

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde

ESTUDO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ASSOCIADOS A  
PLURIPOTÊNCIA EM CÂNCER DE MAMA EM CADELAS

Orientanda: Beatriz Ferreira de Jesus – 13/0006521  
Orientador: Prof. Dra. Andrea Barretto Motoyama

Brasília  
2018

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde

ESTUDO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ASSOCIADOS A  
PLURIPOTÊNCIA EM CÂNCER DE MAMA EM CADELAS

Orientanda: Beatriz Ferreira de Jesus – 13/0006521

Orientador: Prof. Dra. Andrea Barretto Motoyama

Projeto apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília como pré-requisito parcial para aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso.

Brasília

2018

ESTUDO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ASSOCIADOS A  
PLURIPOTÊNCIA EM CÂNCER DE MAMA EM CADELAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial para a conclusão de  
curso de graduação em Farmácia pela  
Universidade de Brasília.

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Andréa Barretto Motoyama  
Faculdade de Ciências da Saúde – FS, Universidade de Brasília

---

Prof. Dra. Ana Carolina Mortari  
Faculdade de Agronomia e Veterinária – FAV, Universidade de Brasília

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre iluminar os meus passos a todo o momento e guiar-me sempre pelo caminho do bem.

Aos meus pais, pelo apoio, compreensão e carinho durante todas as etapas da minha vida.

Aos meus familiares, em especial meu irmão Cosme por desde o início me apoiar e me impulsionar para ser sempre uma versão melhor de mim mesma.

À minha querida orientadora, a Professora Dra. Andréa Barretto Motoyama, por acreditar em meu potencial, por me receber em seu laboratório, pelo carinho, pela compreensão, pela amizade, pelos puxões de orelha sempre bem-vindos. Muito obrigada!

A Professora Dra. Ana Carolina Mortari pelas amostras gentilmente cedidas para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos, Ellen, Leticia, Katharine, Irving, Palloma, Louise, Mariana Chiozzine, Emily, Lucas, Karina, Barbara, Gabriela Freitas, Gabriela Giovana, Mayara, Pedro, Pollyana, Ísis, Mariane, Ângela e Nayara, por me aturarem durante estes longos cinco anos, pelas brincadeiras, pelo apoio, por acreditarem em mim.

Aos meus amigos do laboratório de Patologia Molecular do Câncer, Luma, Larissa, Fernanda, Tércia e Marcos, pela ajuda e encorajamento sempre.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
  - 1.1. Epidemiologia do câncer de mama
  - 1.2. Histopatologia
  - 1.3. Pluripotência no câncer
    - 1.3.1. EpCAM
    - 1.3.2. TROP2
    - 1.3.3. MYC
    - 1.3.4. NOTCH3
2. JUSTIFICATIVA
3. OBJETIVOS
  - 3.1. Objetivo geral
  - 3.2. Objetivo específico
4. METODOLOGIA
  - 4.1. Obtenção de amostras
  - 4.2. Extração de RNA
  - 4.3. Síntese de cDNA
  - 4.4. Desenho dos oligonucleotídeos
  - 4.5. PCR convencional
5. RESULTADOS
6. DISCUSSÃO
7. CONCLUSÃO
8. REFERENCIAS
9. ANEXOS
  - 9.1. Figura 2

## LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1: Modelo esquemático das cadeias mamárias caninas.
2. Figura 2. Produtos de PCR das amostras caninas CD27, CD28, CD29 e CD30 com seus respectivos controles negativos.
3. Figura 3. Imagens de todas as ampliações observadas nos genes analisados.

## LISTA DE TABELAS

1. Tabela 1. Reagentes utilizados na síntese de cDNA.
2. Tabela 2. Sequência selecionados com o auxílio do *software* de livre acesso primer-blast.
3. Tabela 3. Lista de componentes para a reação em cadeia da polimerase.
4. Tabela 4. Expressão nas amostras caninas.

## RESUMO

Tumor de mama é o câncer mais frequente em cadelas; não há relação conhecida de incidência com raça e são afetados principalmente animais senis e os não castrados antes do primeiro cio. Devido às muitas semelhanças entre as características clínicas e no processo tumorigênico, cães podem ser utilizados como um modelo para a avaliação de tumores de mama humanos. Nesse sentido, existem alguns genes relacionados à pluripotência cuja ação é putativamente tumorigênica. A expressão de alguns desses genes—*NOTCH3*, *MYC*, *TROP2* e a molécula de adesão epitelial, *EpCAM*, e suas associações com os diferentes tipos histológicos foi analisada pela técnica de RT-PCR convencional. O presente trabalho mostrou que diferentes carcinomas mamários caninos possuem expressão desses genes que são encontrados no câncer de mama humano, porém não foi possível observar uma correlação da expressão desses genes com os tipos e subtipos de carcinomas encontrados nas amostras caninas, sendo necessários mais estudos.

Palavras-chave: câncer de mama, cadelas, genes de pluripotência, expressão diferencial de genes, marcador molecular.



# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Epidemiologia do câncer de mama**

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum em mulheres em todo o mundo. O prognóstico de pacientes com câncer da mama é, em geral, favorável devido ao diagnóstico precoce e o tratamento mais completo. Contudo, entre 20% e 30% dos pacientes desenvolvem metástases distantes, principalmente em ossos, fígado, pulmão e cérebro; por isso, complicações envolvendo esses órgãos e sistemas têm sido associadas com menor sobrevivência de pacientes (Qi Wu et al.,2017).

Tumor de mama é o câncer mais frequente também em cadelas; não há relação conhecida com raça e geralmente são afetados principalmente animais senis e os não castrados antes do primeiro cio. Cães podem ser utilizados como um modelo para a avaliação de tumores de mama humanos, devido às muitas semelhanças entre as características clínicas, fisiopatológicas, epidemiológicas e de desenvolvimento de tumores em cães e seres humanos (Gudim et al.,2016). O tratamento para câncer de mama canino preconizado é a mastectomia radical, possuindo quimioterapia adjuvante não alvo-dirigida, como é o caso em humanos, para os quais existem protocolos e esquemas terapêuticos, incluindo fármacos alvo-dirigidos.

## **1.2 Histopatologia**

As glândulas mamárias possuem uma estrutura formada por lóbulos, separados por uma fina estrutura de tecido conjuntivo, onde ductos ali presentes desembocam em canais lactíferos, sendo estes revestidos por uma dupla camada de células cúbicas ou cilíndricas. Os alvéolos são compostos por epitélios basal e luminal, sendo as células luminas responsáveis pela síntese e excreção de lipídeos e proteínas de extrema importância durante a lactação e para obter a sustentação no tecido mamário. A constituição da glândula mamária canina é de extrema importância para entender a histopatologia dos diferentes subtipos de carcinomas mamários caninos (Zuccari et al.,2002).

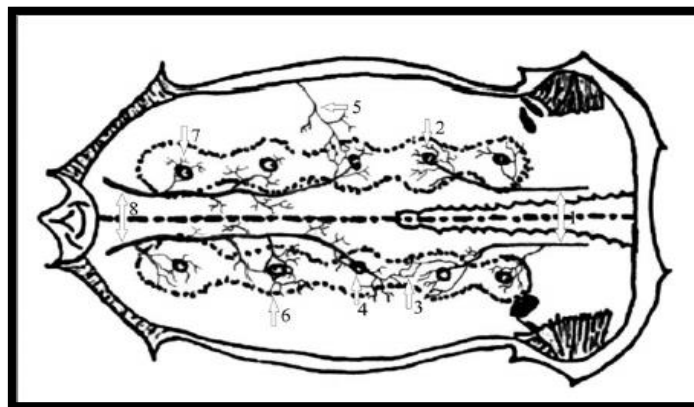
As metástases de carcinomas mamários caninos, ocorrem principalmente pela via linfática, porém existem divergências sobre a direção e conexão da drenagem linfática entre as mamas, pois as modificações anatômicas não permitem o estabelecimento da drenagem para a posterior retirada (Sorenmo et al., 2011). A cadeia mamária das cadelas é composta por cinco pares de mamas divididas em ambos os lados, sendo utilizada a classificação:

torácica cranial (M1), torácica caudal (M2), sendo de difícil remoção, abdominal cranial (M3), quando acometida deve ser realizada a mastectomia radical da cadeia mamária inteira, abdominal caudal (M4) e inguinal (M5) (Lana et al., 2007).

