EZH2*.

| | | | | | | | | |
|-----------------|---|---|---|-----|---|---|---|---|
| [2]BNB02T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [3]BNB05N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [4]BNB12.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [5]BNB13T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [6]BNB15N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [7]BNB176T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [8]BNB17N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [9]BNB18T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [10]BNB217T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [11]BNB218N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [12]BNB21N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [13]BNB229T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [14]BNB22T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [15]BNB234N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [16]BNB235T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [17]BNB24T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [18]BNB257N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [19]BNB258T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [20]BNB262N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [21]BNB263T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [22]BNB264N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [23]BNB265T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [24]BNB266N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [25]BNB267T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [26]BNB273N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [27]BNB274T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [28]BNB275T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [29]BNB278N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [30]BNB279T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [31]BNB280T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [32]BNB282T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [33]BNB300N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [34]BNB301T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [35]BNB302N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [36]BNB303T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [37]BNB308N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [38]BNB309T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [39]BNB310N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [40]BNB311T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [41]BNB312N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [42]BNB313T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [43]BNB314N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [44]BNB315T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [45]BNB316N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [46]BNB317T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [47]BNB318T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [48]BNB327T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [49]BNB328N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [50]BNB330T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [51]BNB333T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [52]BNB334T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [53]BNB335N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [54]BNB339N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [55]BNB340T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [56]BNB341N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [57]BNB45N.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [58]BNB46T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [59]BNB50T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [60]N76T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |
| [61]N78T.txt | ● | ● | ● | ●●● | ● | ● | ● | ● |

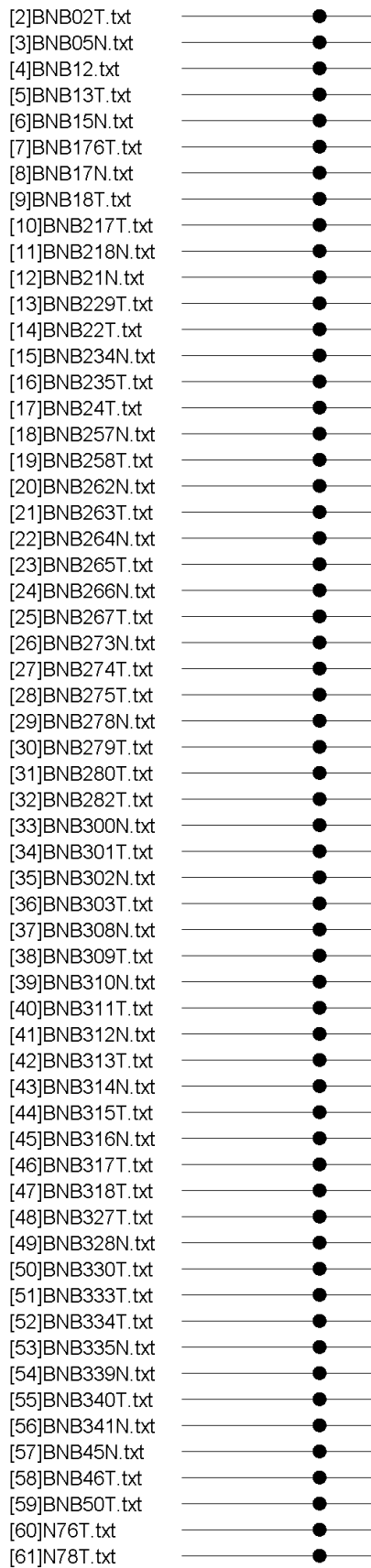


Figura 19: Análise da metilação da região promotora do gene *EZH2*. Cada linha representa uma amostra e cada círculo equivale a um dinucleotídeo CpG. Os círculos em negrito indicam CpGs metilados.

4.3 PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES *CBX2* E *EZH2*

Afim de verificar a influência da metilação na expressão, foi realizada análise por PCR em tempo real nos genes que apresentaram alta taxa de metilação: *CBX2* e *EZH2*.

4.3.1 Expressão de *CBX2*

A expressão gênica de *CBX2* foi avaliada em 13 amostras pareadas (tumor e normal do mesmo paciente) e 4 amostras não pareadas (Tabela 3). Para esta análise, os valores de expressão obtidos foram normalizados pelo nível de expressão correspondente ao do controle endógeno *RPL32* canino (*Ribosomal protein L32*).

Ao ser realizada uma análise global, comparando as amostras tumorais com as não tumorais, observamos uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0.0035$) (Figura 20). Da mesma forma, ao estratificarmos as amostras tumorais nos dois subtipos histológicos analisados (carcinomas e sarcomas), pode-se observar uma diferença significativa no padrão de expressão observado entre os tecidos normal e carcinomas ($p=0.0119$) (Figura 21).

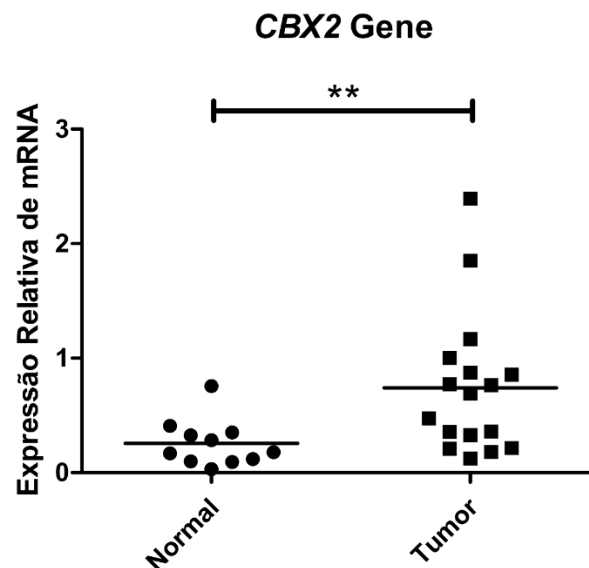


Figura 20. Expressão relativa de RNA mensageiro de *CBX2* em amostras normais e tumorais

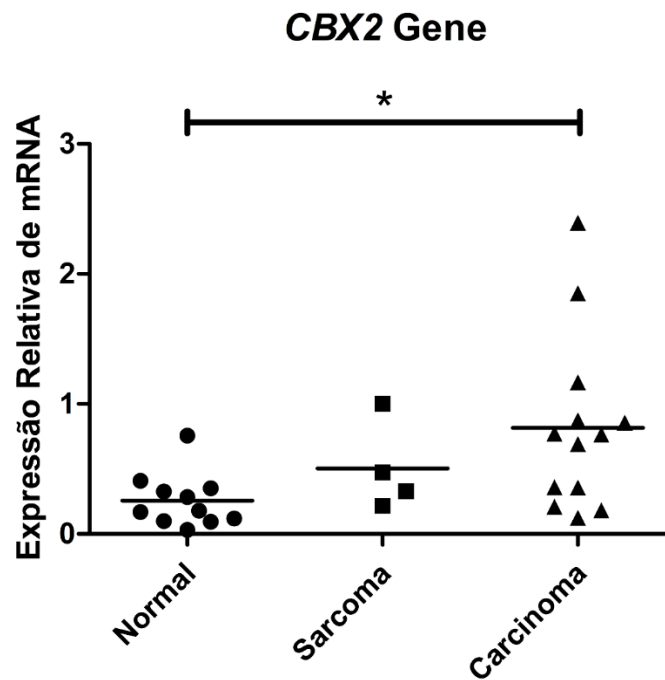


Figura 21. Expressão relativa de RNA mensageiro de *CBX2* em amostras normais e tumorais, subdivididas de acordo com o tipo histológico.

