TATIANE MORENO FERRARIAS EPIPHANIO

**Estudo da metilação global do DNA no sangue periférico de
cães saudáveis e cães com câncer**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa Dra Maria Lucia Zaidan Dagli

**SÃO PAULO
2018**

TATIANE MORENO FERRARIAS EPIPHANIO

**Estudo da metilação global do DNA no sangue periférico de
cães saudáveis e cães com câncer**

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Biblioteca da Unidade do Programa de Oncologia e na
Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa Dra Maria Lucia Zaidan Dagli

**SÃO PAULO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Epiphanio, Tatiane Moreno Ferrarias
Estudo da metilação global do DNA no sangue
periférico de cães sadios e cães com câncer /
Tatiane Moreno Ferrarias Epiphanio. -- São Paulo,
2017.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Maria Lucia Zaidan Dağli.

Descritores: 1.Cães 2.Neoplasias 3.Epigenética
4.Metilação de DNA 5.Linfoma 6.Leucócitos

USP/FM/DBD-410/17

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e grandes pais, Darci e Antonio, minha imensa gratidão e admiração.

AGRADECIMENTOS

Gratidão a meu companheiro de vida e incentivador Rui, pelo apoio incondicional, carinho e paciência nos momentos calmos e agitados de nosso caminhar juntos.

Gratidão a minha irmã pelo apoio e longas conversas e risadas. Amo você!!

Gratidão a minha querida amiga irmã Elã, por sempre iluminar o meu caminho nos momentos difíceis, e também pelos grandes momentos de alegria e felicidade que passamos juntas. Minha eterna gratidão.

Gratidão aos amigos Pri, Paty e Luiz pelo carinho, incentivo, apoio e auxílio.

Gratidão à Marguis, amiga que conquistei... saudades de nossas longas conversas sobre a vida.

Gratidão à Nayra, uma pessoa especial que me ajudou muito a superar as dificuldades encontradas durante esse período, a levarei no meu coração pra toda a minha vida. Gratidão por ter conhecido a Ka, que me traz sempre muita alegria e admiração.

Gratidão aos novos amigos conquistados durante jornada: Andrea, Marcias e Daniel.

Gratidão à querida profa Maria Lucia Zaidan Dagli, por ter me recebido de braços abertos, por participar da minha evolução na área de oncologia e que hoje tenho como exemplo de profissional e mulher.

Gratidão pela minha profissão, por me permitir cuidar e dar conforto a seres tão especiais e iluminados. Obrigada aos cães por contribuírem com paciência durante as coletas.

Enfim, obrigada a Deus, às Deusas, aos Anjos por sempre me acompanharem e permitirem que concluísse essa nova etapa.

RESUMO

Epiphany TMF. Estudo da metilação global do DNA no sangue periférico de cães saudáveis e cães com câncer [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

O linfoma não-Hodgkin (LNH) é bastante prevalente em cães e atualmente é aceito como modelo comparativo da doença em humanos. Padrões aberrantes de metilação de DNA parecem exercer um papel chave no desenvolvimento de tumores hematopoiéticos nos seres humanos, constituem um mecanismo especial de controle transcricional e podem ser influenciados por alterações genéticas e ambientais. Os efeitos da metilação global do DNA têm sido raramente investigados em cães, principalmente em processos neoplásicos. O objetivo do presente estudo foi quantificar a metilação global do DNA em leucócitos sanguíneos de cães portadores de LNH, comparando com a metilação global do DNA de leucócitos sanguíneos de cães saudáveis e identificar genes diferentemente metilados nas mesmas amostras. Para isto, utilizou-se o DNA obtido da capa leucocitária de amostras de sangue venoso periférico de 10 cães saudáveis e 9 cães com LNH multicêntrico. Para imunofenotipagem dos linfomas, aplicou-se o painel imunocitoquímico de anticorpos anti-CD79a, anti-PAX5 e anti-CD3. O índice de proliferação celular foi obtido por meio da contagem de núcleos positivos para Ki-67. A metilação global do DNA dos leucócitos foi quantificada pelo método *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e visualmente (por escores) em amostras submetidas a imunocitoquímica (ICQ) com o anticorpo anti-5-metil citosina (5MetCyt). Para a identificação de genes diferentemente metilados entre ambos os grupos avaliados, utilizou-se a técnica de *beadchip* com o ensaio *Infinium Methylation*

EPIC BeadChip humano (850K). Como resultados, em ambos os métodos (HPLC e ICQ), os leucócitos sanguíneos de cães portadores de LNH apresentaram metilação global do DNA significativamente inferior à dos cães saudáveis (HPLC: $p=0,027$ / ICQ: $p=0,015$). Das 853.307 ilhas CpGs investigadas no microarranjo, houve hibridização de 34.574 sondas nas amostras caninas. Desse total, observou-se diferença significativa em nível de metilação de 606 sondas, e por meio da análise das similaridades homólogas e ortólogas, identificou-se 550 genes diferentemente metilados entre os dois grupos. Nosso estudo foi pioneiro em sugerir que cães com LNH apresentam hipometilação global do DNA de leucócitos circulantes quando comparados a cães saudáveis. Apesar de termos usado amostras caninas em um ensaio desenvolvido especificamente para o DNA humano (*Infinium Methylation EPIC BeadChip*) foi possível a identificação de genes diferentemente metilados e possíveis novos alvos com potencial preventivo ou terapêutico. Futuros estudos epidemiológicos são necessários para correlacionar o padrão de metilação de leucócitos com o risco de desenvolver linfomas e utilizá-lo como biomarcador.

Descritores: cães; neoplasias; epigenética; metilação de DNA; linfoma; leucócitos

ABSTRACT

Epiphany TMF. *Global DNA methylation in peripheral blood of healthy dogs and dogs bearing cancer* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Non-Hodgkin's lymphoma is quite prevalent in dogs and it is currently accepted as a comparative model for the disease in humans. Aberrant patterns of DNA methylation appear to play a key role in the development of hematopoietic tumors in humans, constitute a special mechanism of transcriptional control and may be influenced by genetic and environmental variations. The effects of methylation have been rarely investigated in dogs, especially in neoplastic processes. The aim of the current study is to quantify the global DNA methylation of blood from dogs bearing non-Hodgkin's lymphoma, comparing them with the methylation content and pattern of healthy dogs and identify differently methylated genes in the same samples. For this, the DNA obtained from the buffy coat of peripheral venous blood samples from 10 healthy dogs and 9 dogs with multicentric non-Hodgkin's lymphoma were used. For immunophenotyping of lymphomas, the immunocytochemical panel of anti-CD79a, anti-PAX5 and anti-CD3 antibodies were applied. The cell proliferation index was performed by counting positive nuclei with anti-Ki-67. The global methylation of leukocyte DNA was quantified by the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method and visually (by scoring) in samples subjected to immunocytochemistry (ICQ) with the anti-5-methyl cytosine antibody (5MetCyt). For the identification of differently methylated genes between both groups, the bead chip technique was used with the *Infinium Methylation EPIC BeadChip* human assay (850K). As a result, in both methods (HPLC and ICQ), dogs with non-Hodgkin's lymphoma had a lower amount of methylation than healthy dogs (HPLC: $p = 0.027$ / ICQ: $p = 0.015$). Of the 853,307 CpGs investigated in the microarray, there were

34,574 probes hybridized in the canine samples. From this total, significant difference was observed in the methylation level of 606 probes and through the homologous and orthologous similarities, 550 differently methylated genes were identified between the two groups. Our study was a pioneer in suggesting that dogs bearing non-Hodgkin's lymphoma presented DNA global hypomethylation of circulating leukocytes when compared to healthy dogs. Although we used canine samples in an assay developed specifically for human DNA (*Infinium Methylation EPIC BeadChip*) it was possible to identify differently methylated genes and possible new targets with preventive or therapeutic potential. Future epidemiological studies are needed to correlate the methylation pattern of leukocytes with the risk of developing lymphomas and to use it as a biomarker.

Descriptors: dogs; neoplasms; epigenetic; DNA methylation; lymphoma; leukocytes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma representativo dos procedimentos realizados após a inclusão dos cães.....	33
Figura 2. Ensaios químicos <i>Infinium</i> I e II, utilizados nas plataforma Human Methylation450 BeadChip e <i>MethylationEPIC</i> BeadChip (850K) (<i>Illumina</i>).....	43
Figura 3. Imagem do <i>Beadchip</i> utilizado na análise. São Paulo, 2016.....	44
Figura 4. Distribuição de cães com linfoma de acordo com a raça. São Paulo, 2015... ..	47
Figura 5. Distribuição de cães com linfoma de acordo com o sexo. São Paulo, 2015.	47
Figura 6. Imunocitoquímica de linfonodo caracterizado pelo predomínio de células T. A: CD79a (-); B: CD3 (+) (aumento de 40x). São Paulo, 2015.	49
Figura 7. Imunocitoquímica de linfonodo caracterizado pelo predomínio de células B. A: CD79a (+); B: CD3 (-) (aumento de 200x). São Paulo, 2015.	49
Figura 8. Imunocitoquímica de linfonodos caracterizados pelos diferentes índices de proliferação celular. A: Ki-67=40% e B: Ki-67=67% (aumento de 400x). São Paulo, 2015.....	50
Figura 9. Imunocitoquímica de leucócitos em emblocados parafinados caracterizando os diferentes escores de imunorreatividade do anticorpo anti-5MeCyt. A: imunorreatividade forte e B: imunorreatividade fraca (aumento de 400x). São Paulo, 2015.....	51