Dentre os subtipos caninos, o carcinoma ductal invasivo (CDI) é o mais frequente, perfazendo cerca de 80% desses casos.

De forma semelhante ao observado em humanos, os carcinomas encontrados em cadelas, em sua maioria, possuem sua origem nos ductos e encontram-se localizados (*in situ*). Os carcinomas caninos não-infiltrantes ou *in situ* são formados por nódulos bem delimitados de tecido canceroso que não invadem a membrana basal dos ductos (Goldschmidt et al.,2011). O carcinoma simples é o tipo mais presente de tumores mamários na cadela, sendo formado por apenas um tipo celular, células luminiais ou mioepiteliais, apresentando uma alta taxa de invasibilidade de tecidos proximais, de vasos sanguíneos e vasos linfáticos. Esse tipo tumoral pode ser subdividido em três tipos: carcinoma túbulo-papilar, carcinoma sólido e carcinoma anaplásico (Misdorp et al.,2008). O carcinoma dito complexo é formado pelo componente epitelial luminal e mioepitelial, onde as células epiteliais luminiais se organizam segundo um padrão sólido enquanto que as células mioepiteliais se organizam em padrão reticulado, sendo a invasibilidade desse tipo tumoral baixa (Goldschmidt et al.,2011).

Embora a classificação anatomo-patológica seja claramente reconhecível, sabe-se que a nível celular, existe uma grande heterogeneidade intra-tumoral (Vargo et al.,2007). Contudo, pouco se sabe sobre o significado desta heterogeneidade, seus possíveis impactos nas terapias ou mesmo sobre sua origem. A presença de várias células indiferenciadas, cuja origem histológica não pode ser facilmente reconhecida tem correlação com tipos tumorais mais agressivos. A falta ou perda de comprometimento com uma linhagem celular parece conferir maior potencial de crescimento às células daquele tumor (Goldschmidt et al.,2011).



**Figura 1:** Modelo esquemático das cadeias mamárias caninas. Adaptado de Rosemberg et al., 2014.

### 1.3 Pluripotência no câncer

Com relação ao perfil genético observado no câncer de mama de humano e cadelas, foi relatado que células iniciadoras de tumor (CITs), possuem a característica de pluripotência e maior capacidade de invasão, pela expressão de genes relacionados à pluripotência (geralmente fatores de transcrição, como *C-MYC*, *NOTCH3*, *TROP2*) e por perda de moléculas de adesão, *EpCAM* (Gooding et al., 2016).

O gene *MYC* é um dos Fatores de Yamanaka, pois em 2006 o grupo liderado por esse pesquisador da Universidade de Kyoto (Japão), isolou quatro genes essenciais para a produção de células pluripotentes (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* e *MYC*) induzidas. Yamanka demonstrou que a expressão exógena desses quatro fatores de transcrição era capaz de conferir fenótipo desdiferenciado e pluripotente a um fibroblasto já completamente diferenciado de um indivíduo adulto (Takahashi et al., 2006; Takahashi et al., 2007).

#### 1.3.1 *EpCAM*

A molécula de adesão de células epiteliais (*EpCAM*) é uma glicoproteína de membrana que é geralmente expressa na maioria dos carcinomas, incluindo o câncer de mama. A adesão celular é crítica, pois afeta diversas funções, dentre elas migração, proliferação, diferenciação e a inibição de contato célula-célula (Craig et al., 2011), sendo este último essencial na cicatrização e organogênese, onde a perda dessa inibição pode provocar invasão e metástases (Takai et al., 2008). A possível expressão “*de novo*” *EpCAM* que imagina-se estar relacionada ao câncer, onde a alta expressão está sendo frequentemente associada a diminuição da sobrevida em pacientes (Spizzo et al., 2002).

O gene de *EpCAM* se localiza no cromossomo 2, sendo este formado exclusivamente por nove exons codificadores que geram um polipeptídeo de 314 aminoácidos, possuindo um grande domínio extracelular (N-terminal) de 242 aminoácidos que contém três sítios de N-glicosilação, um domínio transmembrana de única extensão de 23 aminoácidos e um curto domínio citoplasmático de 26 aminoácidos (C-terminal) (Zhang et al., 2017).

*EpCAM*, assim como outras proteínas transmembranares, sofre proteólise pelo mecanismo conservado RIP (proteólise intramembranar regulada) (Stoyanova et al., 2012),

onde a clivagem do domínio intracelular permite que este entre no núcleo e regule genes alvo, como o *c-MYC* (Maetzel et al., 2009). A clivagem ocorre em seu domínio intracelular, que pode ser entre Arg80 e Arg81, produzindo desta forma um produto de 6 kDa (Munz et al., 2008). Cabe ressaltar que a maioria dos anticorpos monoclonais utilizados para identificação de *EpCAM* em células cancerígenas possuem preferência para ligação neste peptídeo (Balzar et al., 2001).

Quando *EpCAM* é comparado com a E-caderina, este é uma molécula de adesão fraca, pois a ligação célula-célula estabelecida é apenas parcialmente interligada (Winter et al., 2003). Em tecidos que apresentam a co-expressão *EpCAM* – E-Caderina, há uma redução da estabilidade da adesão devido a interação de *Epcam* com o esqueleto celular por meio da alfa-actinina, levando frequentemente a transformação tumoral (Winter et al., 2003), o que não ocorreria se houvesse apenas a presença da E-caderina, pois esta exibe funções de inibição do crescimento e supressão tumoral (Perrais et al., 2007). Além de modificar a adesão celular mediada pela E-Caderina, *EpCAM* está envolvida na regulação da integridade do epitélio, pois afeta a função e a composição de junções ocludentes por meio de interação com as Claudinas (Wu et al., 2013), (Lei et al., 2012). Nesse caso, aparentemente há formação de um complexo com a Claudina 7 que é fundamental para funcionalidades específicas do *EpCAM*, como proliferação celular, resistência a apoptose e maior potencial tumorigênico (Nübel et al., 2009).

Em estudos com murinos, a alta expressão de *EpCAM* levou a achados de invasão e metástase, sugerindo que este atua como um regulador negativo da adesão celular (Gaiser et al., 2012). *In vitro* a indução de *EpCAM* leva a regulação do fator de transcrição *c-MYC* e de proteínas do ciclo celular, Ciclina A e E (Münz et al., 2004 e 2005), por meio da via Wnt que é ativada, além do feedback positivo realizado pelo *EpCAM* em sua expressão (Maetzel et al., 2009).

Células cancerígenas metastáticas são encontradas nos vasos sanguíneos, sendo denominadas células tumorais circulantes (CTC), e são caracterizadas por geralmente expressarem esse marcador epitelial (Triantafillu et al., 2017). Evidências clínicas confirmaram que essa molécula de adesão está envolvida na agressividade do câncer sendo associada a um prognóstico ruim; ademais diversas indicações sugerem que o *EpCAM* desempenha um fator crítico no desenvolvimento, progressão e metástase do tumor, de forma que se encontra frequentemente sobre-expresso em pacientes que possuem resistência a terapia contribuindo, dessa forma, para um mau prognóstico (Zhang et al., 2017).

### 1.3.2. *TROP2*

A proteína de membrana *TROP2* foi identificada inicialmente como um marcador da superfície celular de células trofoblásticas (Shvartsur et al., 2015), que possuem alta capacidade de invasão, pois auxiliam na implantação e na formação de uma grande parte da placenta. O antígeno de trofoblasto (*TROP2*) também é conhecido por *TACSTD2* (transdutor de sinal de cálcio associado a tumor 2), *MISI* (marcador de membrana de superfície), *EGPI* (glicoproteína epitelial) e GA733-1 (antígeno gastrointestinal) (Shvartsur et al., 2015).