4.3.2 Expressão de *EZH2*

A expressão gênica de *EZH2* foi avaliada em 11 amostras pareadas (tumor e normal do mesmo paciente) e 6 amostras não pareadas (Tabela 3). Os valores de expressão obtidos foram normalizados pela expressão correspondente ao do controle endógeno *HPRT* canino (*Hypoxanthine phosphoribosiltransferase*).

Na análise global, ao serem comparadas as amostras tumorais com as não tumorais, foi observada uma diferença estatisticamente significante entre os dois grupos ($p= 0.0065$) (Figura 22). Quando as amostras tumorais foram subdivididas em carcinomas e sarcomas, pode-se observar uma diferença significativa no padrão de expressão ($p= 0.0189$) (Figura 23). Observando-se que em ambas as análises o padrão de expressão de *EZH2* foi baixo.

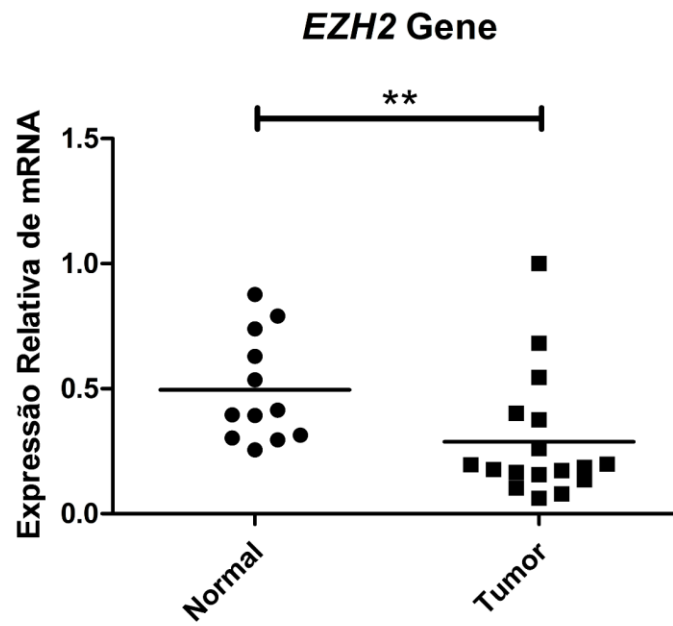


Figura 22. Expressão relativa de RNA mensageiro de *EZH2* em amostras normais e tumorais

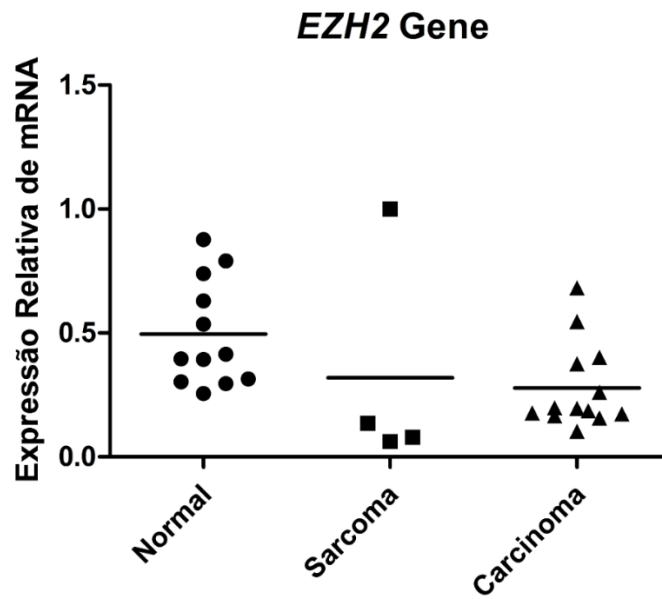


Figura 23. Expressão relativa de RNA mensageiro de *EZH2* em amostras normais e tumorais, subdivididas de acordo com o tipo histológico.

5. DISCUSSÃO

Os genes do grupo Polycomb codificam reguladores epigenéticos evolutivamente conservados nos vertebrados descritos como repressores de genes relacionados com o processo de desenvolvimento (Eckert *et al.*, 2011). As proteínas do grupo polycomb (PcG) são comumente agrupadas em dois complexos multiproteicos identificados, nos mamíferos, como complexo repressivo polycomb 1 (PRC1) e complexo repressivo polycomb 2 (PRC2) (Scelfo *et al.*, 2015).

PRC1 é subdividido em canônico composto por proteínas CBXs, e não canônico que possuem a proteína RYBP (Pasini *et al.*, 2016; Connelly & Dykhuizen 2016; Vidal *et al.*, 2016) e medeia a mono-ubiquitinação da histona H2A nos resíduos de lisina na posição 119 (H2AK119ub), enquanto que PRC2, composto por um núcleo central formado por SUZ12, EED e EZH1 /2, catalisa a metilação da histona H3 nos resíduos de lisina na posição 27 (H3K27me2/3) (Conway *et al.*, 2015; Turner *et al.*, 2013; Christofides *et al.*, 2016; Vidal *et al.*, 2016).

Estudos na literatura sugerem que os níveis de proteínas PcG sejam alterados durante a diferenciação e progressão do câncer (Eckert *et al.*, 2011; Tu *et al.*, 2017).

EZH2 é um gene que codifica uma histona metiltransferase, e é a principal responsável pela trimetilação do resíduo 27 de Lisina localizado na Histona 3 (H3K27me3) associada a repressão transcricional (Chase & Cross, 2011).

Sabe-se que *EZH2* tem sua expressão aumentada em diversos tipos de tumores, tais como de próstata, mama, bexiga, gástrico, pulmão e em carcinoma hepatocelular (Chase & Cross, 2011; Bae & Hennighausen, 2014). Geralmente, essa superexpressão em tumores sólidos está associada com a agressividade do tumor, a presença de metástase e a um desfecho ruim do paciente (Ezponda & Licht, 2014).