Figura 10. Representação gráfica dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em leucócitos dos animais do grupo controle (cont) (n=10) e do grupo com linfoma (exp) (n=9). Teste t de Student. $P < 0,05$ IC 95%.	52
Figura 11. Cromatograma de animal com linfoma obtido por HPLC-DAD ($\lambda=260$ e 286 nm) de 1 : a quantidade de desoxicitidina (dC). 2 : quantidade de 5-metil-desoxicitidina (5-metil-dC). A área referente a curva origina os valores numéricos para serem inseridos na fórmula do cálculo da porcentagem de metilação global de DNA (5-metil-dC).....	53
Figura 12. Representação gráfica da porcentagem de metilação global de DNA (%5-metil-dC) dos animais do grupo controle (cont) (n=10) e do grupo com linfoma (exp) (n=9). Teste t de Student. $P < 0,05$ IC 95%.....	54
Figura 13. Representação gráfica da correlação entre os resultados obtidos pelos métodos HPLC e ICQ dos animais de ambos os grupos (n=19). Correlação de Pearson. $P < 0,05$ IC 95%.....	55
Figura 14. Representação gráfica da distribuição dos cães dos grupos controle (n=10) e experimental (n=9) de acordo com a idade. Teste t de Student. $P < 0,05$ IC 95%.....	56
Figura 15. Representação gráfica da correlação entre a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) e a idade dos animais de ambos os grupos (n=19). Correlação de Pearson. $P > 0,05$ IC 95%.....	56

Figura 16. Representação gráfica da correlação entre a Correlação entre a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) e o índice de proliferação celular Ki-67 dos linfonodos do grupo experimental. Correlação de Pearson. $P > 0,05$ IC 95%.....58

Figura 17. Gráfico de normalização BMIQ. A: amostras pré normalização e B: amostras pós normalização. Ctr: animais do grupo controle; Pct: animais do grupo portador de linfoma.59

Figura 18. Gráfico MDS baseado em 1000 valores de β de sondas com maior variância. A: MDS pré normalização e B: MDS pós normalização. Ctr: animais do grupo controle; pct: animais do grupo portador de linfoma.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sistema de estadiamento para linfoma de cães e gatos segundo a OMS (OWEN, 1980) ...	21
Tabela 2: Relação dos anticorpos primários utilizados na reação imunocitoquímica..	36
Tabela 3: Classificação de 9 casos de linfoma de acordo com a classificação de Kiel atualizada. São Paulo, 2015...	50
Tabela 4: Classificação de Kiel modificada de acordo com o grau de malignidade. São Paulo, 2015.....	50
Tabela 5: Média, mediana, valores mínimo e máximo referentes aos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em leucócitos dos animais do grupo controle e do grupo experimental. São Paulo, 2015.....	52
Tabela 6: Média, mediana, valores mínimo e máximo das porcentagens de metilação de DNA (% 5MeCyt) em leucócitos dos animais do grupo controle e com linfoma. São Paulo, 2015..	54
Tabela 7: Lista de sondas hipermetiladas e hipometiladas no grupo experimental em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). São Paulo, 2017..	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LNH – Linfoma não-Hodgkin

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

ICQ – Imunocitoquímica

5MetCyt – Anticorpo anti-5-metil citosina

Rb – retinoblastoma

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAAF – Punção aspirativa por agulha fina

DNMTs – DNA metiltransferases

LINEs – Long interspersed elements

SINEs – Short interspersed elements

MBDP – Proteína de domínio de ligação ao metil

MBCN – Neoplasias de células B maduras

HPLC-UV – High Performance Liquid Chromatography- ultraviolet

dC – Deoxicitidina

5mC – Citosinas metiladas

LC-MS – Cromatografia líquida associada ao espectrometria de massas

LUMA – Luminometric methylation assay

DAB – Diaminobenzidina

RNase – Ribonuclease

PDE1 – Fosfodiesterase 1

Infinium I – InfI

Infinium II – InfII

MDS – Multidimensional Scaling

BMIQ – Beta-Mixture Quantile Normalization

Bayes – Empirical Bayes Statistics for Differential Expression

MVP – Methylation Variable Positions

DMPs – Differentially Methylated Positions

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....86

Anexo 2: Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. Linfoma canino	20
2.2. Epigenética / Metilação de DNA	23
2.3. Metilação de DNA e Linfoma	26
2.4. Análises de metilação de DNA	27
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral	31
3.2. Objetivos Específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Bioética	32
4.2. População de estudo.....	32
4.2.1. Grupo controle (cães saudáveis)	32
4.2.2. Grupo experimental (grupo de estudo)	32
4.3. Amostras	33
4.3.1. Sangue Periférico	33
4.3.2. Linfonodos	34
4.4. Citoinclusão	35
4.5. Imunofenotipagem e determinação da proliferação celular.....	35
4.6. Imunocitoquímica (5 metil-citosina).....	37
4.7. Aquisições de imagens e contagem da marcação imunocitoquímica	37
4.8. Quantificações da metilação global do DNA no sangue total (HPLC)	38
4.8.1. Extração de DNA dos leucócitos	38
4.8.2. Hidrólise enzimática do DNA.....	39
4.8.3. Determinação dos níveis de 5-metil-2-desoxicitidina (5-metil-dC) em DNA por HPLC	40
4.9. Análises Estatísticas.....	40
4.10. Análises dos perfis de metilação do DNA.	41

4.10.1. Participantes	41
4.10.2. Plataforma “Infinium MethylationEPIC Bead Chip” da Illumina®850K	41
4.10.3. Extração de DNA e conversão por bissulfito.....	43
4.10.4. Ensaio de metilação de DNA	43
4.10.5. Processamento e interpretação dos dados	45
 5. RESULTADOS.....	 47
5.1. Participantes	47
5.2. Imunofenotipagem e proliferação celular	48
5.3. Imunocitoquímica (5-metil-citosina)	51
5.4. Quantificação da metilação global do DNA nos leucócitos pelo método HPLC	53
5.4.1. Correlação entre os métodos de quantificação da metilação global do DNA nos leucócitos: HPLC e ICQ	54
5.4.2. Correlação entre a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) e a idade entre os grupos experimental e o controle	55
5.4.3. Correlação entre a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) e a idade entre o grupo experimental e o controle	57
5.4.4. Correlação entre a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) e o índice de proliferação celular Ki-67 dos linfonodos do grupo experimental.....	57
5.5. Identificação dos perfis diferenciais de metilação do DNA	58
5.5.1. Participantes	58
5.5.2. Filtragem e Normalização	58
5.5.3. Comparação dos grupos controle e experimental	60
 6. DISCUSSÃO	 62
 7. CONCLUSÕES	 72
 8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	 73
 9. REFERÊNCIAS	 74
 ANEXOS	 86

1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma das maiores causas de mortalidade entre cães adultos e idosos (BRONSON, 1982; FLEMING, et al., 2011; FIGHERA, et al., 2008). A taxa de incidência anual da doença é de 381 em 100.000 cães, semelhante à reportada em humanos (454 em 100.000) (BRONSON, 1982; National Cancer Institute, 2016). O número de animais com câncer é crescente, estimativa aponta a ocorrência de cerca de 4 milhões de casos novos de câncer canino por ano (HANSEN & KHANNA, 2004). Tal crescimento se deve principalmente a maior expectativa de vida dos cães, resultante de alimentação e protocolos vacinais mais adequados, além da procura por cuidados especializados e novas opções de tratamento por parte dos proprietários, motivados a prolongar o período de vida de seus animais (PAOLONI & KHANNA, 2008).

Cânceres de ocorrência natural em cães e seres humanos compartilham características como apresentação histológica, genética tumoral, alvos moleculares, comportamento biológico e resposta a terapias convencionais (PAOLONI & KHANNA, 2008). Portanto, os cães destacam-se como importante modelo para estudos translacionais e exibem como principais vantagens o desenvolvimento espontâneo do câncer num sistema imune intacto, no qual tumor, hospedeiro e microambiente são singênicos, além disso, dividem o ambiente familiar e a exposição potencial aos mesmos carcinógenos que os seres humanos, ressaltando o seu valor como grupo sentinela de doenças (HANSEN & KHANNA, 2004; PAOLONI & KHANNA, 2008; HAYES, et al., 1991).

O câncer é tradicionalmente visto como um conjunto de doenças caracterizadas pelo acúmulo de mutações genéticas, entretanto, esse paradigma tem se expandido e recentes avanços demonstram que as células tumorais apresentam anormalidades

epigenéticas globais em adição a mudanças na estrutura do genoma, gerando instabilidade genômica, uma *hallmark* do câncer (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011; JONES & BAYLIN, 2007). Ambos os mecanismos interagem nos estágios de desenvolvimento do câncer para promover a progressão tumoral e cooperam para um estado de desregulação e padrões de expressão gênica alterados, com perda ou ganho de função de genes que afetam a supressão/ prevenção tumoral ou a oncogênese (JONES & BAYLIN, 2002; JONES & BAYLIN, 2007; CHOI & LEE, 2013). O caráter relativamente reversível das aberrações epigenéticas emergiu como um campo promissor no desenvolvimento de novas terapias anti-neoplásicas na medicina humana (HEERBOTH, et al., 2014). Outro foco de pesquisas recentes é o uso de perfis de metilação global de DNA como biomarcador de risco de câncer, uma vez que alterações na metilação foram encontradas em estágios pré-malignos de vários tipos de câncer humano (SCHÜBELER, 2015).

Com o avanço das tecnologias genômicas, evidenciou-se que alterações moleculares genéticas dirigidas ao câncer em cães e seres humanos são altamente análogas, sendo que muitos oncogenes e genes supressores tumorais são demonstrados em cânceres de ambas as espécies (BREEN & MODIANO, 2008; SCHIFFMAN & BREEN, 2015). O linfoma não-Hodgkin é um tipo de tumor espontâneo canino atualmente aceito como modelo comparativo da doença em humanos (MARCONATO, et al., 2013; RICHARDS & SUTER, 2015). Recentemente demonstrou-se que padrões de metilação de DNA aberrantes parecem exercer um papel chave no desenvolvimento de tumores hematopoiéticos humanos, porém, na espécie canina, os efeitos da metilação têm sido raramente investigados, principalmente em processos neoplásicos (ARESU, 2016; DOO, et al., 2016).