Esse gene é membro da família *TACSTD*, sendo esta composta por *TROP2* e *EpCAM*, onde estes possuem partes com alta identidade e similaridade. Acredita-se que a diferença na calda intracelular entre os dois membros da família é o que diferencia as diferentes vias de sinalização, o que poderia explicar as diferenças de funções e a sua distribuição nos diferentes tecidos. O gene *TROP2* codifica uma proteína de 35-49 kDa, sendo esta composta de um grande domínio extracelular, um domínio transmembrana e uma calda intracelular curta (Linnenbach et al., 1989; Basu et al., 1995; Fornaro et al., 1995).

A proteína desse gene contém doze resíduos de cisteína e quatro sítios de n-glicosilação (Linnenbach et al., 1989); no meio das regiões ricas em cisteína encontram-se domínios de tireoglobulina tipo 1 e um domínio putativo de crescimento epidérmico EGF (Linnenbach et al., 1993; Novinec et al., 2006). A função dessas repetições de tireoglobulina tipo 1 não está completamente elucidada, mas acredita-se que através da repetição dessa proteína nesse sítio, *TROP2* possa ser ativado por fatores de crescimento (Lin et al., 2012). A calda citoplasmática de *TROP2* contém um resíduo de serina que pode ser fosforilado pela proteína cinase C (PKC) (Basu et al., 1995), e ainda contém sequências de ligação para o PIP e a presença do domínio HIKE o que infere o papel desse gene na sinalização do cálcio (Alberti, 1999).

*TROP2* é expresso em diversos tipos de tecido, desde a placenta até seio urogenital, túbulos renais, pulmão, intestinos, dente, folículos capilares, pele e cérebro (Tsujikawa et al., 1999; Lu et al., 2005; McDougall et al., 2011; Trerotola et al., 2013). *TROP2* se liga diretamente a claudina 1 e 7, sendo necessária para a localização dessas junções, ora atuando como um transportador ora impedindo a degradação das mesmas pelo sistema ubiquitina-proteossoma (Nakatsukasa et al., 2010). Para *TROP2* ser ativado é necessário que ele sofra proteólise. Proteólise Intramembranar Regulada (RIP) é um mecanismo pelo qual proteases regulam a clivagem das proteínas ligadas a membrana (Lemberg, 2011), sendo este o

mecanismo pelo qual TROP2 é clivado em dois locais distintos (V188K e V286K), processo mediado pela presenilina 1 e 2 no complexo  $\gamma$ -secretase e pela enzima conversora de TNF- $\alpha$  (TACE) (Stoyanova et al., 2012).

O resultado da clivagem é um domínio intracelular, que se dirige ao núcleo e pode atuar como um fator de transcrição, e um domínio extracelular que quando sozinho, situação experimental, promove proliferação, mas não auto renovação (Stoyanova et al., 2012).

Acredita-se que *TROP2* confere promoção, progressão tumoral e metástase, pois observou que este está hiperexpresso na maioria dos tumores colorretais (Ohmachi et al., 2006), pancreático (Fong et al., 2008), carcinoma de células escamosas da laringe (Wu et al., 2013), próstata (Trerotola et al., 2013), mamário (Lin et al., 2013), pulmonar, esofágico, uterino, gliomas (Stepan et al., 2011), linfomas de células T (Chen et al., 2013) e cânceres de ovário (Bignotti et al., 2010).

Recentemente foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) o anticorpo monoclonal Sacituzumab govitecan® (IMMU-132) da Immunomedics, que consiste em um anticorpo humanizado anti-TROP2 conjugado ao fármaco irinotecano (inibidor de topoisomerase I), inicialmente desenvolvido para o tratamento de câncer de mama triplo negativo, ou seja, aquele no qual está ausente os marcadores: receptores de estrogênio, receptor de progesterona e HER2.

### 1.3.3. MYC

O gene *MYC* codifica um fator de transcrição, membro da família MYC de proto-oncogenes, que possui uma conformação tridimensional que inclui um domínio bHLH/LZ (basic helix-loop-helix leucina zipper), podendo se ligar ao DNA por esse domínio. O gene *MYC* se encontra localizado no cromossomo 8 e presume-se que seja responsável pela regulação da expressão de genes por meio de ligações em sequência de E-boxes ou por recrutamento de histona acetiltransferases, evidências mostram que a tradução do gene *c-MYC* pode começar com um códon de iniciação, AUG (metionina), como com CUG (leucina), resultando dessa forma na produção de duas isoformas (Jiang et al., 2017).

Já foi descrito que *MYC* coopera com *PI3K* (fosfatidil-inositol-3-quinase), que está ativado na proliferação celular desregulada, onde ambos estão ativados. A expressão conjunta de *MYC* e *PI3K* foi encontrada na transição epitelial mesenquimal de epitélios mamários humano para fibroblastos *in vitro* (Zhu et al., 2008).

O gene *MYC* atua na expressão do gene *WNT*, que, ao se ligar ao seu receptor

intremembrar faz com que este atue sobre a proteína APC se ligando à  $\beta$ -catenina. Esta, por sua vez, se movimenta então ativamente para o núcleo e promove a transcrição para o gene *MYC*, gerando um ciclo de regulação positiva (“*feedback*” positivo) (Polakis et al.,2000).

A ativação indevida de *MYC*, contribui para o desenvolvimento de diversos tipos de cânceres, como linfomas Hodgkin, câncer de mama e câncer colorretal. A hiperexpressão desse gene promove a transição G1-S por meio do complexo ciclina/CDK, promovendo a transcrição de E2F, desencadeando consequentemente a proliferação celular (Beier R et al.,2000). Acredita-se que o *MYC* também influencie outras vias, realizando a inibição da transcrição supressores tumorais (p21cip1, o p57kip2, o p15ink4b e o p16ink4) e atuando conjuntamente com Ras de modo complementar e sinérgico, contribuindo assim para processos oncogênicos (Lutz et al.,2002).

#### 1.3.4. *NOTCH3*

*NOTCH3* é um gene de pluripotência que foi descoberto por causa de seu papel, quando mutado, na arteriopatía cerebral autossômica dominante, com infartos subcortiais e leucoencefalopatia (*Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy* - CADASIL). Em outro estudo, porém, encontrou-se que, ao contrário de outros membros da família, *NOTCH3* poderia também inibir a proliferação de células epiteliais do câncer de mama (Chen et al.,2015).

O gene *NOTCH3*, também conhecido como CADASIL, situa-se no cromossomo 19, possuindo 33 exons (Bianchi et al., 2006). Em *Drosophila*, a interação com seus ligantes a célula estabelece uma via de sinalização intercelular que desempenha um papel essencial no desenvolvimento neural. Este gene codifica ainda um receptor transmembrana *single-pass* de 2.321 aminoácidos com um domínio extracelular, cinco domínios transmembranas, incluindo seis resíduos de cisteína, 3 repetições *Notch/LIN-12* um domínio transmembrana e um domínio intracelular (contendo sete repetições anquirina) (Correia, 2011).

A família *NOTCH* possui 4 receptores (*NOTCH1-4*) (Bellavia et al., 2008) em mamíferos, que são do tipo proteínas de membrana, sendo todos semelhantes com diferenças sutis em seus domínios citoplasmáticos e extracelulares. A cascata de sinalização dessa família não só tem um papel importante na diferenciação celular, sobrevivência, auto

renovação e proliferação, mas também tem uma função reguladora do ciclo celular. Em especial, o aumento de *NOTCH3* se faz necessário para indução da expressão de p21 nas células senescentes e a diminuição de downregulation leva a um início tardio de senescência celular, sugerindo que *NOTCH3* está fortemente correlacionado com a progressão do ciclo celular (Chen et al., 2015).