Em câncer de mama sua expressão ainda é mais acentuada quando comparada aos outros tipos de tumores, sendo esta considerada um indicador de agressividade e de mau prognóstico (Kleer *et al.*, 2003; Bae & Hennighausen, 2014; Wassef *et al.*, 2016).

O primeiro estudo da expressão da proteína *EZH2* em tumores mamários de cães foi realizado por Choi *et al.* (2016) que constataram a superexpressão de *EZH2* nos carcinomas analisados, similar ao já descrito no câncer de mama em seres humanos, sendo o nível de expressão diretamente correlacionado com o grau de malignidade do tumor.

Os resultados obtidos no presente estudo divergem de alguns na literatura, visto que, em tumores, a expressão de *EZH2* foi significativamente mais baixa do que em tecidos não tumorais. Apesar de não ter sido observada metilação diferencial entre as amostras tumorais e não tumorais analisadas ao longo do fragmento amplificado, Su *et al.* (2015), ao analisarem 55 sítios CpG da região promotora de *EZH2* em amostras de carcinoma oral de células escamosas, observaram uma diminuição do padrão de expressão do gene correlacionada com o aumento da metilação, em especial quando esta ocorria em uma região que abrange um polimorfismo T→C localizado na região promotora. Já Schäffer *et al.* (2016), ao analisarem 131 sítios CpG do promotor de *EZH2*, observaram que a extremidade 5' do fragmento amplificado, abrangendo os 29 primeiros CpGs, apresentava-se altamente metilada em todas as amostras tumorais, com metilação diferencial apenas em amostras controles sem histórico de tumor. Estes dados sugerem que possivelmente o fragmento amplificado no presente estudo, não abrange uma região essencial para a regulação da expressão do gene via metilação do DNA, e que um fragmento maior do promotor deve ser analisado para esclarecer melhor essa relação.

Outros possíveis mecanismos que podem estar relacionados com a diminuição da expressão de *EZH2* observada em tumores são a presença de mutações somáticas e de anormalidades citogenéticas. Em pacientes com leucemia linfoblástica aguda, linfomas e síndrome mielodisplásica já foram descritas mutações inativantes sem sentido e de alteração do quadro de leitura, responsáveis pela diminuição da expressão do gene e consequente inibição da atividade histona metiltransferase de PRC2 (Ezponda & Licht, 2014; Völkel *et al.*, 2015). Além disso, pacientes com síndrome mielodisplásica também apresentam uma diminuição da expressão de *EZH2* relacionada com deleções do cromossomo 7 (deleção do braço longo e monossomia) (Völkel *et al.*, 2015; Cabrero *et al.*, 2016).

Independente da causa, já foi observado que em leucemia linfoblástica aguda, a perda de *EZH2* resulta no aumento do potencial tumorigênico de linhagens como resultado da ativação de outras vias oncogênicas, como NOTCH (Chung *et al.*, 2012; Ezponda & Licht, 2014), sugerindo que *EZH2* pode atuar como um gene supressor tumoral ou um oncogene, dependendo do tipo de alteração encontrada (Chung *et al.*, 2012).

O gene *EED* também codifica uma proteína que é um dos principais componentes de PRC2 (Oktyabri *et al.*, 2014). Apesar de saber que esse gene tem sua expressão induzida durante o processo de transição epitélio-mesenquimal induzida por ação do TGF- β (Oktyabri *et al.*, 2014), poucos trabalhos na literatura têm relatado o papel de *EED* na carcinogênese.

Yu *et al.* (2012) ao avaliarem o perfil de expressão gênica em câncer de mama utilizando microarranjos, observaram um nível de expressão elevado dos genes relacionados ao complexo repressivo polycomb 2 (PRC2), dentre eles *EED*. Em contrapartida, os níveis de E-caderina diminuíram significativamente, evidenciando uma associação positiva de PRC2 com a proliferação de células tumorais.

Considerando a alta expressão de *EED* observada em tumores, Schäfer *et al.* (2016) fizeram análise do padrão de metilação e de mutação do gene em pacientes com leucemia linfoblástica aguda. Não foram observadas pelos autores, alterações genéticas e nem a presença de metilação em *EED*. Este resultado corrobora os achados do presente trabalho, onde nenhum sítio CpG foi encontrado metilado na região analisada.

As proteínas cromobox, assim chamadas por possuírem um cromodomínio conhecido como modificador da organização da cromatina, são componentes importantes de PRC1 (Nawaz *et al.*, 2016). Dentre elas, destacamos CBX2 e CBX7.

Diversos estudos têm apontado mudanças no padrão de expressão de *CBX2*, o caracterizando como um oncogene. Enquanto Parris *et al.* (2010) relacionaram o aumento da expressão deste gene com o fenótipo mais maligno de tumores de mama sugerindo que *CBX2* é um gene crítico para o desenvolvimento e progressão deste tumor, em carcinoma oral de células escamosas, esta alteração na expressão está relacionada com a infiltração inflamatória do tumor (Parris *et al.*, 2014). Por outro lado, análises de expressão de pacientes com glioblastoma multiforme, revelaram que a maioria das amostras não apresenta mudanças no nível de expressão gênica de *CBX2*, sendo que menos de 10% das amostras apresentaram superexpressão do gene (Li *et al.*, 2013).

Afim de entender os possíveis mecanismos regulatórios da expressão de *CBX2*, Clermont *et al.* (2014) analisaram 8013 pacientes de 29 tipos diferentes de tumores, não identificando anomalias cromossômicas potencialmente inativantes e apenas 40 mutações de ponto que poderiam levar ao silenciamento do gene.

Em contrapartida, a taxa de amplificação de *CBX2* foi superior a 30%, bem como o aumento da expressão do gene, sendo estas duas características relacionadas com a presença do processo metastático e diminuição da sobrevida, principalmente em tumores mamários.

Estes autores também relataram que, apesar de proteínas polycomb estarem relacionadas com a regulação negativa do locus INK4/ARF, apenas em tumores colorretais foram

observados um nível elevado de expressão de *CBX2* com baixos níveis de expressão de *p15^{INK4b}*, sendo que esta correlação não foi estatisticamente significativa e sugerindo que o aumento dos níveis de *CBX2* é independente do silenciamento de *INK4/ARF* (Clermont *et al.*, 2014).

Em conjunto, os dados supracitados corroboram os resultados encontrados em nossa população, pois apesar de não ter sido observada metilação diferencial nas amostras e que todas estavam metiladas, outros mecanismos, tais como a amplificação gênica, podem ser os responsáveis pelo aumento significativo na expressão de *CBX2* observado nos tumores analisados. Além disso, os resultados dos ensaios de expressão para o gene *p15^{INK4b}* nas mesmas amostras (Faro, 2016) apontam para uma superexpressão do mesmo, o que corrobora o exposto sobre a expressão de *CBX2* ser um evento independente do silenciamento dos genes do locus *INK4/ARF*.