Diante desse contexto e da escassez de estudos epigenéticos na medicina veterinária, pretende-se através desse trabalho, analisar alterações nos perfis de metilação global do DNA, associando-as com a ocorrência do linfoma, além de investigar possíveis genes diferentemente metilados relacionados à doença. Esperamos com esse estudo adicionar dados mais precisos na área de epigenética veterinária e contribuir para a pesquisa de novas terapias e estudos translacionais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Linfoma canino

O linfoma é uma neoplasia maligna de tecidos hematopoiéticos, caracterizado pela expansão clonal de células linfóides, geralmente originária em linfonodos ou órgãos viscerais sólidos como baço e fígado (VAIL, et al., 2013). Os linfomas estão entre os tipos tumorais mais comuns em cães, sendo responsáveis por 83% de todas as afecções malignas hematopoiéticas caninas, cuja taxa de incidência anual em fêmeas é de 22,9 por 100.000 e em machos é de 19,1 por 100.000, assim como às reportadas em LNH humano, com índices de 19,5 em 100.000 para ambos os sexos. (ITO, et al., 2014; VAIL, et al., 2013; MERLO, et al., 2008; *National Cancer Institute*, 2014).

Valli e colaboradores (2013) descreveram as raças de pequeno porte: Cocker Spaniel, Beagle e Shih Tzu e as de grande porte: Golden Retriever, Labrador Retriever e Boxer como as mais acometidas, sendo que os cães de meia idade a idosos são mais afetados. Um estudo retrospectivo realizado no estado de São Paulo relatou que a idade média dos cães com linfoma foi 8,7 anos e 43% dos cães doentes não tinham raça definida (KIMURA, et al., 2011).

Apesar da etiologia do linfoma ser provavelmente multifatorial e desconhecida, a exposição a herbicidas contendo ácido 2-4 diclorofenoxiacético, pesticidas, incineradores de lixo, regiões poluídas e resíduos radioativos têm sido considerados como indicadores de risco para a doença (HAYES, et al., 1991; TAKASHIMA-UEBELHOER, et al., 2012; PASTOR, et al., 2009; ZANINI, et al., 2013; KIMURA, 2012; REIF, et al., 1995). Aberrações cromossômicas, mutações genéticas somáticas e germinativas, expressão alterada de oncogene/ gene supressor tumoral e alterações

epigenéticas são reportadas em cães. Hibridização genômica comparativa demonstrou uma limitada instabilidade genômica no linfoma canino comparado ao LNH humano, com a maioria das variações no número de cópias dos cromossomos 13 e 31 (correspondente aos cromossomos humanos 8 e 21) (HAHN, et al., 1994; THOMAS, et al., 2011). Giantin e colegas (2013) descreveram aumento da expressão de c-kit (um importante fator de proliferação, sobrevivência e diferenciação de *stem cells* hematopoiéticas) em linfomas caninos de células T de alto grau. Mutações no p53 são relativamente raras e o aumento da fosforilação de Rb (retinoblastoma) foi correlacionado com a hiperexpressão de c-Myc e com a trissomia do cromossomo 13 em linfomas de células B de alto grau caninos (VELDHOEN, et al., 1998; SETOGUCHI, et al., 1998; FOSMIRE, et al., 2007). Fatores de risco hereditários foram inseridos, pois certas raças possuem prevalência de determinados subtipos imunofenotípicos de linfoma (MODIANO, et al., 2005; ELVERS, et al., 2015).

A classificação do linfoma segundo sua localização anatômica se baseia no sistema de estadiamento clínico para cães e gatos proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e descrito na Tabela 1 (OWEN, 1980).

Tabela 1. Sistema de estadiamento para linfoma de cães e gatos segundo a OMS (OWEN, 1980).

Local Anatômico	Estadiamento clínico
A Generalizado	I Envolvimento de apenas um linfonodo ou tecido linfóide de apenas um órgão (excluindo medula óssea)
B Alimentar	II Envolvimento de muitos de linfonodos de uma única área
C Tímico	III Envolvimento generalizado de linfonodos
D Cutâneo	IV Envolvimento de fígado e/ou baço (± estágio III)
E Leucemia	V Manifestação no sangue e envolvimento de medula óssea e/ou outros sistemas
F Outros	
	a - Sem sinais sistêmicos
	b - Com sinais sistêmicos

O linfoma multicêntrico, alimentar, mediastinal e cutâneo são as formas anatómicas mais comuns, no entanto, regiões extranodais podem incluir olhos, sistema nervoso central, medula óssea, bexiga, coração e cavidade nasal (MARCONATO, 2011; MADEWELL & THESEN, 1987). A forma multicêntrica representa 73,2 a 82,4% dos cães com linfoma, perceptível pelo aumento de múltiplos linfonodos (superficiais e profundos) e pode estar associada a sintomas como anorexia, perda de peso, ascite, febre, dentre outros (PONCE, et al., 2010; VEZZALI, et al., 2009; VAIL, et al., 2013). Os linfonodos poplíteos, submandibulares, cervicais superficiais e axilares são mais frequentemente acometidos, podendo ocorrer infiltração em baço, fígado, tonsilas e medula óssea (PONCE, et al., 2010; VEZZALI, et al., 2009).

O diagnóstico é comumente realizado pelo exame citológico de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de linfonodos neoplásicos, uma técnica rápida, sensível e minimamente invasiva (SÖZMEN, et al., 2005; VALLI, et al., 2011). Os linfomas podem ser classificados citologicamente pelo sistema *Updated Kiel* em tumores de alto ou baixo grau e sub-tipos celulares B ou T, baseado na morfologia celular e imunofenotipagem (FOURNEL-FLEURY, et al., 1997; PONCE, et al., 2004; SÖZMEN, et al., 2005). Devido à alta similaridade patológica entre o linfoma humano e canino, atualmente se utiliza a classificação histológica humana proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) adaptada aos cães (VALLI, 2011).

O linfoma multicêntrico de alto grau canino apresenta comportamento agressivo e é comparável ao LNH em humanos (VAIL & MACEWEN, 2000). Em um estudo amplo, com um total de 608 casos, 76% dos linfomas caninos foram classificados como de alto grau de malignidade (PONCE, et al., 2010). De acordo com a imunofenotipagem, cerca de 65 a 75% dos linfomas se originam de células B e

aproximadamente 25 a 35% de células T, similarmente à medicina humana, na qual menos de 15% dos linfomas são representados pelo subtipo T (PONCE, et al., 2010; VEZZALI, et al., 2009; WANG & VOSE, 2013).

O tratamento de escolha se baseia na quimioterapia sistêmica com multiagentes, sendo doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina e prednisona as principais drogas incluídas nos protocolos, o tempo médio de sobrevida é de aproximadamente 10 a 12 meses para pacientes submetidos à quimioterapia e 4 a 6 semanas para animais sem tratamento (RICHARDS & SUTER, 2015; VAIL, et al., 2013).

O fenótipo de células T está associado com pior prognóstico em cães e pessoas (MELNYK, et al., 1997; TESKE, et al., 1994; PONCE, et al., 2004). No LNH humano, o índice de Ki-67 é considerado um fator prognóstico (BROYDE, et al., 2009). Descrito por Gerdes e colegas em 1983, o anticorpo Ki-67 reconhece um antígeno nuclear presente somente nas células em proliferação, expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto na G0. Apesar de poucos estudos com cães, Poggi e colegas (2013) demonstraram maiores índices de Ki-67 em linfomas de alto grau comparado aos de baixo grau. Ademais, a expressão de Ki-67 mostrou-se ser uma ferramenta prognóstica para cães com linfomas de células B de alto grau (POGGI, et al., 2016).

2.2 Epigenética/ Metilação de DNA

Modificações epigenéticas constituem um mecanismo especial de controle transcricional, permitem que ocorram mudanças na expressão gênica e no fenótipo sem que haja alterações na sequência de DNA, desempenham um papel crucial na regulação de células normais e podem ser influenciadas por variação genética e ambiental (TEH, et al., 2014). Os estados epigenéticos são considerados herdáveis, pois persistem durante as múltiplas divisões celulares, e reversíveis, uma vez que não alteram a

sequência de DNA (SHEN & LAIRD, 2013). Três sistemas incluindo metilação de DNA, modificações de proteínas histonas e controle da expressão pelos miRNAs não codificantes são usados para iniciar e sustentar esses mecanismos, sendo que a metilação de DNA é um dos processos epigenéticos mais estudado até o momento (SHARMA, et al., 2010; CHOI & LEE, 2013).

Metilação de DNA está envolvida desde a embriogênese até a idade adulta de mamíferos, exercem um importante controle na regulação da expressão gênica, principalmente no *imprinting* genômico, na inativação do cromossomo X e na estabilidade cromossômica (LAIRD, 2003; YUASA, 2010). Nos vertebrados, tal processo é caracterizado pela adição covalente de um grupo metil (CH_3), transferido da S-adenosilmetionina, para um carbono na posição 5' da citosina (5MeC), que ocorre tipicamente no contexto de dinucleotídeo CpG, via DNA metiltransferases (DNMTs) (LAIRD, 2003; KURDYUKOV & BULLOCK, 2016). A transmissão e a manutenção precisa de padrões de metilação para células filhas é essencial, as principais enzimas responsáveis pela regulação desses padrões são DNMT1, DNMT3a e DNMT3b (QURESHI, et al., 2010). Nas células somáticas, a DNMT1 é a mais abundante, sendo responsável pela propagação e manutenção de padrões de metilação de DNA já estabelecidos. Entretanto, DNMT3a e 3b são expressas principalmente em células embrionárias e células não diferenciadas, são críticas para a metilação de novos locais (processo denominado metilação *de novo*), sendo conhecidas como DNMTs *de novo* (ESPADA & ESTELLER, 2010; DE CARVALHO, et al., 2010).