A expressão *NOTCH3* caracteriza células progenitoras auto renováveis nas glândulas mamárias e quando possui uma sinalização constitutiva se tem a geração de tumores (Choy et al., 2016).

## **2. JUSTIFICATIVA**

As diversas semelhanças clínicas e moleculares entre os tumores mamários caninos e câncer de mama humano têm sido estudadas nas últimas décadas. Patologicamente, as semelhanças são muito marcantes, como: tumores espontâneos, origem hormonal, idade de aparecimento e um curso idêntico da doença, e existe ainda coincidência das características clínicas que impactam o desfecho da doença nas cadelas e em humanos: tamanho tumoral, invasão linfonodal e a fase clínica. Também do ponto de vista molecular, os tumores mamários caninos parecem reproduzir o que ocorre no câncer de mama humano, sobretudo com relação à hiperexpressão de receptores esteróides, expressão de genes de proliferação e fator de crescimento epidérmico, mutações nos genes supressor da p53, metaloproteinases, ciclooxygenase e diversos outros (Queiroga et al., 2011).

Cabe ainda ressaltar que a espécie canina representa modelo interessante, uma vez que um mesmo animal possui 10 mamas distintas distribuídas em duas cadeias, que são retiradas totalmente quando da suspeita de tumores. Isso permite que as mamas sejam individualmente analisadas, algo interessante já que elas podem apresentar características patológicas distintas, apesar da base genética comum.

Assim, esse estudo buscou correlacionar o tipo histológico de tumores de mama de cadelas com a expressão de genes de pluripotência. Foi analisada a expressão dos genes *c-MYC*, *NOTCH3*, *TROP2* e *EpCAM* em 21 amostras de mama, coletadas no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Este estudo tem como objetivo analisar a expressão de genes relacionados à pluripotência por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sua associação com os diferentes tipos histológicos observados.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a expressão de genes *MYC*, *NOTCH3*, *TROP2* e *EpCAM* em mama de cadelas.
- Correlacionar os dados de expressão com classificação histopatológicos.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1. Obtenção de amostras**

Cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UnB de 2012 a 2014 com suspeita de câncer de mama foram doadoras de amostras, mediante consentimento de seus proprietários, tendo sido este projeto devidamente aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA), sob o número UnBDoc 120812/2011. As amostras foram cirurgicamente removidas por equipe de veterinários envolvidos no projeto, liderados pela Profa Dra Ana Carolina Mortari, da Faculdade de Agronomia e Veterinária – FAV/UnB. Cada amostra foi dividida em duas partes e onde uma foi imediatamente preservada em RNAlater, e a outra encaminhada ao setor de patologia do hospital, onde foi realizada a análise anatomo-patológica. As amostras cujos resultados dos laudos histopatológicos não demonstraram a presença de tecido maligno foram utilizadas como controles do experimento.

#### **4.2. Extração de RNA**

Os tecidos criopreservados foram inicialmente submetidos à maceração sob

resfriamento com nitrogênio líquido, sendo o material assim obtido dissolvido diretamente em Trizol. A extração de RNA foi realizada com emprego de Trizol, clorofórmio e isopropanol, de acordo com as especificações do fabricante do Trizol. O RNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro a OD de 260nm, onde as amostras utilizadas para etapas subsequentes apresentaram razões de OD260/ OD280 igual ou superior a 1,8 e integridade aceitável, conforme verificado pelo aparecimento de duas bandas bem definidas quando submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,0%.

### 4.3. Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido com kit High Capacity cDNA Synthesis (Applied Biosystems) segundo especificações do fabricante. Em resumo, 2 $\mu$ g de RNA total foram adicionados à solução de reação, contendo tampão, enzima, iniciadores randômicos e dNTPs. A reação foi incubada a 25°C por 10 min e 37°C por 2h. O cDNA assim sintetizado foi mantido a -20°C até seu uso.

**Tabela 1:** Mix dos reagentes utilizados na síntese de cDNA.

<i>Reagentes</i>	<i>Volume final</i>
10 x RT Buffer	2 $\mu$ l
2x dNTP	0,8 $\mu$ l
10x Random Primer	2 $\mu$ l
RNAse Inibitor	1 $\mu$ l
Retro - Transcriptase	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O MilliQ	4,2 $\mu$ l
Amostra	10 $\mu$ l
<i>Total</i>	20 $\mu$ l

### 4.4. Desenho de oligonucleotídeos

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram desenhados oligonucleotídeos específicos para cada gene com o auxílio do *software* de livre acesso Primer-Blast assim como os iniciadores para o gene controle endogéno gliceraldeído-3-

fosfato desidrogenase (*GAPDH*), disponível na página do NCBI <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>. Para o desenho, foram utilizadas as sequências de *Canis lupus familiaris*.

**Tabela 2:** Sequência de primers selecionados com o auxílio do *software* de livre acesso primer-blast.

Gene-alvo	Sequência dos iniciadores	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do amplicon
<b><i>GAPDH</i></b>	D: ATGCAAGGCTGAGAACGGGAAACT R: TCCACAACATACTCAGCACCAGCA	56	182
<b><i>EpCAM</i></b>	D: CTCTATGATCCCGACTGTG R: ATGATGATCCAGTGAGTCCTC	55	218
<b><i>NOTCH3</i></b>	D: TTCTCTTTATGACTGCGCCTG R: CAGAATTGGCCTGTCCATTCAGGA	58	200
<b><i>MYC-c</i></b>	D: CCCTACCCGCTGAATGACAG R: TTCTTCCTCCGACTCGCTGC	53	268
<b><i>TROP2</i></b>	D: AAGGCGCGCCAGTGCAAG R: AGGATGTGGTGGGTGCG	60	242

#### 4.5. PCR convencional

A técnica de reação em cadeia da polimerase consiste em multiplicar um trecho específico do DNA até que a concentração da solução seja tão alta que possa ser facilmente visualizada por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias. As multiplicações dos trechos específicos acontecem com auxílio de iniciadores complementares à sequência desejada, DNA polimerases e variação de temperatura de anelamento, que é específica para cada iniciador.

A reação de PCR foi realizada com auxílio dos iniciadores mencionados acima, dNTPs e de Taq polimerase, em termociclador da marca Applied Biosystems. As temperaturas de anelamento foram ajustadas para cada par de iniciadores. Os produtos de

PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose, e gravados digitalmente em fotodocumentador. As amostras foram separadas de acordo com a intensidade observada na eletroforese em gel de agarose, de forma que foram sinalizadas por um sistema de cruzes: intensidade alta (+++), intensidade media (++) , intensidade baixa (+) e não houve expressão (-).

**Tabela 3:** Lista de componentes para a reação em cadeia da polimerase.

<i>Reagentes</i>	<i>Volume utilizado por reação</i>
Tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl MgCl <sub>2</sub> 50 mM)	1,0µL
dNTPs (10 mM)	1,0µL
Taq DNA Polimerase (5 U/ µL)	0,25µL
Primer F/Primer R (10 mM)	2,0µL
H <sub>2</sub> O MilliQ	3,75µL
cDna	2,0µL
<b>Total</b>	<b>10µL</b>

## 5. RESULTADOS

Vinte e uma amostras de câncer de mama canino, proveniente de animais diferentes foram testadas. A classificação histológica adotada em carcinomas mamários caninos segue o método de classificação Elston e Ellis que é utilizada para seres humanos em carcinomas de mama ductais invasivos e outros tumores infiltrantes, sendo esta metodologia baseada no tipo celular e características do núcleo (Karayannopoulou et al.,2005; Tavasoly et al.,2013). No câncer mamário canino, os tipos mais observados são o carcinoma complexo, que possui um componente epitelial maligno e um componente mioepitelial benigno, e o carcinoma simples, que geralmente é o tipo de câncer mais agressivo, sendo majoritariamente de composição epitelial. (Tavasoly et al.,2013; Goldschmidt et al.,2012). Nas amostras

analisadas, além de carcinomas complexos, foram encontrados vários subtipos de carcinomas simples, sendo um deles o carcinoma misto, que é o mais incomum, e que possui uma mistura de componentes epiteliais malignos e componentes mesenquimatosos benignos, que podem ser cartilagem, tecido ósseo, tecido adiposo, ou mesmo combinações desses tecidos, pois esse subtipo é caracterizado pela presença de três ou mais tipos celulares apoiados em um estroma fibrovascular (Goldschmidt et al.,2012).