No desenvolvimento tumoral, *CBX7* é capaz de atuar de maneira oposta em diferentes tipos histológicos, sendo considerado um oncogene ou um gene supressor tumoral, dependendo do tumor analisado (Li *et al.*, 2013).

Zhang *et al.* (2010), analisando a função de *CBX7* no câncer gástrico, constataram um aumento na expressão de *CBX7* em tumores gástricos, sendo este correlacionado com a idade do paciente e grau de metástase. Em adenocarcinoma de ovário, *CBX7* também se apresenta superexpresso, estando relacionado com um mau prognóstico nas neoplasias ovarianas.

Em câncer de mama, *CBX7* é capaz inibir a proliferação celular através da supressão da via Wnt/ β catenina ao estimular a expressão do gene *Dickkopf-1 (DKK-1)*, antagonista da via, resultando na regulação positiva de fatores de transcrição tais como *MYC*, desencadeando o aumento da renovação de células troncos tumorais mamárias, e a proliferação de células cancerosas de mama (Kim *et al.*, 2015). Já Meseure *et al.* (2016), constatou que *CBX7* apresenta uma baixa expressão quando comparado a *EZH2*.

Em relação ao padrão de metilação, apenas um estudo em amostras de glioblastoma multiforme foi realizado até o momento. Os resultados deste estudo relatam a hipermetilação do promotor de *CBX7* e a diminuição da expressão do gene (Nawaz *et al.*, 2016). Estes dados divergem dos obtidos por nós, onde observamos a ausência de metilação nas amostras analisadas. No entanto, análises de expressão são necessárias para esclarecer melhor a relação da ausência desta alteração epigenética com a regulação gênica de *CBX7* nas amostras tumorais de mama em cães.

6. CONCLUSÃO

- Não foi observado padrão de metilação diferencial entre as amostras tumorais e não tumorais analisadas para os genes *CBX2*, *EZH2*, *EED* e *CBX7*;
- Não houve correlação entre o padrão de metilação e de expressão de *CBX2* e *EZH2*, sugerindo que outros mecanismos genéticos e epigenéticos de regulação gênica possam estar atuando;
- *CBX2* e *EZH2* apresentaram um padrão diferencial de expressão gênica significativamente diferente entre as amostras tumorais e não tumorais, sugerindo que os mesmos podem ser utilizados como marcadores no diagnóstico precoce de tumores de mama caninos

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHCHEH, R. K.; KUBICEK, C. P. Epigenetics as an emerging tool for improvement of fungal strains used in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 15, p. 6167–6181, 2015.

AGUILO, F.; ZHOU, M. M.; WALSH, M. J. Long noncoding RNA, polycomb, and the ghosts haunting INK4b-ARF-INK4a expression. **Cancer Research**, v. 71, n. 16, p. 5365–5369, 2011.

ALOIA, L.; DI STEFANO, B.; DI CROCE, L. Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. **Development**, v. 140, n. 12, p. 2525–2534, 2013.

ARANDA, S.; MAS, G.; CROCE, L. DI. Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. **Science Advances**, v. 1, n. December, p. 1–16, 2015.

BAJUSZ, I.; SIPOS, L.; PIRITY, M. K. Nucleotide substitutions revealing specific functions of Polycomb group genes. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 114, n. 4, p. 547–556, 2015.

BANTIGNIES, F.; CAVALLI, G. Polycomb group proteins: repression in 3D. **Trends in genetics : TIG**, v. 27, n. 11, p. 454–64, nov. 2011.

BAE.; HENNIGHAUSEN. Canonical and non-canonical roles of the histone methyltransferase EZH2 in mammary development and cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2014.

BAUDE, A.; LINDROTH, A. M.; PLASS, C. PRC2 loss amplifies Ras signaling in cancer. **Nature genetics**, v. 46, n. 11, p. 1154–5, 2014.

BERGMAN, Y.; CEDAR, H. DNA methylation dynamics in health and disease. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 3, p. 274–81, 2013.

BLACKLEDGE, N. P.; ROSE, N. R.; KLOSE, R. J. Targeting Polycomb systems to regulate gene expression: modifications to a complex story. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 16, n. 11, p. 643–649, 2015.

BOYER, L. A.; PLATH, K.; Zeitlinger, J.; Brambrink, T.; Medeiros, L. A.; Lee, T. I.; Levine, S. S.; Wernig, M.; Tajonar, A.; Ray, M. K.; Bell, G. W.; Otte, A. P.; Vidal, M.; Gifford, D. K.; Young, R. A.; Jaenisch, R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. **Nature**, v. 441, n. 7091, p. 349–353, 2006.

BRACKEN, A. P. PASINI, D.; CAPRA, M.; PROSPERINI, E.; COLLI, E.; HELIN, K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *v. 22, n. 20, p. 5323–5335, 2003.*

BRACKEN, A. P. PASINI, D.; CAPRA, M.; PROSPERINI, E.; COLLI, E.; HELIN, K. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. p. 525–530, 2007.*

BRACKEN, A. P.; HELIN, K. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 11, p. 773–784, 2009.

CACCIOLA, N. A.; SEPE, R.; FORZATI, F.; FEDERICO, A.; PELLECCIA, S.; MALAPELLE, UMBERTO. DE STEFANO, A.; ROCCO, D.; FUSCO, A.; PALLANTE, P. Restoration of CBX7 expression increases the susceptibility of human lung carcinoma cells to irinotecan treatment. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 11, p. 1179–1186, 2015.

CADET, J.; MCCOY, M.; JAYANTHI, S. Epigenetics and addiction. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n. 5, p. 502–511, maio 2016.

CABRERO, M.; WEI, Y.; YANG, Y.; GANAN-GOMEZ; BOHANNAN, Z.; COLLA, S.; MARCHESINI, M.; GUILLERMO, G. M.; TAKAHASHI, K.; BUESO-RAMOS.; GARCIA-MANERO, G. Down-regulation of EZH2 expression in myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research** 2016

CAO, R.; ZHANG, Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. **Molecular Cell**, v. 15, n. 1, p. 57–67, 2004.

CAPUANO, F.; MÜLLEDER, M.; KOK, R.; BLOM, H. J.; RALSER, M. Cytosine DNA methylation is found in *Drosophila melanogaster* but absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and other yeast species. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 8, p. 3697–3702, 2014.

CAPUTO, S.; BENBOUDJEMA, L.; SINILNIKOVA, O.; ROULEAU, E.; BÉROUD, C.; LIDEREAU, R. Description and analysis of genetic variants in French hereditary breast and ovarian cancer families recorded in the UMD-BRCA1/BRCA2 databases. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 992–1002, 2012.