Os dinucleotídeos CpG não são dispostos aleatoriamente no genoma dos mamíferos, há sequências vastas de DNA que contém dinucleotídeos CpG esparsamente distribuídos e existem as ilhas CpG. Mais de 80% dos dinucleotídeos CpG são metilados e se concentram em sequências repetitivas nas regiões intergênicas e intrônica

(DNA satélite, *long interspersed elements* (LINEs) e *short interspersed elements* (SINEs) e transposons), tais regiões abrangem aproximadamente 50% do genoma humano (LANDER, et al., 2001). Alguns desses elementos têm a capacidade de se integrar em regiões genômicas alternativas, desse modo, perturbam a expressão de importantes genes e eventualmente desencadeiam instabilidade genômica (WU, et al., 2012). Um dos mecanismos de proteção para controlar a presença deletéria dessas sequências é mantê-las altamente metiladas em condições normais (WOODCOCK, et al., 1997).

Entretanto, as ilhas CpG são encontradas nas regiões promotoras da maioria dos genes, compreendem fragmentos curtos de DNA com comprimento médio de 1102 pares de bases (pb) nos cães e 1090pb nos humanos, ricas em conteúdo C-G, compreendem 2,8% e 1,4% do genoma global em cães e humanos, respectivamente (HAN & ZHAO, 2009). Em média, 60% dos genes humanos têm pelo menos uma ilha CpG próxima ou na sua região promotora (DE CARVALHO, et al., 2010). Em estudo comparativo entre genes homólogos caninos e humanos, Han & Zhao (2009) mapearam 5.331 genes homólogos (52,3%) que tinham ilhas CpG associadas a região promotora em ambos genomas. Em genes transcricionalmente ativos, estas ilhas encontram-se normalmente não metiladas, esse status possibilita sua transcrição na presença de ativadores transcripcionais (HAN & ZHAO, 2009; DEATON & BIRD, 2011).

Um padrão alterado de processos epigenéticos ocorre em muitas doenças humanas, incluindo o câncer. Estudos crescentes demonstram que a hipometilação global contribui para a instabilidade genômica evidenciado pelo aumento de rearranjo cromossômico, recombinação mitótica e ativação de transcrição aberrante (aumento na expressão de oncogenes) (JONES & BAYLIN, 2007). Por outro lado, a hipermetilação promotor-específica ocorre predominantemente nas ilhas CpG e podem resultar no

silenciamento gênico por meio da atração da proteína de domínio de ligação ao metil (MBDP) ou pelo recrutamento de complexos repressivos, inibindo assim a transcrição, e resultando no silenciamento anormal de genes supressores tumorais (JONES & BAYLIN, 2002; EDEN, et al., 2003; QURESHI, et al., 2010). Há evidências que perfis de metilação anormais estão envolvidos na iniciação e na progressão tumoral, sugerindo que são eventos precoces e podem anteceder as mutações genéticas (CEDAR & BERGMAN, 2009; ESPADA & ESTELLER, 2010). Portanto, a identificação das anormalidades nos perfis de metilação tem-se destacado como um importante instrumento para a compreensão das bases moleculares da tumorigênese, com potencial uso clínico na detecção precoce de câncer, prognóstico e desenvolvimento de novas terapias.

2.3 Metilação de DNA e Linfoma

Na medicina humana, a hipometilação global de DNA parece ser um importante fator na patogênese de neoplasias de células B maduras (MBCN), descrita tanto em tecido tumoral quanto em sangue periférico, ambos comparados com tecido e sangue normais (WALKER, et al., 2011; WONG DOO, et al., 2016). Alguns estudos demonstraram perfis de metilação global aberrantes em sangue periférico de seres humanos com diferentes tipos de câncer: MBCB, leucemia, coloretal, mamário, hepático e urotelial (WONG DOO, et al., 2016; FABRIS, et al., 2011; LIM, et al., 2008; CHOI, et al., 2009; WU, et al., 2012; DUGUÉ, et al., 2016).

Na espécie canina, os estudos com metilação são escassos. Uma recente análise demonstrou que a hipometilação global foi predominante em mastocitomas caninos de alto grau por detecção imunoistoquímica (MORIMOTO et al., 2016). Hipometilação genômica foi um achado em células neoplásicas obtidas de cães com desordens linfoproliferativas malignas (PELHAM, et al., 2003).

Assim como no LNH humano, as ilhas CpG do gene supressor DLC1 em 21 amostras de linfomas espontâneos caninos se encontraram anormalmente metiladas em comparação ao tecido linfoide normal, e, apesar de não estar silenciado, foi correlacionado com o fenótipo maligno (BRYAN, et al., 2009). FUJIWARA-IGARASHI e colaboradores (2014) demonstraram inibição da expressão do gene supressor tumoral p16 via hipermetilação de região promotora em três linhagens celulares de tumores linfoides caninos. A expressão do gene ABCB1, que codifica a glicoproteína-P (relacionada à resistência a drogas) não foi suprimida pela hipermetilação de suas ilhas CpG na maioria dos cães com linfoma multicêntrico de células B de alto grau, independente da sensibilidade ou resistência a quimioterapia (TOMIYASU, et al., 2014). A FHIT é considerada uma proteína supressora tumoral envolvida na modulação do ciclo celular e apoptose, apesar da sua menor expressão em cinco linhagens celulares de linfoma canino, a hipermetilação das ilhas CpG do gene FHIT não foi detectada em todas as linhagens (HIRAOKA, et al., 2009). O TFPI-2 (inibidor da via do fator tecidual 2) é um gene supressor tumoral envolvido na inibição da invasividade, a hipermetilação de sua região promotora foi descrita em 17 amostras de linfoma difuso de grandes células B (77% dos casos) e regulou negativamente a expressão de TFPI-2 (FERRARESSO, et al., 2014). Esses achados sugerem claramente a associação de padrões anormais de metilação de DNA no desenvolvimento dessa neoplasia em cães.

2.4 Análises de metilação de DNA

A maioria das pesquisas com metilação se baseiam primeiramente na diferenciação biológica ou química de citosinas metiladas e não metiladas, seguida da amplificação das sequências diferentemente metiladas. Atualmente, a maioria dos

marcadores epigenéticos é baseada na hipermetilação aberrante de regiões promotoras, no entanto, pesquisas demonstram que a avaliação da metilação global também pode ser uma ferramenta clínica útil, porém, um desafio atual é definir, clarificar e padronizar as metodologias para uma determinação exata (TORAÑO, et al., 2012).

Primeiramente é importante definir as principais nomenclaturas utilizadas nas análises de metilação. O **conteúdo** de metilação representa a quantidade total de citosinas metiladas no genoma, constitui uma medida quantitativa dos níveis globais de metilação de DNA numa amostra; o **nível** de metilação é uma avaliação quantitativa de um único dinucleotídeo CpG do genoma de uma amostra; o **padrão** de metilação refere-se a metilação de uma série de dinucleotídeos CpG ligados ou em uma combinação particular em uma única cadeia de DNA; por fim, o **perfil** de metilação é uma medida semi-quantitativa, quantitativa ou qualitativa de múltiplos e independentes dinucleotídeos CpG em um *pool* de DNA (LAIRD, 2003).

Em suma, algumas das tecnologias usadas para analisar a metilação de DNA global podem ser divididas em duas categorias:

- 1) Abordagens globais: a técnica HPLC-UV (*High Performance Liquid Chromatography- ultraviolet*), desenvolvida por Kuo e colaboradores em 1980 ainda é considerada o “padrão ouro” atual para quantificação de deoxicitidina (dC) e citosinas metiladas (5mC) presentes em amostras de DNA hidrolisadas (KURDYUKOV & BULLOCK, 2016). É um procedimento analítico cromatográfico que utiliza fases estacionárias não polares e fases móveis com diferentes graus de polaridade, essas fases permitem a separação de compostos de acordo com a sua polaridade, os quais são quantificados pela sua absorbância UV em 260-280 nm (MAGAÑA, et al., 2008). O DNA é hidrolisado, as bases

5mC e dC são separadas por cromatografia, cada fração é medida e a proporção 5mC/dC pode ser calculada para cada amostra. O estudo imunocitoquímico ou imunoistoquímico utiliza anticorpos monoclonais específicos contra a 5-metilcitosina e possibilita a visualização e quantificação da metilação de DNA em tecidos parafinados. Tal técnica permite a observação da imunomarcação *in situ*, localizando as regiões de marcação celular e tecidual (HERNANDEZ-BLAZQUEZ *et al.*, 2000). Outros métodos incluem o *LINE-1*/pirosequenciamento, *LC-MS/MS* (cromatografia líquida associada ao espectrometria de massas) e o *LUMA* (*luminometric methylation assay*).

- 2) Identificação de regiões diferentemente metiladas no genoma global: a técnica de sequenciamento do DNA modificado por bissulfito permite a identificação de regiões diferentemente metiladas, uma vez que promove desaminação da citosina a uracila (posteriormente identificados como timina), mas não afeta a citosina metilada. A pesquisa dessas regiões utilizando o DNA convertido por bissulfito pode ser realizada por diferentes técnicas, sendo que os métodos baseados no microarranjo podem interrogar um número bastante elevado de CpGs em comparação às demais abordagens. A metilação do DNA global também pode ser estudada por métodos que não utilizam a conversão por bissulfito, como as análises baseadas na digestão do DNA com enzimas de restrição sensíveis a metilação seguido de amplificação por PCR, dentre outros.

O genoma canino possui 39 pares de cromossomos (38 autossomos e um sexual) e é amplamente similar ao genoma humano, mais de 650 milhões de pares de bases do DNA de cães se alinham ao genoma humano, incluindo fragmentos ortólogos putativos para 18.473 de 24.567 genes humanos (YANG, *et al.*, 1999; KIRKNESS, *et al.*, 2003).