Apenas uma amostra era do subtipo adenoescamoso, que possui focos de células neoplásicas que realizaram diferenciação escamosa, possuindo ainda fortes características malignas (Goldschmidt et al.,2012). O subtipo carcinoma tubular simples se fez muito presente nas amostras. Esse subtipo de carcinoma simples é caracterizado por proliferações epiteliais exacerbadas e forte tendência infiltrativa em tecidos adjacentes (Goldschmidt et al.,2012).

Em todas as amostras foram analisadas a expressão dos genes de pluripotência *NOTCH3* e *c-MYC*, da molécula de adesão epitelial, *EpCAM*, e do transdutor de calcio, *TROP2*. Os tumores foram separados de acordo com a histopatologia obtida no diagnóstico, em seis tipos de tumores distintos: Carcinoma simples tubulopapilífero (n= 1), Carcinoma adenoescamoso (n= 1), Carcinoma complexo (n= 7), Carcinoma em tumor misto (n=3), Carcinoma simples tubular (n = 5) , além de hiperplasia não maligna (n=3), utilizadas como controles. Esses controles foram obtidos de amostras de cadelas que foram submetidas a mastectomia, mas cujos os laudos foram negativos para carcinoma. O gene *GAPDH* foi utilizado como controle, sendo amplificado em todas as amostras. As amostras foram classificadas de acordo com o laudo histopatológico e a intensidade de expressão de cada gene encontrada nos respectivos tumores sendo classificada em intensa, média, baixa ou ausente.

Nas amostras controle, observou-se ausência de expressão de *c-MYC*, sugerindo que sua expressão é inexistente nessas amostras. Com relação as amostras tumorais, *c-MYC* foi encontrado expresso na maioria (88%) das amostras tumorais. A sua expressão estava elevada em carcinomas complexos em quantidades elevadas (n=3), dentre os quais em apenas um *c-MYC* não pode ser detectado. Nas amostras de carcinoma simples tubular, a expressão de *c-MYC* foi semelhante ao carcinoma complexo, sendo elevada (n=3). Em carcinomas mistos, a expressão de *c-MYC* foi detectada em níveis distintos, nas 3 amostras disponíveis.

*EpCAM* não pode ser detectado em nenhuma das amostras controle, enquanto que sua expressão pode ser detectada em 83% (n=15) das amostras de carcinoma, principalmente

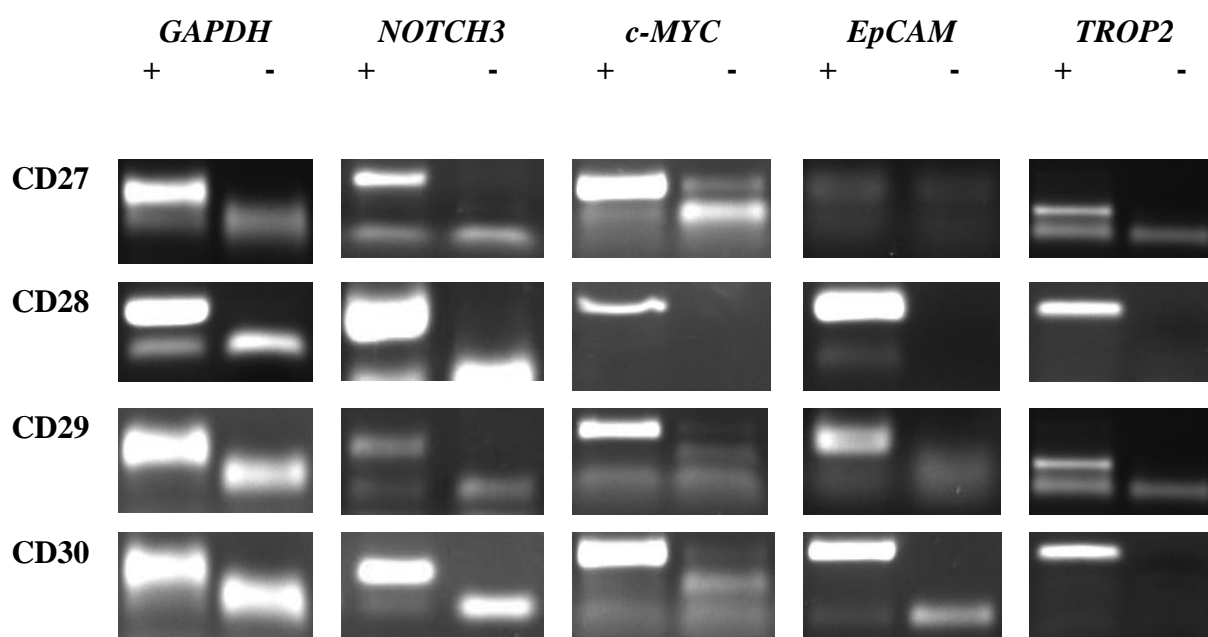
nas amostras de carcinoma complexo e de carcinoma simples tubular. No grupo de carcinoma complexo (n=7), a expressão de *EpCAM* foi encontrada baixa (n=1), moderada (n=3), ou alta (n=1), o que representou a grande maioria das amostras. No grupo do carcinoma simples tubular (n= 5), a expressão de *EpCAM* foi encontrada em todas as amostras, sendo baixa (n=3) ou alta (n=2).

Com relação à expressão de *NOTCH3*, ela foi baixa (n=2) ou ausente (n=1) nas amostras controle. Por outro lado, a expressão de *NOTCH3* foi detectada em 100% (n=18) das amostras tumorais. A presença de *NOTCH3* foi observada elevada em carcinomas complexos, onde das sete amostras desse tipo histológico, uma apresentou expressão elevada, e 4 amostras, moderada. No carcinoma misto, foi observada uma expressão aumentada de *NOTCH3*, sendo uma elevada em uma amostra e moderada em outras duas. Com relação à expressão deste gene em carcinomas simples tubulares, não foi possível qualquer correlação da expressão com o tipo histológico, uma vez que foram encontradas expressões baixas (n=2), moderada (n=1) e altas (n=2).

A expressão de *TROP2* foi encontrada como moderada nas amostras controle. Com relação à expressão do gene *TROP2*, as maiores diferenças em relação ao controle foram encontradas no grupo de carcinoma complexo (n=7), onde a expressão não foi observada em 3 amostras, ou estava baixa (n=2). Apenas em duas amostras, os níveis de *TROP2* parecem ter sido similares aos das amostras controle, sendo está uma expressão moderada. A presença de *TROP2* com maior intensidade foi encontrada nas amostras de carcinoma simples tubulopapilífero, adenoescamoso e misto, sendo esses todos carcinomas de maior caráter maligno.

**Tabela 4:** Expressão encontrada dos genes nas amostras caninas. Intensidade alta (+++), intensidade media (++) , intensidade baixa (+) e não houve expressão (-).