- CASA, V.; GABELLINI, D. A repetitive elements perspective in Polycomb epigenetics. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. OCT, p. 1–16, 2012.
- CHASE, A.; CROSS C.P.N.; Aberrations of EZH2 in Cancer. **American Association for Cancer Research**, V. 9, n. 17, 2011.
- CHOI, H-J.; JANG, S.; RYU, J-E.; LEE, HY-J.; LEE, H-B.; AHN, W-S.; KIM, H-J. LEE, H-J.; LEE, H. J.; GONG, G-Y.; SON, W-C. Significance of EZH2 expression in canine mammary tumors. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 164, 2016.
- CHUNG, Y.; SCHATOFF, E., ABDEL-WAHAB, O. Epigenetic alterations in hematopoietic malignancies. *Int J Hematol.* 2012.
- CHRISTOFIDES, A.; KARANTANOS, T.; BARDHAN, K. Epigenetic regulation of cancer biology and anti-tumor immunity by EZH2. 2016.
- CIRILLO, J. V. Tratamento quimioterápico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas. **Rev Inst Ciênc Saúde**, v. 26, n. 3, p. 325–327, 2008.
- CLERMONT, P-L. SUN, L.; CREA, F.; THU, K. L.; ZHANG, A.; PAROLIA, A.; LAM, W. L.; HELGASON, C. D. Genotranscriptomic meta-analysis of the Polycomb gene CBX2 in human cancers: initial evidence of an oncogenic role. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 8, p. 1663–1672, 2014.
- COMET, I.; HELIN, K. Revolution in the Polycomb hierarchy. **Nature structural & molecular biology**, v. 21, n. 7, p. 573–5, 2014.
- DE LA CRUZ, C. C.; FANG, J.; PLATH, K.; WORRINGER, K. A.; NUSINOW, D. A.; ZHANG, Y.; PANNING, B. Developmental regulation of Suz12 localization. **Chromosoma**, v. 114, n. 3, p. 183–192, 2005.
- DEB, G.; SINGH, A. K.; GUPTA, S. EZH2: not EZHY (easy) to deal. **Molecular cancer research : MCR**, v. 12, n. 5, p. 639–53, 2014.
- DEB, G.; THAKUR, V. S.; GUPTA, S. Multifaceted role of EZH2 in breast and prostate tumorigenesis: Epigenetics and beyond. **Epigenetics**, v. 8, n. 5, p. 464–476, 2013.
- DENISENKO, O.; SHNYREVA, M.; SUZUKI, H.; BOMSZTYK, K. Point Mutations in the WD40 Domain of Eed Block Its Interaction with Ezh2. v. 18, n. 10, p. 5634–5642, 1998.
- DI CROCE, L.; HELIN, K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 10, p. 1147–55, 2013.

- EDES, S.-C. R. et al. Myoepithelial cells in canine mammary tumours. **The Veterinary Journal**, v. 207, p. 45–52, 2016.
- ENTREVAN, M.; SCHUETTENGRUBER, B.; CAVALLI, G. Regulation of Genome Architecture and Function by Polycomb Proteins. **Trends in Cell Biology**, v. xx, p. 1–15, 2016.
- EZPONDA, T.; LICHT, J. Molecular Pathways: Deregulation of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Cancer—Different Paths, Same Destination. **American Association for Cancer Research**. 2014.
- FORZATI, F.; FEDERICO, A.; PALLANTE, P.; FEDELE, M.; FUSCO, A. Tumor suppressor activity of CBX7 in lung carcinogenesis. **Cell Cycle**, v. 11, n. 10, p. 1888–1891, 2012.
- FU, Y.; LUO, G. Z.; CHEN, K.; DENG, X.; YU, M.; HAN, D.; HAO, Z.; LIU, J.; LU, X.; DORÉ, L. C.; WENG, X.; JI, Q.; METS, L.; HE, C. N6-methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in *Chlamydomonas*. **Cell**, v. 161, n. 4, p. 879–892, 2015.
- GAO, Z.; ZHANG, J.; BONASIO, R.; STRINO, F.; SAWAI, A.; PARISI, F.; KLUGER, Y.; REINBERG, D. PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes. **Molecular Cell**, v. 45, n. 3, p. 344–356, 2012.
- GARDNER, H. L.; FENGER, J. M.; LONDON, C. A. Dogs as a Model for Cancer. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. annurev-animal-022114-110911, 2016.
- GANG L.; CHARLES WARDEN.; ZHAOXIA ZOU.; JOSH NEMAN.; JOSEPH S. KRUEGER.; ALISHA JAIN.; RAHUL JANDIAL.; MIKE CHEN. Altered Expression of Polycomb Group Genes in Glioblastoma Multiforme. **PLoS ONE** V. 11, n.8, 2013.
- GIL, J.; BERNARD, D.; MARTÍNEZ, D.; BEACH, D. Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. **Nature cell biology**, v. 6, n. 1, p. 67–72, 2004.
- GIL, J.; BERNARD, D.; PETERS, G. Role of polycomb group proteins in stem cell self-renewal and cancer. **DNA Cell Biol**, v. 24, n. 2, p. 117–125, 2005.
- GREER, E. L.; BLANCO, M. A.; GU, L.; SENDINC, E.; LIU, J.; ARISTIZÁBAL-C, DAVID.; HSU, C. H.; ARAVIND, L.; HE, C.; SHI, Y. DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. **Cell**, v. 161, n. 4, p. 868–878, 2015.
- GUPTA, K.; SOOD, N.; UPPAL, S. 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, Z.; XING, X.; HU, M.; ZHANG, Y.; LIU, P.; CHAI, J. Structural Basis of EZH2 Recognition by EED. **Structure**, v. 15, n. 10, p. 1306–1315, 2007.
- HARIKUMAR, A.; MESHORER, E. Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells. **EMBO Rep**, v. in press, n. 12, p. 1609–1619, 2015.
- HAYWARD, J. J.; CASTELHANO, M. G.; OLIVEIRA, K. C.; COREY, E.; BALKMAN, C. BAXTER, T. L.; CASAL, M. L.; CENTER, S. A.; FANG, M.; GARRISON, S. J.; KALLA, S. E.; KORNILIEV, P.; KOTLIKOFF, M. I.; MOISE, N. S.; SHANNON, L. M.; SIMPSON, K. W.; SUTTER, N. B.; TODHUNTER, R. J.; BOYKO, A. R. Complex disease and phenotype mapping in the domestic dog. **Nature communications**, v. 7, p. 10460, 2016.
- HE, X.-J.; CHEN, T.; ZHU, J.-K. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. **Cell Research**, v. 54, n. 3, p. 442–465, 2011.
- HERNANDO-HERRAEZ, I.; GARCIA-PEREZ, R.; SHARP, A. J.; MARQUES-BONET, T. DNA Methylation: Insights into Human Evolution. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 12, p. 1–12, 2015.
- HIBINO, S.; SAITO, Y.; MURAMATSU, T.; OTANI, A.; KASAI, Y.; KIMURA, M.; SAITO, H. Inhibitors of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) activate tumor-suppressor microRNAs in human cancer cells. **Oncogenesis**, v. 3, n. 5, p. e104, 2014.
- HINZ, S.; KEMPKENSTEFFEN, C.; CHRISTOPH, F.; KRAUSE, H.; SCHRADER, M.; SCHOSTAK, M.; MILLER, K. WEIKERT, S. Expression parameters of the polycomb group proteins BMI1, SUZ12, RING1 and CBX7 in urothelial carcinoma of the bladder and their prognostic relevance. **Tumor Biology**, v. 29, n. 5, p. 323–329, 2008.
- ITOH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K.; KUSHIMA, K.; KUSHIMA, E.; TAMADA, H.; MORITAKE, T.; NAKAO, H.; SHII, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 67, n. 3, p. 345–347, 2005.
- JITPEAN, S.; JITPEAN, S.; HAGMAN, R.; STRÖM HOLST, B.; HÖGLUND, O. V.; PETTERSSON, A.; EGENVALL, A. Breed Variations in the Incidence of Pyometra and Mammary Tumours in Swedish Dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 6, p. 347–350, 2012.
- JONES, T. I.; KING, O. D.; HIMEDA, C. L.; HOMMA, S.; CHEN, J. C.; BEERMANN, M. L.; YAN, C.; EMERSON JR., C. P.; MILLER, J. B.; WAGNER, K. R.; JONES, P. L. Individual epigenetic status of the pathogenic D4Z4 macrosatellite correlates with disease in facioscapulohumeral muscular dystrophy. **Clin Epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 37, 2015.