Por definição, genes com sequências de DNA similares entre duas espécies distintas são referidos como homólogos. Ortólogos e parálogos são tipos de genes homólogos que estão relacionados com especiação ou duplicação gênica, respectivamente. Ressalta-se que genes ortólogos se originam de um único gene de ancestral comum entre as espécies (evento da especiação) e frequentemente conservam a função biológica em diferentes organismos (GABALDÓN & KOONIN, 2013). Com o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática, tornou-se possível realizar a inferência de genes homólogos e ortólogos putativos de forma precisa e eficiente entre diferentes espécies, a identificação de genes ortólogos é de grande importância para a inferência de propriedades funcionais de genes (DESSIMOZ, et al., 2012).

Embora qualquer tecido possa ser usado para obtenção do DNA e posterior detecção de regiões diferenciais de metilação associadas com um fenótipo neoplásico, a colheita de tecido tumoral é invasiva e na maioria dos casos não pode ser realizada repetidamente, entretanto, o uso do DNA extraído de leucócitos de sangue periférico oferece a vantagem de estar prontamente disponível para estudos como biomarcador, detecção precoce e monitoramento do câncer, (LAIRD, 2003; SHIVAPURKAR & GAZDAR, 2010; WOO & KIM, 2012; WU, et al., 2012; LI, et al., 2012). Ademais, em decorrência do DNA ser mais estável do que outros materiais biológicos, a metilação é facilmente detectada em pequenas amostras de sangue e pode ser adequada para estudos epidemiológicos em larga escala (LI, *et al.*, 2012).

Até o momento, na literatura veterinária não há relatos da associação de medidas globais de metilação do DNA derivado do sangue periférico e linfoma canino utilizando-se as técnicas de HPLC, imunocitoquímica e microensaio.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do corrente estudo foi quantificar a metilação global do DNA em amostras de leucócitos do sangue periférico de cães portadores de linfoma não Hodgkin, comparando com a metilação global do DNA do sangue de cães saudáveis. Além disso, identificar genes diferentemente metilados nas mesmas amostras.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar e correlacionar o conteúdo de metilação de leucócitos obtidos de sangue periférico de cães portadores de linfomas ou hígidos pelas abordagens metodológicas:
 - HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)
 - Imunocitoquímica (ICQ)
- Correlacionar o conteúdo de metilação obtido pelo HPLC com idade, quantidade de linfócitos circulantes e taxa de proliferação celular (Ki-67) das células neoplásicas
- Verificar se a técnica de microarranjos (*Infinium MethylationEPIC Bead Chip* 850K), disponível para análise de metilação do DNA humano é válida para a análise do DNA canino
- Identificar os painéis diferenciais de metilação do DNA no linfoma multicêntrico baseado na triagem epigenômica de microarranjos
- Pesquisar na literatura e bancos de dados genômicos, as funções biológicas dos genes diferentemente metilados que possam estar associadas à origem ou progressão tumoral

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Bioética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina, protocolo n° 024/16 e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolado sob o n° 1747271015 (Anexos 1 e 2). Todos os tutores dos animais incluídos no projeto assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2. População de estudo

4.2.1. Grupo controle (cães sadios)

Foram incluídos nesse grupo 10 cães hígidos adultos, provenientes de Canil do Laboratório e Centro de Hemoterapia Veterinária “HEMOVET”, com idade mínima de 5 anos, de ambos os sexos, com raça definida. A anamnese, exame físico e complementar (hemograma e PAAF de linfonodo poplíteo) confirmaram a higidez.

4.2.2. Grupo experimental (grupo de estudo)

Esse grupo foi composto por 9 cães, de ambos os sexos, com e sem raça definida, com diagnóstico de linfoma multicêntrico, provenientes do atendimento do Instituto Veterinário de Imagem “IVI” e do Serviço de Oncologia Veterinária do Centro Médico Veterinário “Oasis” localizados em São Paulo-SP. Os critérios de inclusão utilizados foram: idade acima de 5 anos, linfonodomegalia generalizada, leucócitos circulantes morfolologicamente normais, sem histórico de neoplasias e/ou outra neoplasia concomitante, sem tratamento prévio (antiinflamatórios esteroidais e/ou

quimioterápicos antineoplásicos). A inclusão dos animais no grupo ocorreu após a realização do exame citológico, por meio da PAAF de linfonodo poplíteo e confirmação do diagnóstico. Dados epidemiológicos como raça, idade e sexo foram descritos em ficha individual. As avaliações laboratoriais foram realizadas no Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia - FMVZ/USP. A Figura 1 resume os procedimentos realizados para cada grupo de cães incluídos no estudo.

Figura 1. Fluxograma representativo dos procedimentos realizados após a inclusão dos cães.

4.3. Amostras

4.3.1. Sangue periférico

Amostras de sangue periférico (8 mL) de cães de ambos grupos foram coletadas por venopunção da cefálica ou da jugular. Para o procedimento, foram utilizadas seringas de 10 mL e tubos BD Vacutainer contendo EDTA como anticoagulante. Realizou-se hemograma, sendo que a contagem diferencial e a avaliação morfológica de leucócitos foram feitas em esfregaço sanguíneo “in natura”, pela coloração de Panótico Rápido RB.

Em seguida, para a obtenção da capa leucocitária do sangue periférico, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por dez minutos. Após desprezar o plasma, a capa leucocitária foi removida do tubo com o auxílio de uma pipeta de 10 µL, a qual foi separada em duas alíquotas iguais. A primeira alíquota foi inserida em um tubo contendo 5 mL de fluido preservativo (Becton Dickinson, TriPath Imaging, Burlington, NC, USA) mantido à 4 a 6°C, por no máximo 15 dias, para posterior citoinclusão dos leucócitos. A segunda alíquota foi mantida à -80°C em eppendorfs de 2 mL, por até 12 meses, para posterior extração de DNA.

4.3.2. Linfonodos

Após realizado o diagnóstico citológico, uma segunda amostra do mesmo linfonodo foi coletada pelo mesmo procedimento da PAAF, porém, o material contido na agulha foi lavado em 2 mL de fluido preservativo (Becton Dickinson, TriPath Imaging, Burlington, NC, USA) com o auxílio de uma seringa. As aspirações dos linfonodos foram realizadas até o líquido preservativo do frasco se tornar turvo e conservadas à 4-6°C por no máximo 15 dias até o processamento.

4.4. Citoinclusão

As amostras armazenadas no fluido preservativo (capa leucocitária de ambos os grupos e aspirados de linfonodos do grupo experimental), foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o agregado celular (sedimento) foi fixado em 200 µL de solução de Bouin (2,4,6-Trinitrophenol 1,3%, formalina 49%, ácido acético glacial 100%) e centrifugado a 3000 rpm durante 20 minutos. Os sedimentos foram colocados em um cassete histológico e armazenados em solução de formalina 10% tamponada pelo período de no máximo 2 horas, em seguida, foram incorporados à parafina (FERNANDES, et al.; 2015). Após a obtenção dos blocos de parafina (emblocados celulares), realizou-se cortes de 5 µm de espessura dos mesmos, os quais foram estendidos em banho-maria (60°C) e colocados em lâmina de vidro para a coloração H&E e em lâminas de vidro silanizadas para posterior análise de imunocitoquímica (ICQ).

4.5. Imunofenotipagem e determinação da proliferação celular

Para a ICQ aplicou-se o protocolo do método polímero *Super PicTure™ Polymer Detection Kit* (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) divididos em dois dias de procedimentos. No primeiro dia, após desparafinização e hidratação gradual em etanol, as lâminas de vidro silanizadas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 6% por no mínimo 30 minutos à 37°C. Após a lavagem em tampão fosfato (PBS), foram submetidas a recuperação antigênica em panela de pressão Pascal por 15 minutos com o tampão específico de acordo com o anticorpo primário (Tabela 2). A seguir, as lâminas passaram por lavagem em PBS e incubação com o anticorpo primário específico diluído em albumina com soro bovino (BSA), seguido por incubação overnight (18 horas) à 4°C.

Tabela 2. Relação dos anticorpos primários utilizados na reação imunocitoquímica.

Anticorpo primário	Espécie	Clone	Diluição	Tampão
CD 3	Policlonal	-	1:400	Citrato
PAX-5	Monoclonal	BC-24	1:200	Citrato
CD79a	Monoclonal	HM57	1:100	Citrato
Ki67	Monoclonal	MIB-1	1:100	EDTA
5MeCyt	Monoclonal	33D3	1:100	Citrato

Para a imunofenotipagem dos linfomas, realizou-se ICQ de emblocados celulares de linfonodos originários dos cães doentes, sendo que os anticorpos primários utilizados foram: anti-CD3 (Dako, Carpinteria, CA, USA), anti-CD79a (Dako, Carpinteria, CA, USA) e anti-PAX5 (Biocare Medical, Concord, CA, USA), marcadores de células T (CD3) e de células B (CD79a e PAX-5). O índice de proliferação celular foi estabelecido pelo uso do anticorpo anti-Ki-67 (Dako, Carpinteria, CA, USA), os clones e as respectivas diluições dos anticorpos primários utilizados estão descritos na Tabela 2.

No segundo dia, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o polímero do *Super PicTure™ Polymer Detection Kit* (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) por 30 minutos à 37°C para amplificação do sinal. Após novas lavagens com PBS, realizou-se a revelação com diaminobenzidina (DAB) (Dako, Carpinteria, CA, USA) por 5 minutos à 37°C e a contra coloração com hematoxilina, seguida por desidratação, diafanização e montagem das lâminas com resina sintética. Importante ressaltar que todas as amostras foram realizadas em uma única bateria, favorecendo assim a uniformidade do tempo de exposição a e a quantificação da intensidade de coloração. Como controles positivos foram utilizados cortes histológicos de linfonodos obtidos de cães saudáveis e como controles negativos foram utilizados os mesmos cortes de linfonodos com a omissão do anticorpo primário.