<b>Amostras</b>	<b>Diagnostico Histopatológico</b>	<i>c-MYC</i>	<i>NOTCH3</i>	<i>EpCAM</i>	<i>TROP2</i>	<i>GAPDH</i>
<b>CD17</b>	Carcinoma simples tubulopapilifero	+++	+	+	+++	++
<b>CD08</b>	Carcinoma adenoescamoso	-	+++	+	+++	++
<b>CD04</b>	Carcinoma complexo	-	+	-	++	++
<b>CD14</b>	Carcinoma complexo	++	++	+	+	++
<b>CD15</b>	Carcinoma complexo	+++	++	-	-	++
<b>CD19</b>	Carcinoma complexo	+++	++	++	-	++
<b>CD22</b>	Carcinoma complexo	+++	+++	+++	-	++
<b>CD29</b>	Carcinoma complexo	++	+	++	+	++
<b>CD30</b>	Carcinoma complexo	++	++	++	++	++
<b>CD07</b>	Carcinoma em tumor misto	-	++	-	+	++
<b>CD20</b>	Carcinoma em tumor misto	+++	++	+	+++	++
<b>CD26</b>	Carcinoma em tumor misto	++	+++	+	-	++
<b>CD18</b>	Carcinoma simples tubular	+++	+	+	+	++
<b>CD23</b>	Carcinoma simples tubular	+++	+++	+++	+	++
<b>CD24</b>	Carcinoma simples tubular	++	+	+	-	++
<b>CD25</b>	Carcinoma simples tubular	++	++	+	-	++
<b>CD28</b>	Carcinoma simples tubular	+++	+++	+++	++	++
<b>CD27</b>	Carcinoma tubulopapilifero	++	++	+	+	++
<b>CD01</b>	Controle hiperplasia	-	+	-	++	++
<b>CD02</b>	Controle hiperplasia	-	+	-	++	++
<b>CD03</b>	Controle hiperplasia	-	-	-	++	++



**Figura 2:** Produtos de PCR das amostras caninas CD27, CD28, CD29 e CD30 com seus respectivos controles negativos.

## 6. DISCUSSÃO

A análise molecular dos tumores, tanto de cadelas, quanto humanos, poderá identificar genes que, quando expressos podem tanto ser alvos de drogas, quanto servir como marcadores prognósticos. Nesse sentido, aqui escolheu-se analisar genes de pluripotência que parecem manter o caráter indiferenciado (e portanto, mais agressivo) dos tumores. Foram utilizadas 21 amostras, sendo 3 controles com hiperplasia benigna, e 18 amostras de carcinoma mamário. Em todas elas, foi analisada a expressão dos genes *c-MYC*, *NOTCH3*, *EpCAM* e *TROP2*.

Embora os genes aqui estudados sejam constitutivamente expressos nos tecidos, é possível que a falta de detecção do RNA mensageiro de ambos os genes indique que eles estão sendo expressos em níveis baixos, onde mesmo dessa forma no caso de *c-MYC*, a proliferação celular controlada continue ocorrendo. A ausência de *EpCAM* nos controles pode ser justificada pela possível baixa quantidade de células epiteliais presentes na amostra, pois como um marcador de células epiteliais, este deveria ser detectável nos tecidos, como no caso das mamas. No entanto, deve-se considerar duas variáveis que interferem diretamente na análise em questão: primeiro na mama, enquanto órgão tridimensional, encontram-se mais células adiposas que células epiteliais, portanto, a falta de detecção



de *EpCAM* nos controles pode simplesmente significar que havia um número normal, e relativamente pequeno de células epiteliais ali presentes; segundo deve-se ressaltar que a PCR convencional não é o método mais sensível de detecção e, portanto, pode não ser capaz de identificar quantidades pequenas de mRNA do gene alvo.

A expressão dos genes de pluripotência em conjunto em uma mesma amostra concorda com alguns estudos em cânceres humanos que mostram a expressão “de novo” dos genes *EpCAM* e *NOTCH3*, normalmente expressos em maior quantidade na fase embrionária, aumenta a expressão do oncogene *c-MYC* (Munz et al.,2004; Choy et al.,2017). Os resultados aqui obtidos estão de acordo com os trabalhos citados, ou seja *c-MYC* sendo estimulado por *NOTCH3* e *EpCAM*, sendo possível observar a expressão desses três genes juntos em uma mesma amostra, como foi o caso em algumas amostras de carcinoma simples tubular e em carcinomas complexos, contudo não se pode afirmar que esses três genes estão agindo de forma conjunta na progressão do tumor mamário canino da mesma forma ao encontrado no humano.

A proteína transmembrana *TROP2* pode ser ativada por anticorpos que medeiam a reticulação das células que o reconhecem, podendo ser ativados internamente, e por autólise intramembranar regulada. A proteína de *TROP2*, após clivagem, se localiza na superfície celular e a outra parte se encontra no citoplasma. Alguns estudos mostram que as porções clivadas de *TROP2* possuem uma significância diferente na progressão de carcinomas. A porção localizada na membrana foi associada como determinantes na agressividade de carcinomas mamários e seus subtipos onde a sua presença leva a um prognóstico desfavorável, já a parte intramembranar acredita-se que possui um impacto mais positivo tanto na sobrevida como na recorrência tumoral, pois como possuem quatro sítios de N-glicosilação essas podem acontecer no citoplasma e torná-lo ativo novamente (Lin H et al., 2012; Trerotola et al.,2013; Guerra et al.,2013). Nas amostras caninas utilizadas não foi possível realizar a diferenciação do local onde se encontram, dado que foi utilizado o RNA obtido da maceração da amostra para a síntese do DNA complementar, porém é possível observar que a presença de *TROP2* é intensa em carcinoma simples tubulopapilífero, carcinoma adenoescamoso e carcinoma misto, todos eles possuem caráter maligno, possuindo alta taxa de invasibilidade de tecidos proximais, de vasos sanguíneos e vasos linfáticos.

*MYC* foi observado em carcinomas simples de forma moderada a intensa, porém também está sendo expresso em carcinomas complexos da mesma maneira, deixando o questionamento se a sua expressão nesse subtipo de tumor anteriormente denominado com

características benignas possa conferir a esse tipo histológico uma característica mais agressiva, infiltrativa e metastática (Jiang et al., 2017).

Presença de *EpCAM* em tumores é considerado como um prognóstico ruim para a sobrevivência do paciente, de modo que a sua presença mostra o tipo celular que o originou, sendo os carcinomas metastáticos podem possuir uma quantidade considerável desse marcador epitelial (Zhang et al., 2017). Amostras de diferentes tipos histopatológico o expressa, mostrando a origem tumoral dos mesmos e o grau de invasividade que poderiam possuir. *EpCAM* está comumente expresso em carcinomas mamários humanos, acreditando-se que a sua presença desempenha proliferação celular acelerada, inibição de adesão célula-célula, migração e diferenciação (Gao et al., 2015). Entretanto a expressão de *EpCAM* não foi observada em todas as amostras caninas sendo necessário uma amostragem maior para observar o padrão de expressão nos diferentes tipos de carcinomas caninos.

## **7. CONCLUSÃO**

O presente trabalho mostrou que diferentes carcinomas mamários caninos possuem a expressão de genes relacionados com a pluripotência que são encontrados no câncer de mama humano. No entanto, não foi possível observar uma correlação da expressão desses genes com os tipos e subtipos de carcinomas encontrados nas amostras caninas, sendo então necessários mais estudos para elucidar essa questão.

## 8. REFERÊNCIAS

- AGATA RYBICKA; MAGDALENA KRÓL. **Identification and characterization of cancer stem cells in canine mammary tumors.** Rybicka and Król Acta Vet Scand, p. 58-86, 2016.
- AL-HAJJ M, WICHA MS, BENITO-HERNANDEZ A et al. **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** Proc Natl Acad Sci U S A; 100: 3983-8, 2003.
- BEIER R, BURGIN A, KIERMAIER A, FERRO M, KARSUNKY H, SAFFRICH R, et al. **Induction of cyclin E-cdk2 kinase activity, E2F-dependent transcription and cell growth by Myc are genetically separable events.** EMBO J. v. 19, p. 5813-23, 2000.
- BELLAVIA D, CHECQUOLO S, CAMPESE AF, FELLI MP, GULINO A, SCREPANTI I. **Notch3: from subtle structural differences to functional diversity.** Oncogene. v. 38, p.5092-8, 2008.
- BIANCHI S, DOTTI MT, FEDERICO A. **Physiology and pathology of notch signalling system.** J Cell Physiol, v. 2, p. 300-8, 2006.
- BOIANI M, GENTILE L, GAMBLES VV et al. **Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones: distinct developmental potentials in different culture environments.** Stem Cells 2005; 23: 1089-104.
- BOURGUIGNON LY, SPEVAK CC, WONG G et al. **Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C(epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the Production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, antiapoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells.** J Biol Chem 2009; 284: 26533-46.
- C. BOGER; S. KRUGER, H. M. BEHRENS et al. **Epstein–Barr virus-associated gastric cancer reveals intratumoral heterogeneity of PIK3CA mutations.** Annals of Oncology, v.28, p.1005–1014, 2017.
- C.J. WU, P. MANNAN, M. LU, M.C. UDEY. **Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) regulates claudin dynamics and tight junctions** J. Biol. Chem. (2013).