- KHAN, A. A.; LEE, J.; ROH, T.-Y. Polycomb group protein-mediated histone modifications during cell differentiation. **Future Medicine**, v. 7, p. 75–84, 2015.
- KIM, H. Y.; PARK, J. H.; WON, H. Y.; LEE, J. Y.; KONG, G. CBX7 inhibits breast tumorigenicity through DKK-1-mediated suppression of the Wnt/ β -catenin pathway. **FASEB Journal**, v. 29, n. 1, p. 300–313, 2015.
- KIM, D. H.; SUNG, S. Polycomb-mediated gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. **Mol Cells**, V. 37, n. 12, p. 841-850, 2014.
- KLAUKE, K. RADULOVIĆ, V.; BROEKHUIS, M.; WEERSING, E.; ZWART, E.; OLT Hof, S.; RITSEMA, M.; BRUGGEMAN, S.; WU, X.; HELIN, K.; BYSTRYKH, L.; DE HAAN, G. Polycomb Cbx family members mediate the balance between haematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. **Nature cell biology**, v. 15, n. 4, p. 353–62, 2013.
- KÖHLER, C.; VILLAR, C. B. R. Programming of gene expression by Polycomb group proteins. **Trends in cell biology**, v. 18, n. 5, p. 236–43, 2008.
- KOMAZAWA, S.; SAKAI, H.; ITOH, Y.; KAWABE, M.; MURAKAMI, M.; MORI, T.; MARUO, K. Canine tumor development and crude incidence of tumors by breed based on domestic dogs in Gifu prefecture. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 8, p. 1269–1275, 2016.
- KONDO, T.; ITO, S.; KOSEKI, H. Polycomb in Transcriptional Phase Transition of Developmental Genes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 9–19, 2016.
- KRISTIANSEN, V. M. PEÑA, L.; DÍEZ CORDOVA, L.; ILLERA, J. C.; SKJERVE, E.; BREEN, A. M.; COFONE, M. A.; LANGELAND, M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M.; SØRENMO, K. U. Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 1, p. 230–241, 2016.
- KUZMICHEV.; JENUWEIN, T.; TEMPST, PAUL.; REINBERG, DANNY. Different Ezh2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. **Molecular Cell**, v. 14, n. 2, p. 183–193, 2004.
- LAVALLE, G. E., BERTAGNOLLI, A C.; TAVARES, W L F.; CASSALI, G D. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. **Veterinary pathology**, v. 46, n. 6, p. 1275–80, 2009.
- LEE, J. J.; MURPHY, G. F.; LIAN, C. G. Melanoma epigenetics: novel mechanisms, markers, and medicines. **Laboratory Investigation**, v. 94, n. 8, p. 822–838, 2014.

LIM, H. Y.; IM, K. S.; KIM, N. H.; KIM, H. W.; SHIN, J. I.; SUR, J. H. Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. **Veterinary Journal**, v. 203, n. 3, p. 326–331, 2015.

MA, R.; ZHANG, YANG.; SUN, TING-TING.; CHENG, BO. Epigenetic regulation by polycomb group complexes: focus on roles of CBX proteins. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 15, n. 5, p. 412–428, 1 maio 2014.

MARGUERON, R.; REINBERG, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 343–9, 2011.

MIGLIORI, V.; MAPELLI, M.; GUCCIONE, E. © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . v. 2294, n. November, 2016.

MIOZZO, M.; VAIRA, V.; SIRCHIA, S. M. Epigenetic alterations in cancer and personalized cancer treatment. **Future Oncol**, v. 11, n. 2, p. 333–348, 2015.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23–38, 2013.

NAKAHIRA, R.; MICHISHITA, M.; YOSHIMURA, H.; HATAKEYAMA, H. ScienceDirect Neuroendocrine Carcinoma of the Mammary Gland in a Dog. **Journal of Comparative Pathology**, v. 152, n. 2–3, p. 188–191, 2015.

NAWAZ.; ANJALI .; ALANGAR S.; ARIVAZHAGAN A.; SANTOSH V.; SOMASUNDARAM K. Cbx7 is epigenetically silenced in glioblastoma and inhibits cell migration by targeting YAP/TAZdependent transcription. **Scientific Reports**. 2016.

NING, B.; LI, WENYUAN.; ZHAO, WEI.; WANG, R. Targeting epigenetic regulations in cancer. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 1, p. 97–109, 2015.

NI.; WANG.; ZHU X.; WAN.; XU.; LU.; XIA L.; HE.; JIANG C.; WANG.; HE. CBX7 suppresses cell proliferation, migration, and invasion through the inhibition of PTEN/Akt signaling in pancreatic cancer. **Oncotarget**. 2017.

OKTYABRI, D.; TANGE, SHOICHIRO.; TERASHIMA, MINORU.; ISHIMURA, AKIHIKO.; SUZUKI, TAKESHI. EED regulates epithelial-mesenchymal transition of cancer cells induced by TGF-?? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 1, p. 124–130, 2014.