4.6. Imunocitoquímica (5 metil-citosina)

Para a imunomarcção da 5 metil-citosina em emblocados celulares de leucócitos de ambos os grupos, seguiu-se o mesmo protocolo descrito para imunofenotipagem, porém utilizou-se como anticorpo primário o anti-5-metil citidina (5MeCyt) (Abcam, Cambridge, MA, USA) (Tabela 1). A citosina é uma base dos ácidos nucleicos enquanto que a citidina é uma molécula formada da união de uma citosina a um anel de desoxiribose, tornando-se um nucleosídeo. O anticorpo 5MeCyt é capaz de reconhecer o nucleosídeo 5-metil citidina. Os leucócitos foram considerados positivos para imunorreatividade de 5MeCyt, quando apresentaram marcação nuclear em tom de marrom, de intensidade fraca a forte. Realizou-se a contagem para cada amostra e o escore de marcação leucocitária foi obtido por meio do Histoscore no qual se multiplicou a porcentagem de células com marcação fraca por um, a porcentagem de células com marcação moderada por dois e a porcentagem de células com marcação forte por três, por fim, a soma das porcentagens multiplicada pela intensidade de células positivas permitiu a obtenção do escore entre 0 (zero) e 300, conforme relatado por CHUNG et al. (2015). Como controle positivo utilizou-se emblocados leucocitários obtidos de cães sadios e como controle negativo foram utilizados os mesmos cortes leucocitários com a omissão do anticorpo primário.

4.7. Aquisições de imagens e contagem da marcação imunocitoquímica

Ao fim do estudo imunocitoquímico os cortes foram avaliados em microscópio NIKON® em campos de 100, 200 e 400 aumentos e as imagens registradas pelo sistema de aquisição de imagens Image-Pro Plus®. O índice de proliferação celular foi estimado com base na porcentagem de células marcadas positivamente com Ki67 num total de 1000 células contadas manualmente em 5 a 10 campos selecionados

aleatoriamente no aumento de 400x de cada corte histológico de linfonodo. O escore de imunorreatividade de 5MeCyt em leucócitos foi obtido pela contagem manual de células marcadas fraca, moderada e fortemente, totalizando a contagem mínima de 1000 células (em 5-10 campos aleatórios da lâmina).

4.8. Quantificações da metilação global do DNA no sangue total (HPLC)

A quantificação da metilação global de DNA em leucócitos de cães, expressa como porcentagem (%) 5-metil-2'-desoxicitidina (5-metil-dC) foi determinada pelo método HPLC. Tal metodologia inclui a extração de DNA dos leucócitos, seguida de hidrólise enzimática do DNA e passagem da amostra pela coluna cromatográfica do sistema analítico de HPLC-DAD disponível no laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, realizada com a colaboração da Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro e Dr. Tiago Franco de Oliveira.

4.8.1. Extração de DNA dos leucócitos

O procedimento utilizado para extração e purificação de DNA, utilizou a alíquota da capa leucocitária congelada obtida de 8 mL de sangue total, seguindo o protocolo do kit de extração Gentra Puregene® (QIAGEN Sciences, Mayland, USA). Cerca de 6 mL de solução de lise das hemácias (*RBC Lysis Solution*, Gentra Puregene® Kit) foi adicionada à amostra correspondente (aproximadamente três vezes a quantidade de fração leucocitária), submeteu-se a agitação durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugada por 5 minutos, 2000 x g a 4°C, e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. A amostra foi agitada na solução residual remanescente (aproximadamente 500 µL) junto com o precipitado até formação de uma solução homogênea. Posteriormente, adicionou-se 5 mL de solução de lise de células (*Cell Lysis*

Solution, Gentra Puregene[®] Kit), as amostras foram vigorosamente agitadas por 20 segundos e foi adicionado 50 µL de uma solução contendo a enzima RNAase (Ribonuclease) na concentração de 15 mg/mL. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C. Após a incubação foi adicionado 5 mL da solução de precipitação de proteínas (*Protein Precipitation Solution*, Gentra Puregene[®] Kit), as amostras foram submetidas a vigorosa agitação e posterior centrifugação a 3000 $\times$ g por 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 5 mL de isopropanol gelado, precipitando o DNA. A solução seguiu sendo submetida a uma nova centrifugação por 3 minutos, 2000 $\times$ g, 4°C. O DNA precipitado foi lavado com 3 mL de etanol 70%, centrifugado por 5 min, 2000 $\times$ g, 4°C. Depois de seco, o DNA foi ressuspensão em 100 µL de uma solução de desferroxamina (0,1 mM) e transferido para um eppendorf identificado. A concentração do DNA foi determinada pela leitura de absorbância a 260 nm e sua pureza pela razão de absorbância a 260/280 nm.

4.8.2. Hidrólise enzimática do DNA

Para a reação de hidrólise enzimática, alíquotas contendo 10 µg de DNA em desferroxamina (0,1 mM) foram adicionadas a 2,5 µL de tampão Tris-HCl/MgCl₂ 200 mM (pH 7,4) e 1 µL de DNase 1. As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Após a incubação, adicionou-se 1 µL de fosfodiesterase 1 (PDE1) e 1,2 unidade de fosfatase alcalina. As amostras foram novamente incubadas a 37 °C por 1 hora com agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora o volume final da incubação (20 µL) foi centrifugado por 10 min a 9.300 $\times$ g e o sobrenadante coletado. Alíquotas de 10 µL (5 µg de DNA) foram analisadas em um sistema de HPLC-DAD.

4.8.3. Determinação dos níveis de 5-metil-2'-desoxicitidina (5-metil-dC) em DNA por HPLC

As alíquotas de DNA foram injetadas no sistema analítico de HPLC da empresa *Shimadzu Corporation* (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo fotodiodos PDA-20AV, um auto injetor (Proeminence SIL-20AC) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20A. Os dados foram processados pelo software LC-Solution 1.21 (Shimadzu, Japão). A seguinte condição cromatográfica foi utilizada para as análises:

- Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH₃OH (0-25 min, 0-18% de CH₃OH; 25-27 min, 18-0% de CH₃OH; 27-37 min, 0% de CH₃OH), com um fluxo de 1 mL/min, 30°C. O detector de DAD é fixado em 260 nm para a quantificação da desoxicitidina (molécula formada pela ligação da citosina com a desoxirribose – dC) e 286 nm para a quantificação da 5-metil-dC. As curvas de calibração foram feitas no intervalo de 0,05-6 nmol para dC e de 0,005-0,4 nmol para 5-metil-dC. A porcentagem da metilação global do DNA foi calculada usando a seguinte equação:

$$5\text{-metil-dC}_{(\%) } = \frac{5\text{-metil-dC}_{(\text{nmol})} \times 100}{5\text{-metil-dC}_{(\text{nmol})} + \text{dC}_{(\text{nmol})}}$$

4.9. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o programa R versão 3.3.2. Depois de realizados os testes de normalidade, as quantidades de metilação global do DNA de sangue periférico, obtidas pelos métodos HPLC e imunocitoquímica, foram

comparadas entre os grupos controle e experimental, utilizando o Teste t de Student. Para a comparação da idade e a quantidade de linfócitos entre os grupos utilizou-se o Teste t de Student e o Mann-Whitney, respectivamente. O teste de Pearson foi usado para as correlações entre:

- os resultados obtidos pelos testes HPLC e ICQ
- a quantidade de metilação do DNA (HPLC) e a idade
- a quantidade de metilação do DNA (HPLC) e o índice de proliferação celular Ki-67.

Considerou-se diferença estatisticamente significativa ao intervalo de confiança de 95% (IC 95%) ou $p < 0,05$.

4.10. Análises dos perfis de metilação do DNA

4.10.1. Participantes

Nessa fase, selecionou-se o DNA extraído de leucócitos de quatro cães saudáveis e quatro cães portadores de linfoma de células B de alto grau para o grupo controle e experimental, respectivamente. O ensaio de metilação foi realizado no laboratório de Citogenômica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com a colaboração da profa Dra Leslie Kulikowski.

4.10.2. Plataforma “*Infinium MethylationEPIC Bead Chip*” da Illumina® 850K

A tecnologia do microarranjo ainda não está disponível para identificar perfis e padrões de metilação aberrantes no genoma global canino. Porém, baseado nas

similaridades entre o ser humano e o cão e nos conceitos de homologia e ortologia, optou-se em utilizar o ensaio “*Infinium MethylationEPIC Bead Chip*” da Illumina® 850K (Illumina, California, USA) desenvolvido para o DNA humano. A plataforma interroga 853.307 sítios de metilação por amostra, distribuídos nas regiões intensificadoras (*enhancers*), promotoras, *gene body* e regiões intergênicas (MORAN, et al., 2016).

A plataforma *Infinium MethylationEPIC* utiliza dois ensaios químicos diferentes que reportam a informação sobre o estado de metilação, chamados Infinium I (*InfI*) e Infinium II (*InfII*). No ensaio *InfI* duas sondas são utilizadas para interrogar o *locus* CpG, uma sonda para CpG metilado e uma para CpG não metilado, nesse modelo, a região 3’ da sonda é desenhada para parear com a base citosina “protegida” (*design* metilado) ou parear com a base timina, resultado da conversão por bissulfito (*design* não metilado). No ensaio *InfII* apenas uma sonda por *locus* CpG é utilizada e complementa a base anterior do sítio de interesse (C pareado a G) e a extensão resulta na adição de uma guanina ou adenina marcada complementar a citosina (*design* metilado) ou timina (*design* não metilado), a intensidade da marcação permite calcular a quantidade de sondas metiladas e não metiladas (Figura 2) (MORAN, et al., 2016, BIBIKOVA, et al., 2011).