CHAFIKA MAZOUNI; FRÉDÉRIC FINA; SYLVIE ROMAIN; L'HOUCINE OUAFIK; PASCAL BONNIER; PIERRE-MARIE MARTIN. **Outcome of Epstein-Barr virus-associated primary breast cancer.** *Molecular and clinical oncology*, v. 3, p. 295-298, 2015.

CHAMBERS I, COLBY D, ROBERTSON M et al. **Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.** *Cell* 2003; 113: 643-55.

CHAVESPÉREZ, B. MACK, D. MAETZEL, H. KREMLING, C. EGGERT, U. HARRÉU S, O. GIRES. **EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression** *Oncogene* (2012), pp. 1-10.

CHUN-FA CHEN, XIAO-WEI DOU, YUAN-KE LIANG et al. **Notch3 overexpression causes arrest of cell cycle progression by inducing Cdh1 expression in human breast cancer cells.** *Cell circle*, v. 15, n. 3, p. 432–440, 2016.

COVAS DT. **A Identificação das Células-Tronco.** In: Zago MAC, D.T., ed. *Células-Tronco A nova fronteira da medicina.* São Paulo: Ed Atheneu, 2006; 87-92.

D. MAETZEL, S. DENZEL, B. MACK, M. CANIS, P. WENT, M. BENK, C. KIEU, P. P APIOR, P.A. BAEUUELE, M. MUNZ, O. Gires. **Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM** *Nat. Cell Biol.*, 11 (2009), pp. 162-171.

DI HUANG; SHI-JIAN SONG, ZI-ZHAO WU et al. **Epstein-Barr virus-induced VEGF and GM-CSF drive nasopharyngeal carcinoma metastasis via recruitment and activation of macrophages.** *Manuscrito do autor*, 2017.

DONG HA KIM; MEE SOO CHANG; CHAN JIN YOON et al. **Epstein-Barr virus BARF1-induced NFκB/miR-146a/SMAD4 alterations in stomach cancer cells.** *Oncotarget*, v. 7,n. 50, p. 82213-82227, 2016.

FLETCHER JI, HABER M, HENDERSON MJ et al. **ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps.** *Nat Rev Cancer*; 10: 147-56.

GAO J, LIU X, YANG F, LIU T, YAN Q, YANG X. BY. **Inhibiting Ras/Raf/ERK and MMP-9, knockdown of EpCAM inhibits breast cancer cell growth and metastasis.** *Oncotarget.*;6(29):27187-27198. 2015.

G.S. SPIZZO, P.O. BRIST, C.E. NSINGER, I.T. HEUEL, D.U. Martina. **Prognostic significance of Ep-CAM and Her-2/ neu overexpression in invasive breast cancer** Int. J. Cancer, 98 (2002), pp. 883-888.

GAVAI AV, QUESNELLE C, NORRIS D et al. Discovery of Clinical Candidate BMS-906024: **A Potent Pan-Notch Inhibitor for the Treatment of Leukemia and Solid Tumors**. ACS Med Chem Lett, v. 6, p.523-7, 2015.

GLENN WK, HENG B, DELPRADO W, IACOPETTA B, WHITAKER NJ, et al. **Epstein-Barr Virus, Human Papillomavirus and Mouse Mammary Tumour Virus as Multiple Viruses in Breast**. Cancer. PLoS ONE 7, v. 11, 2012.

GONZÁLEZ, S. DENZEL, B. MACK, M. CONRAD, O. GIRES. **EpCAM is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype**. Stem Cells, 27 (2009), pp. 1782-1791.

GUERRA E, TREROTOLA M, ALOISI AL, TRIPALDI R, VACCA G, et al. **The Trop-2 signalling network in cancer growth**. Oncogene 32: 1594–1600. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA/MS) PRÓ-ONCO. **Câncer da mama**, Disponível: <http://www.inca.org.br/etast/tipos/mama.html>. (capturado em 01 de maio de 2017).

IVANOVA NB, DIMOS JT, SCHANIEL C et al. **A stem cell molecular signature**. Science; 298: p. 601-4, 2002.

J.M. CHONG, D.W. SPEICHER. **Determination of disulfide bond assignments and N-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM)** J. Biol. Chem., 276 (2001), pp. 5804-5813.

JIANG, Y., HAN, K., CHEN, S. et al. **Isolation, characterization, and expression of proto-oncogene cMyc in large yellow croaker *Larimichthys crocea***. Fish Physiology and Biochemistry, p.1-19, 2017.

KARAYANNOPOULOU M<sup>1</sup>, KALDRYMIDOU E, Constantinidis TC, Dessiris A. **Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method.** J Comp Pathol. 2005 Nov;133(4):246-52.

LANA, S. E.; RUTTERMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Small Animal Clinical Oncology. 4 ed. ST. Louis: Saunders Elsevier, p. 619-636, 2007,

LIANG J, WAN M, ZHANG Y et al. **Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells.** Nat Cell Biol 2008; 10: 731-9.

LÍGIA F. GUNDIN, CAMILA P. DE ARAÚJO, WILLIAN T. BLANCA et al. **Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade.** The Canadian Journal of Veterinary Research, v. 80, p.318–322, 2016.

LIN H, HUANG JF, QIU JR, ZHANG HL, TANG XJ, et al... **Significantly upregulated TACSTD2 and Cyclin D1 correlate with poor prognosis of invasive ductal breast cancer.** Exp Mol Pathol, 2012.

LISA CHOY; THIJS J. HAGENBEE; MARGARET SOLO; DOROTHY FRENCH; DAVID FINLKE; AMY SHELTON; RAYNA VENOOK; MATTHEW J. BRAUER; CHRISTIAN W. SIEBEL. **Constitutive NOTCH3 Signaling Promotes the Growth of Basal Breast Cancers.** Cancer Research, California, v. 77, n. 6, 2017.

LIU R, WANG X, CHEN GY et al. **The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells.** N Engl J Med 2007; 356: 217-26.

LOO TW, CLARKE DM. **Drugs Modulate Interactions between the First Nucleotide-Binding Domain and the Fourth Cytoplasmic Loop of Human P-Glycoprotein.** Biochemistry, v.55, p.2817-20, 2016.

LUIZ, Carlos Rosemberg et al. **Estudo comparativo da irrigação da papila mamária em cães sem raça definida (Canis familiaris, Linnaeus, 1758).** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.vol.41, n.1, pp.20-24, 2004.

LUTZ W, LEON J, EILERS M. **Contributions of Myc to tumorigenesis.** Biochim Biophys

Acta, V. 1602, p. 61-71, 2002.

M. BALZAR, I.H. BRIAREDEBRURUIJIN, H.A.M. REESBAKKER, F.A. PRINS, W. H ELFRICH, L. DeLEIJ, G.RIETHMULLER, S. ALBERTI, S.O. WARNAAR, G.J. FLEUR EN, LITVINOV. **Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions.** Mol. Cell. Biol., 21, pp. 2570-2580. 2001.

M. MUNZ, C. KIEU, B. MACK, B. SCHMITT, R. ZEIDLER, O. GIRES. **The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation** Oncogene, 23, pp. 5748-5758. 2004.