ONG, C.; CORCES, V. G. CTCF : an architectural protein bridging genome topology and function. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. 4, p. 234–246, 2014.

PALLANTE, P.; SEPE, ROMINA.; FEDERICO, ANTONELLA.; FORZATI, FLORIANA.; BIANCO, MIMMA.; FUSCO, ALFREDO. CBX7 modulates the expression of genes critical for cancer progression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–12, 2014.

PALLANTE, P.; FORZATI, F.; FEDERICO, A.; ARRA, C.; FUSCO, A. Polycomb protein family member CBX7 plays a critical role in cancer progression. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 5, p. 1594–601, 2015.

PARRY, L.; CLARKE, A. R. The Roles of the Methyl-CpG Binding Proteins in Cancer. **Genes & cancer**, v. 2, n. 6, p. 618–30, 2011.

PARRIS, Z.; DANIELSSON A.; NEMES S.; KOVÁCS A.; DELLE U.; FALLENIOUS G.; MÖLLERSTRÖM E.; KARLSSON, P.; , HELOU K. Clinical Implications of Gene Dosage and Gene Expression Patterns in Diploid Breast Carcinoma. **American Association for Cancer Research**. 2010.

Parris, Z.; Aziz, L.; Kovács, A.; Hajizadeh; Nemes, S.; Semaan.; M.; Chen; Karlsson, P.; Helou, K. Clinical relevance of breast cancer-related genes as potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma. **biomedcentral**. 2014.

PASINI, D.; BRACKEN, A. P.; JENSEN, M. R.; LAZZERINI DENCHI, E.; HELIN, K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. **Embo J**, v. 23, n. 20, p. 4061–4071, 2004.

PASINI, D.; BRACKEN, A. P.; HANSEN, J.; CAPILLO, M.; HELIN, K. The Polycomb Group Protein Suz12 Is Required for Embryonic Stem Cell Differentiation □. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 10, p. 3769–3779, 2007.

PASINI, D.; DI CROCE, L. Emerging roles for Polycomb proteins in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 36, p. 50–58, 2016.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 10, p. 1057–1068, 2010.

POYNTER, S. T.; KADOCH, C. Polycomb and trithorax opposition in development and disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 5, n. December, p. 659–688, 2016.

RAAPHORST, F. M. et al. Poorly Differentiated Breast Carcinoma is Associated with Increased Expression of the Human Polycomb Group EZH2 Gene. **Neoplasia**, v. 5, n. 6, p. 481–488, 2003.

RAJAGOPAL, J.; STANGER, B. Z. Perspective Plasticity in the Adult: How Should the Waddington Diagram Be Applied to Regenerating Tissues? **Developmental Cell**, v. 36, n. 2, p. 133–137, 2016.

REN, C.; MOROHASHI, K.; PLOTNIKOV, A. N.; JAKONCIC, J.; SMITH, S. G.; LI, J.; ZENG, L.; RODRIGUEZ, Y.; STOJANOFF, V.; WALSH, M.; MING, M. Small-molecule modulators of methyl-lysine binding for the CBX7 chromodomain. **Chemistry and Biology**, v. 22, n. 2, p. 161–168, 2015.

RUDDOCK-D'CRUZ, N. T.; PRASHADKUMAR, S.; WILSON, K. J.; HEFFERNAN, C.; COONEY, M. A.; FRENCH, A. J.; JANS, D. A.; VERMA, P. J.; HOLLAND, M. K. Dynamic changes in localization of chromobox (CBX) family members during the maternal to embryonic transition. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 3, p. 477–488, mar. 2008.

SAUVAGEAU, M.; SAUVAGEAU, G. Polycomb group genes: Keeping stem cell activity in balance. **PLoS Biology**, v. 6, n. 4, p. 678–681, 2008.

SCELFO, A.; PIUNTI, A.; PASINI, D. The controversial role of the Polycomb group proteins in transcription and cancer: How much do we not understand Polycomb proteins? **FEBS Journal**, v. 282, n. 9, p. 1703–1722, 2015.

SCHIFFMAN, J. D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1673, p. 20140231–20140231, 2015.

SCHWARTZ, Y. B.; PIRROTTA, V. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 1, p. 9–22, 2007.

SCHWARTZ, Y. B.; PIRROTTA, V. Polycomb complexes and epigenetic states. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 266–273, 2008.

SCHWARTZ, Y. B.; PIRROTTA, V. A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. **Nature reviews Genetics**, v. 14, n. 12, p. 853–864, 2013.

SCHÄFER, V.; ERNST, J.; RINKE1, J.; WINKELMANN1; BECK, F.; HOCHHAUS; GRUHN; ERNST.; B. *EZH2* mutations and promoter hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal Cancer Research Clinical Oncologic**, 2016.

SCHWARTZ, Y. B.; PIRROTTA, V. Ruled by Ubiquitylation: A New Order for Polycomb Recruitment. **Cell Reports**, v. 8, n. 2, p. 321–325, 2014.

SCOTT, C. L.; GIL, J.; HERNANDO, E.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; NARITA, M. D.; VISAKORPI, T.; MU, D.; CORDON-CARDO, C.; PETERS, G.; BEACH, D.; LOWE, S. W. Role of the chromobox protein CBX7 in lymphomagenesis. **Pnas**, v. 104, n. 13, p. 5389–5394, 2007.

SEXTON, T.; CAVALLI, G. The role of chromosome domains in shaping the functional genome. **Cell**, v. 160, n. 6, p. 1049–1059, 2015.

SHINJO, K.; YAMASHITA, Y.; YAMAMOTO, E.; AKATSUKA, S.; UNO, N.; KAMIYA, A.; NIIMI, K.; SAKAGUCHI, Y.; NAGASAKA, T.; TAKAHASHI, T.; SHIBATA, K.; KAJIYAMA, H.; KIKKAWA, F.; TOYOKUNI, S. Expression of chromobox homolog 7 (CBX7) is associated with poor prognosis in ovarian clear cell adenocarcinoma via TRAIL-induced apoptotic pathway regulation. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 2, p. 308–318, 2014.

SILVER, I. A. The anatomy of the mammary gland of the dog and cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 7, p. 689–696, 1966.

SIMHADRI, C.; DAZE, K. D.; DOUGLAS, S. F.; QUON, T. T. H.; DEV, A.; GIGNAC, M. C. P.; FANGNI HELLER, M.; BOULANGER, M. J.; WULFF, J. E.; HOF, F. Chromodomain antagonists that target the polycomb-group methyllysine reader protein chromobox homolog 7 (CBX7). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2874–2883, 2014.