Figura 2. Ensaio químicos *Infinium I* e *II*, utilizados nas plataforma *Human Methylation450 BeadChip* e *MethylationEPIC BeadChip* (850K) (*Illumina*) (BIBIKOVA, et al., 2011).

4.10.3. Extração de DNA e conversão por bissulfito

Utilizou-se alíquotas extraídas de DNA de leucócitos e armazenadas conforme descrito no item 4.8.1. A qualidade e a quantidade de DNA foi avaliada pelo teste de DNA Quant-iT™ Picogreen® ds e mensurada no fluorômetro Qubit® (Life Technologies, NY, USA), o mínimo de DNA considerado aceitável para a análise de metilação foi 0,3µg. Para a conversão por bissulfito de sódio empregou-se o kit “Zymo Gold” (EZ DNA Methylation-Gold kit, Zymo Research, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante.

4.10.4. Ensaio de metilação de DNA

As amostras de DNA convertido por bissulfito foram incluídas na plataforma *Infinium Methylation EPIC BeadChip* (*Illumina*, Califórnia, USA), os casos controles e os doentes foram processados no mesmo BeadChip e distribuídos aleatoriamente (Figura 3). Um total de 200ng de DNA convertido por bissulfito foi desnaturado,

neutralizado e amplificado. Após precipitação com isopropanol, o DNA foi recolhido por centrifugação e ressuspensão em tampão para hibridização. Em seguida, as amostras ressuspensas foram hibridizadas nas lâminas do *BeadChip* a 48°C por 16 horas, seguindo o protocolo de metilação disponibilizado pela *Illumina Infinium HD*. As lâminas foram inseridas no scanner Illumina iScan (Illumina, San Diego, CA, USA). Os dados obtidos da leitura dos canais vermelho e verde foram convertidos em um sinal de metilado e não metilado. Após a geração desse sinal um valor β entre 0 e 1 foi fornecido, onde o valor 1 significa totalmente metilado (BIBIKOVA et al., 2006; DU, et al., 2010). O cálculo do valor de β utilizado é realizado pela fórmula abaixo:

$$\beta = \text{Max}(M, 0) / (\text{Max}(M, 0) + \text{Max}(U, 0) + 100)$$

Onde: M - sinal da sonda para CpG metilado

U - sinal da sonda para CpG não metilado

Figura 3. Imagem central: *Beadchip* utilizado na análise. São Paulo, 2016.

4.10.5. Processamento e interpretação dos dados

O controle de qualidade dos dados brutos obtidos da leitura dos *arrays* foi avaliado pelo programa R e o pacote de análise do *Bioconductor WateRmelon* (SCHALKWYK et al., 2013). O primeiro passo das análises incluiu a filtragem das sonda que apresentam baixa detecção de fluorescência, as sondas que apresentaram valores de $p > 0,05$ e contagem de *beads* < 3 em 5% das amostras. A checagem do controle de qualidade foi realizada por meio da distribuição dos sinais obtidos para sondas metiladas e não metiladas e do uso da análise multivariada MDS (Multidimensional Scaling).

O próximo passo na análise foi o ajuste do viés da cor, normalização entre as amostras pelo método quantile e entre sondas pelo método BMIQ (Beta-Mixture Quantile Normalization). Durante essa etapa, ocorre o reconhecimento das diferenças entre as sondas *Infinium I e II* e aproxima as sondas *InfII* para ter uma distribuição próxima das sondas *InfI*. Para cada amostra, as sondas individuais são classificadas como não metilada, hemimetilada (meio metilada) e metilada, quando a sonda do tipo *InfI* foi classificada como hemimetilada, foi ajustada para medir o intervalo entre metilada e não metilada (TESCHENDORFF, et al., 2013).

Os valores de beta foram transformados logaritmicamente em valores M, definido como $\log_2 (Meth/Unmeth)$, onde *Meth* e *Unmeth* são as intensidades das sondas metiladas e não metiladas, respectivamente. A análise estatística foi realizada usando valor M, pois, quando comparado ao valor de beta é mais confiável, uma vez que apresenta uma maior homocedasticidade, ou seja, os dados são mais homogêneos e menos dispersos (DU et al., 2010). Para essa análise foi utilizado o teste de *Bayes*

(*Empirical Bayes Statistics for Differential Expression*) do pacote *limma* (RITCHIE *et al.*, 2015).

O pacote *limma* foi utilizado para identificar o perfil diferencial de metilação entre os grupos amostrais e as sondas foram obtidas após correlação do *p*-valor por Bonferroni ($p < 0.05$). O MVP (*Methylation Variable Positions*) é um método que busca a metilação diferencial em um único sítio CpG e sua análise consiste em calcular o *p*-valor diferencial de metilação. Essa análise mostra também quantos MPVs são encontrados entre os grupos estudados e os dados são filtrados por um *p*-valor de interesse, incluindo para cada sonda, o valor médio de β para cada grupo e o valor β delta para os dois grupos usados ($\Delta\beta$) na comparação. As posições diferencialmente metiladas (DMPs – Differentially Methylated Positions) foram identificadas com valor de delta-beta ($\Delta\beta$) < -0.20 ou $> +0.20$. As sondas foram anotadas de acordo com o genoma hg19 como referência fornecida pela Illumina.

Para realizar as análises comparativas, as amostras estão divididas em grupo controle e grupo portador de linfoma. Os dados gerados acima foram utilizados para analisar as diferenças entre esses dois grupos. Para examinar a inferência de genes homólogos e ortólogos entre as espécies humana e canina utilizou-se as ferramentas de bioinformática *UCSC Genome Browser* (KENT, *et al.*, 2002) e *Ensembl* (VILELLA, *et al.*, 2009) respectivamente.

5. RESULTADOS

5.1. Participantes

O grupo controle foi composto de dez cães, com idade média de 7,5 anos (5-11 anos), sendo três machos (30%) e sete fêmeas (70%), das raças Golden Retriever (90%) e Boxer (10%). Foram incluídos no grupo experimental nove cães, com idade média de 12 anos (5-13 anos), sendo três machos (33,3%) e seis fêmeas (66,7%), composto pelas seguintes raças: sem raça definida (SRD) (3), Labrador (1), Pit Bull (1), Dachshund (1), Golden Retriever (1), Pastor Suíço (1), Maltês (1) (Figuras 4 e 5).

Figura 4. Distribuição de cães com linfoma de acordo com a raça. São Paulo, 2015.

Figura 5. Distribuição de cães com linfoma de acordo com o sexo. São Paulo, 2015.

5.2. Imunofenotipagem e proliferação celular

Baseado nos achados morfológicos [tamanho de linfócito (pequeno, médio ou grande), relação núcleo:citoplasma, presença de atipias], imunofenotipagem e índice de proliferação celular pelo Ki-67 realizou-se a classificação dos linfomas.

As lâminas de H&E exibiram predominância de um tipo celular, todas as amostras exibiram um padrão monoclonal na análise imunocitoquímica, possibilitando a diferenciação entre linfomas B e T. Foram descritos sete casos de linfoma de células B (77,8%), com marcação positiva para CD79a e PAX-5, e negativa para CD3. E dois casos de linfoma de células T (22,2%), com marcação positiva para CD3 e negativa para CD79a e PAX-5 (Figuras 6 e 7).

Dentre os linfomas com fenótipo de células B os seguintes subtipos foram identificados: três linfomas centroblásticos monomórficos (33,3%), um linfoma plasmocitóide (11,1%), um linfoma imunoblástico (11,1%), um linfoma centroblástico polimórfico de pequenas e grandes células (11,1%) e um linfoma centroblástico-centrocítico (11,1%). Os linfomas com fenótipo de células T incluíram os subtipos: um linfoma linfoblástico (11,1%) e um linfoma plasmocitóide (11,1%) (Tabela 3).

Figura 6. Imunocitoquímica de linfonodo caracterizado pelo predomínio de células T. A: CD79a (-); B: CD3 (+) (aumento de 40x). São Paulo, 2015.

Figura 7. Imunocitoquímica de linfonodo caracterizado pelo predomínio de células B. A: CD79a (+); B: CD3 (-) (aumento de 200x). São Paulo, 2015.

O índice de proliferação celular baseado na porcentagem de células marcadas positivamente com Ki-67 em cada amostra de linfonodo (Figura 8) apresentou média igual a $40\% \pm 24,09$, descritos na Tabela 3.

Figura 8. Imunocitoquímica de linfonodos caracterizados pelos diferentes índices de proliferação celular. A: Ki-67=40% e B: Ki-67=67% (aumento de 400x). São Paulo, 2015.

Tabela 3. Classificação de 9 casos de linfoma de acordo com a classificação de Kiel atualizada. São Paulo, 2015.

Caso	Classificação	Imunofenotipagem	%Ki-67
1	Centroblástico polimórfico de pequenas e grandes células	B	67,0%
2	Plasmocitóide	T	8,0%
3	Imunoblástico	B	40,0%
4	Linfoblástico	T	57,0%
5	Plasmocitóide	B	38,0%
6	Centroblástico-Centroclítico	B	3,0%
7	Centroblástico monomórfico	B	67,4%
8	Centroblástico monomórfico	B	68,0%
9	Centroblástico monomórfico	B	23,0%

De acordo com os fatores avaliados, seis casos foram classificados como linfoma de células B de alto grau (66,7%), um caso de linfoma de células B de baixo grau (11,1%) e dois casos de linfoma de células T de alto grau (22,2%) (Tabela 4).

Tabela 4. Classificação de Kiel modificada de acordo com o grau de malignidade. São Paulo, 2015.