M. MUNZ, K. FELLINGER, T. HOFMANN, B. SCHMITT, O. GIRES. **Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM.** Front. Biosci., 13, pp. 5195-5201. 2008.

M. MUNZ, R. ZEIDLER, O. GIRES. **The tumour-associated antigen EpCAM upregulates the fatty acid binding protein E-FABP** Cancer Lett., 225, pp. 151-157. 2005.

M. PERRAIS, X. CHEN, M. PEREZ-MORENO. **E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions.** Mol. Biol. Cell, 18, pp. 2013-2025. 2007.

M.J. WINTER, I.D. NAGTEGAAL, J.H.J.M. VAN KRIEKEN, S.V. LITVINOV. **The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology** Am. J. Pathol., 163, pp. 2139-2148. 2003.

M.R. GAISER, T. LAMMERMANN, X. FENG, B.Z. IGYARTO, D.H. KAPLAN, L. TES SROLLO, R.N. GERMAIN, M.C. UDEY. **Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109, pp. E889-E897. 2012.

MARIA ISABEL CARVALHO; RICARDO SILVA-CARVALHO; ISABEL PIRES et al. **A Comparative Approach of Tumor-Associated Inflammation in Mammary Cancer**

**between Humans and Dogs.** BioMed Research International, 2016.

MELANIE SPITZWIESER; CHRISTINE PIRKER; BETTINA KOBLMULLER. **Promoter methylation patterns of ABCB1, ABCC1 and ABCG2 in human cancer cell lines, multidrug-resistant cell models and tumor, tumor-adjacent and tumor-distant tissues from breast cancer patients.** Oncotarget, v. 7, n. 45, 2016.

MITSUI K, TOKUZAWA Y, ITOH H et al. **The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.** Cell ; 113, p.631-42, 2003.

N.V. SANKPAL, M.W. WILLMAN, T.P. FLEMING, J.D. MAYFIELD, W.E. GILLANDERS. **Transcriptional repression of epithelial cell adhesion molecule contributes to p53 control of breast cancer invasion** Cancer Res., 69, pp. 753-757, 2009.

PANWAR A, BATRA R, LYDUATT WM, GANTI AK. **Human papilloma virus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: a growing epidemic.** Cancer Treat Rev. v.40, p.215–9, 2014.

RAOUF A, ZHAO Y, TO K et al. **Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process.** Cell Stem Cell; v.3: p.109-18, 2008.

RIPANI E, SACCHETTI A, CORDA D, ALBERTI S. **The human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer.** Int J Cancer 76: 671–676, 1998.

RUIYUAN ZHANG; MICHAEL J STRONG; MELODY BADDOO et al. **Interaction of Epstein-Barr virus genes with human gastric carcinoma transcriptome.** Oncotarget, Advance Publications, 2017.

S.E.L. CRAING, S.M. BRADY-KALNAY. **Cancer cells cut homophilic cell adhesion molecules and run** Cancer Res., 71, pp. 303-309, 2011.

SHIPITSIN M, CAMPBELL LL, ARGANI P et al. **Molecular definition of breast tumor heterogeneity.** Cancer Cell ; 11: 259-73, 2007.

SHVARTSUR, A., & BONAVIDA, B. **Trop2 and its overexpression in cancers:**



**regulation and clinical/therapeutic implications.** *Genes & Cancer*, 6(3-4), 84–105, 2015.

SOHEILI S, ASADI MH, FARSINEJAD A. **Distinctive expression pattern of OCT4 variants in different types of breast cancer.** *Cancer Biomark*, v. 1, p.69-76, 2017.

SORENMO K.U.; KRISTIANSSEN V.M.; COFONE M.A.; SHOFRER 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.** *Vet. Comp. Oncol.*, v. 7, p. 162-172, 2009.

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.

SPRADLING A, DRUMMOND-BARBOSA D, KAI T. **Stem cells find their niche.** *Nature*; 414: 98104, 2011.

STEPAN LP, TRUEBLOOD ES, HALE K, BABCOOK J, BORGES L, SUTHERLAND CL. **Expression of Trop2 cell surface glycoprotein in normal and tumor tissues: Potential implications as a cancer therapeutic target.** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 59:701–710, 2011.

STOYANOVA T, GOLDSTEIN AS, CAI H, DRAKE JM, HUANG J, WITTE ON. **Regulated proteolysis of Trop2 drives epithelial hyperplasia and stem cell self-renewal via beta-catenin signaling.** *Genes Dev*; 26:2271–2285, 2011.

T. NUBEL, J. PREOBRASCHENSKI, H. TUNCAY, T. WEISS, S. KUHN, M. LADWEIN, L. LANGBEIN, M. ZOLLER. **Claudin-7 regulates EpCAM-mediated functions in tumor progression** *Mol. Cancer Res.*, 7, pp. 285-299, 2009.

T.Y. LU, R.M. LU, M.Y. LIAO, J. YU, C.H. CHUNG, C.F. KAO, H.C. WU. **Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells** *J. Biol. Chem.*, 285, pp. 8719-8732, 2010.

TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, YAMANAKA S. **Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.** *Cell*. 30;131(5) p.861-72, 2007.

TAKAHASHI K, YAMANAKA S. **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** *Cell*. v.126(4), p.663-76, 2006.

TOJIMA M; SAITO S; YAMAMOTO Y; MIZUNO T; IHARA M; FUKUDA H. **Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy with a Novel *NOTCH3* Cys323Trp Mutation Presenting Border-Zone Infarcts: A Case Report and Literature Review.** *Journal of stroke and cerebrovascular diseases: The official journal of National Stroke Association. China*, v. 25, n. 8, p. 128–130, 2016.

TREROTOLA M, CANTANELLI P, GUERRA E, TRIPALDI R, ALOISI AL, et al. **Up-regulation of Trop-2 quantitatively stimulates human cancer growth.** *Oncogene* 32: 222–233, 2013.

TURUNEN AARO; RAUTAVA JAANA; GRÉNMAN REIDAR et al. **Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNAs (EBERs) associated with poor prognosis of head and neck carcinomas.** *Oncotarget*, v. 8, n. 16, p. 27328-27338, 2017.

VAN de VIJVER MJ, HE YD, VAN'T VEER LJ et al. **A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.** *N Engl J Med* 2002; 347: 1999-2009.

WICHA MS, LIU S, DONTU G. **Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift.** *Cancer Res*; 66: 1883-90; discussion 95-6, 2006.

WU Q ; LI J ;ZHU S ;WU J ;CHEN C ;LIU Q ;WEI W ;ZHANG Y ;SUN S. **Breast cancer subtypes predict the preferential site of distant metastases: a SEER based study.** *Oncotarget*, China, v. 8, p. 27990-27996, 2017.

Y. TAKAI, J. MIYOSHI, W. IKEDA, H. OGITA. **Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, pp. 603-615, 2008.

YANG SL; REN QG; ZHANG T; PAN X; WEN L; HU JL; YU C; HE QJ. **Hepatitis B virus X protein and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stimulate Notch gene expression in liver cancer cells.** *Oncology reports, China*, v. 37, n. 1, p. 348-356, 2016.

Z. LEI, T. MAEDA, A. TAMURA, T. NAKAMURA, Y. YAMAZAKI, H. SHIRATORI, K. YASHIRO, S. TSUKITA, H. HAMADA. **EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins.** *Dev. Biol.*, 371, pp. 136-145, 2012.

ZHANG Q; LI Q; JIANG H; XU LG. **MiR-491-5p suppresses cell growth and invasion by targeting Notch3 in nasopharyngeal carcinoma.** *Oncology reports, China*, v. 3, n. 6, p. 3541-3547, 2016.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. **Expressão dos filamentos intermediários no diagnóstico dos tumores mamários de cadelas.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, n.6, 2002.

## 9. ANEXOS

9.1. **Figura 3.** Imagens de todas as ampliações observadas nos genes analisados.