SIMON, J. A.; KINGSTON, R. E. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 10, p. 697–708, 2009.

SLEECKX, N.; DE ROOSTER, H.; VELDHUIS KROEZE, E. J B; VAN GINNEKEN, C.; VAN BRANTEGEM, L. Canine mammary tumours, an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1112–1131, 2011.

SORENMO, K. U. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 33, n. 3, p. 573–96, 2003.

SORENMO K. U.; KRISTIENSEN V. M., COFONE M. A.; SHOFER F. S.; BREEN A. M.; LANGELAND M.; MONGIL C. M.; GRONDAHL A. M.; TEIGE J.;GOLDSCHMIDT M. H. CANINE MAMMARY GLAND TUMOURS; A HISTOLOGICAL CONTINUUM FROM BENIGN TO MALIGNANT; CLINICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EVIDENCE. **veterinary and comparative oncology**, V 7, 3, P 162–172.

SORENMO, K U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M H. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011.

SU, CHIAO-WEN LIN.; MU-KUAN CHEN.; SHUN-FA YANG.; YUNG-LUEN YU. Effects of *EZH2* promoter polymorphisms and methylation status on oral squamous cell carcinoma susceptibility and pathology. **Am J Cancer Res**. 2015.

SPARMANN, A.; VAN LOHUIZEN, M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 11, p. 846–856, 2006.

SPRUIJT, C. G.; VERMEULEN, M. DNA methylation: old dog, new tricks? **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 21, n. 11, p. 949–954, 2014.

STEFANSSON, O. A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications in breast cancer and their role in personalized medicine. **American Journal of Pathology**, v. 183, n. 4, p. 1052–1063, 2013.

STEFFEN, P. A; RINGROSE, L. What are memories made of? How Polycomb and Trithorax proteins mediate epigenetic memory. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 5, p. 340–56, 2014.

TAN, J.; YAN, Y.; WANG, X.; JIANG, Y.; XU, H. EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 2, p. 161–174, 2014.

TESSARZ, P.; KOUZARIDES, T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 11, p. 703–708, 2014.

TURGEON, N.; TURGEON, N.; BLAIS, M.; DELABRE, J.; ASSELIN, C. The histone H3K27 methylation mark regulates intestinal epithelial cell density-dependent proliferation and the inflammatory response. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 5, p. 1203–1215, 2013.

UVA, P.; AURISICCHIO, L.; WATTERS, J.; LOBODA, A.; KULKARNI, A.; CASTLE, J.; PALOMBO, F.; VITI, V.; MESITI, G.; ZAPPULLI, V.; MARCONATO, L.; ABRAMO, F.; CILIBERTO, G.; LAHM, A.; LA MONICA, N.; DE RINALDIS, E. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC genomics**, v. 10, p. 135, 2009.

VISAN, S.; BALACESCU, O.; BERINDAN-NEAGOE, I.; CATOI, C. In vitro comparative models for canine and human breast cancers. **Clujul Medical**, v. 89, n. 1, p. 38–49, 2016.

Völkel, P.; Dupret, B.; Bourhis, X.; Angrand, P. Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics. **Am J Transl Res.** v. 2, n. 7, p. 175-193, 2015.

WANG, W.; QIN, J.; VORUGANTI, S.; NAG, S.; ZHOU, JIANWEI ZHANG, R. Polycomb Group (PcG) Proteins and Human Cancers: Multifaceted Functions and Therapeutic Implications. **Medicinal Research Reviews**, v. 35, n. 6, p. 1220–1267, nov. 2015.

WASSEF, M.; MARGUERON, R. The Multiple Facets of PRC2 Alterations in Cancers. **Journal of Molecular Biology**, out. 2016.

WILLIAMSON, I.; BICKMORE, W. A.; ILLINGWORTH, R. S. Polycomb-mediated chromatin compaction weathers the STORM. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 35, 2016.

WU, Z.; LEE, S T.; QIAO, Y.; LI, Z.; LEE, P L.; LEE, Y J.; JIANG, X.; TAN, J.; AAU, M.; LIM, C Z H.; YU, Q. Polycomb protein EZH2 regulates cancer cell fate decision in response to DNA damage. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 11, p. 1771–1779, 2011.

XIE, H.; XU, J.; HSU, J. H.; NGUYEN, M., Y.; PENG, C.; ORKIN, S. H. Polycomb repressive complex 2 regulated hematopoietic stem cell maintenance and differentiation in a developmental stage-specific manner. **cell Stem cell**, v. 14, n. 1, p. 68–80, 2015.

YAMAMOTO, K.; SONODA, M.; INOKUCHI, J.; SHIRASAWA, S.; SASAZUKI, T. Polycomb Group Suppressor of Zeste 12 Links Heterochromatin Protein 1 α and Enhancer of Zeste 2*. **The journal of Biological chemistry**, v. 279, n. 1, p. 401–406, 2004.

YU, H. et al. PRC2/EED-EZH2 Complex Is Up-Regulated in Breast Cancer Lymph Node Metastasis Compared to Primary Tumor and Correlates with Tumor Proliferation In Situ. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–8, 2012.

YU, M. et al. Base-resolution detection of N4-methylcytosine in genomic DNA using 4mC-Tet-assisted-bisulfite sequencing. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 21, p. e148, 2015.

Yu, Miao.; Ji, Lexiang.; Neumann, Drexel A.; Chung, Dae-Hwan.; Groom, Joseph., Westpheling, Janet.; He, Chuan.; Schmitz, Robert J

ZAKHARI, S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. **Alcohol research: current reviews**, v. 35, n. 1, p. 6–16, 2013.

ZATLOUKAL, J.; LORENZOVÁ, J., TICHÝ, F.; NEČAS, A.; KECOVÁ, H.; KOHOUT, P. Breed and Age as Risk Factors for Canine Mammary Tumours. **Acta Veterinaria Brno**, v. 74, n. 1, p. 103–109, 2005.

ZHANG.; N⁶-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. **Cell**, v. 161, n. 4, p. 893–906, 2015.

ZHANG, G.; HUANG, H.; LIU, D.; CHENG, Y.; LIU, X.; ZHANG, W.; YIN, R.; ZHANG, D.; ZHANG, P.; LIU, B.; LUO, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, N.; HE, S.; HE, C.; WANG, H.; CHEN, D. Oncogenic role of the chromobox protein CBX7 in gastric cancer. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 29, p. 114, 2010.

ZHEN,C.Y.; DUC, H. N.; KOKOTOVIC, M.; PHIEL, C. J.; REN, X. Cbx2 stably associates with mitotic chromosomes via a PRC2- or PRC1-independent mechanism and is needed for recruiting PRC1 complex to mitotic chromosomes. **Molecular biology of the cell**, v. 25, n. 23, p. 3726–39, 2014.