Imunofenótipo	Número de casos (% de 9)	Morfologia determinada
Células B	6 (66,7%)	Alto grau
	1 (11,1%)	Baixo grau
Células T	2 (22,2%)	Alto grau

5.3. Imunocitoquímica (5 metil-citosina)

A imunorreatividade de 5MeCyt se caracterizou por marcação nuclear uniforme em algumas células (considerada marcação forte), enquanto que outras apresentaram padrão de marcação nuclear pontilhado (considerada marcação fraca). A Figura 9 exemplifica a marcação de 5MeCyt em leucócitos demonstrando as diferenças entre o padrão de marcação forte e fraca.

Figura 2. Imunocitoquímica de leucócitos em emblocados parafinados caracterizando os diferentes escores de imunorreatividade do anticorpo anti-5MeCyt. A: imunorreatividade forte e B: imunorreatividade fraca (aumento de 400x). São Paulo, 2015.

Devido aos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em leucócitos de ambos os grupos apresentarem distribuição normal, o Teste t-Student foi o teste estatístico de

escolha. A Tabela 5 apresenta os escores obtidos das análises de leucócitos do grupo controle e do grupo experimental.

Tabela 1. Média, mediana, valores mínimo e máximo referentes aos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em leucócitos dos animais do grupo controle e do grupo experimental. São Paulo, 2015.

Escores de imunorreatividade de 5MeCyt	Controle (n=10)	Linfoma (n=9)
Média	227,5	208,7
Mediana	226,5	213,8
Mínimo	196,6	181,4
Máximo	253,6	224,3
Desvio padrão	15,1	13,3

Os escores de imunorreatividade de 5MeCyt em leucócitos do grupo com linfoma apresentaram níveis mais baixos quando comparado com o grupo controle ($208,7 \pm 13,3$ versus $227,5 \pm 15,1$), $p = 0,015$, representados na Figura 10.

Figura 3. Representação gráfica dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em leucócitos dos animais do grupo controle (cont) (n=10) e do grupo com linfoma (exp) (n=9). Teste t de Student $P < 0,05$ IC 95%.

5.4. Quantificações da metilação global do DNA nos leucócitos pelo método HPLC

A porcentagem da metilação global do DNA foi calculada de acordo com a área obtida nos cromatogramas referentes a desoxicitidina (dC) e da 5-metil-desoxicitidina (5-metil-dC) como demonstrado na Figura 11.

A metilação de DNA refere-se à medidas quantitativas de 5-metil-dC, indicada como porcentagem (%) de 5-metil-dC/(5-metil-dC+dC). Pela análise dos resultados dos cromatogramas, observou-se que os cães com linfoma (grupo experimental) mostraram uma metilação global de DNA reduzida quando comparado com os cães saudáveis (grupo controle) ($4,29 \pm 0,10$ versus $4,49 \pm 0,24$, expressas como porcentagens de 5-metil-dC/5-metil-dC+dC; $p = 0,027$; Tabela 6 e Figura 12).

Figura 11. Cromatograma de animal com linfoma obtido por HPLC-DAD ($\lambda=260$ e 286 nm) de **1:** a quantidade de desoxicitidina (dC). **2:** quantidade de 5-metil-desoxicitidina (5-metil-dC). A área referente a curva origina os valores numéricos para serem inseridos na fórmula do cálculo da porcentagem de metilação global de DNA (5-metil-dC).

Tabela 6. Média, mediana, valores mínimo e máximo das porcentagens de metilação de DNA (% 5MeCyt) em leucócitos dos animais do grupo controle e com linfoma. São Paulo, 2015.

Metilação de DNA (5-metil-dCx100/5-metil-dC+dC)	Controle (n=10)	Linfoma (n=9)
Média (%)	4,49	4,29
Mediana (%)	4,49	4,34
Mínimo (%)	4,31	3,76
Máximo (%)	4,67	4,53
Desvio padrão	0,10	0,24

Figura 12. Representação gráfica da porcentagem de metilação global do DNA (%5-metil-dC) dos animais do grupo controle (cont) (n=10) e do grupo com linfoma (exp) (n=9). Teste t de Student $p < 0,05$ IC 95%.

5.4.1. Correlação entre os métodos de quantificação da metilação global do DNA nos leucócitos: HPLC e ICQ

Houve correlação positiva entre as duas metodologias de quantificação de metilação do DNA, sendo considerada moderada, pois o coeficiente de correlação obtido pelo teste de Pearson foi 0,50 ($p = 0,029$) (Figura 13).

Figura 13. Representação gráfica da correlação entre os resultados obtidos pelos métodos HPLC e ICQ dos animais de ambos os grupos (n=19). Correlação de Pearson. $P < 0,05$ IC 95%.

5.4.2. Correlação entre a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) e a idade entre os grupos experimental e o controle

Os cães do grupo controle apresentaram uma idade média menor do que o grupo experimental ($7,5 \pm 3,04$ versus $10,55 \pm 2,62$; $p = 0,044$; Figura 14), porém, o coeficiente de correlação entre a idade dos animais de ambos os grupos e a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) foi de $-0,336$ ($p = 0,159$). Apesar de não haver significância estatística entre a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) e a idade dos cães, pode-se observar uma correlação negativa fraca entre ambos. Ou seja, a metilação global nos leucócitos tende a diminuir com o aumento da idade dos cães (Figuras 15). No entanto, os menores valores de metilação global de DNA são vistos nos cães mais idosos do grupo experimental.

Figura 14. Representação gráfica da distribuição dos cães dos grupos controle (n=10) e experimental (n=9) de acordo com a idade. Teste t de Student. $P < 0,05$ IC 95%.

Figura 15. Representação gráfica da correlação entre a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) e a idade dos animais de ambos os grupos (n=19). Correlação de Pearson. $P > 0,05$ IC 95%. ▲: grupo controle ●: grupo experimental

5.4.3. Correlação entre a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) e a quantidade de linfócitos circulantes entre o grupo experimental e o controle

Os cães do grupo controle apresentaram menor quantidade de linfócitos circulantes em comparação ao grupo experimental ($2.383 \mu\text{L} \pm 660.45$ versus $4.827 \mu\text{L} \pm 8.419$), no entanto, não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste de Mann Whitney ($p = 0,364$). Em adição, não se observou correlação (coeficiente de correlação: $0,052$; $p = 0,829$) entre a metilação global e a quantidade de linfócitos circulantes pelo teste de Pearson.

5.4.4. Correlação entre a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) e o índice de proliferação celular Ki-67 dos linfonodos do grupo experimental

A média da porcentagem de metilação global do DNA dos leucócitos (HPLC) do grupo doente foi $4,29 \pm 0,24$ e a média dos índices de proliferação celular obtidos pela imunomarcagem do anticorpo Ki-67 dos linfonodos foi $41,26 \% \pm 25,55$. Estatisticamente há correlação positiva entre a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) e o índice de proliferação celular Ki-67 dos linfonodos do grupo experimental, com um coeficiente de correlação de $0,773$ ($p = 0,0145$), sugerindo que um aumento na metilação global de leucócitos pode ser observado em tumores com maiores índices de proliferação celular (Figura 16).

Figura 16. Representação gráfica da correlação entre a metilação global do DNA nos leucócitos (HPLC) e o índice de proliferação celular Ki-67 dos linfonodos do grupo experimental. Correlação de Pearson. $P > 0,05$ IC 95%.

5.5. Identificação dos perfis diferenciais de metilação do DNA

5.5.1. Participantes

Nessa etapa, o grupo controle foi composto de quatro cães, com idade média de 9,25 anos (5-11 anos), sendo um macho (25%) e três fêmeas (75%), das raças Golden Retriever (100%). Foram incluídos no grupo experimental, quatro cães portadores de linfoma de células B de alto grau, com idade média de 10,5 anos (6-13 anos), sendo três machos (75%) e uma fêmea (25%), composto pelas seguintes raças: SRD (1), Labrador (1), Golden Retriever (1), Maltês (1).

5.5.2. Filtragem e Normalização

As sondas que falharam durante o processo de hibridização do experimento foram removidas na etapa de filtragem. Após a normalização dos dados pelo método

BMIQ, os gráficos gerados foram analisados para avaliar se as sondas *InfII* obtiveram uma distribuição idêntica às sondas *InfI*, para que ambos os tipos de sondas estejam alinhados estatisticamente. Essa etapa foi muito importante para a análise do DNA canino, uma vez que retirou do estudo as sondas que não apresentaram leitura em pelo menos uma amostra. Dessa forma, reduziu-se a quantidade de sítios CpG pesquisados, criando uma matriz de 34.574 sondas que foram analisadas nas 8 amostras. Os gráficos gerados demonstram a similaridade das amostras por meio de agrupamento hierárquico baseado nos valores das sondas analisadas. Os agrupamentos indicam que, levando em consideração todos os sítios, matematicamente não houve como agrupar os animais, provavelmente pelo reduzido número de sondas hibridizadas, baixo número e homogeneidade das amostras (Figura 17).

Figura 17. Gráfico de normalização BMIQ. A: amostras pré normalização e B: amostras pós normalização. Ctr: animais do grupo controle; Pct: animais do grupo portador de linfoma.

Para confirmar que não houve viés entre os grupos amostrais, as 1000 sondas que apresentaram maior variância entre as amostras (desvio padrão) foram usadas no gráfico MDS (*Multidimensional scaling*). O gráfico MDS agrupa as amostras por similaridade dentro do conjunto de dados e possibilita avaliar o nível de similaridade

entre elas. Nota-se que os cães 4, 30 e 15 se distanciaram, logo os valores desses cães se diferem bastante dos outros (Figura 18).

Figura 18. Gráfico MDS baseado em 1000 valores de β de sondas com maior variância. A: MDS pré normalização e B: MDS pós normalização. Ctr: animais do grupo controle; pct: animais do grupo portador de linfoma.

5.5.3. Comparação dos grupos controle e experimental

Na análise foram identificados 34.574 sondas que hibridizaram no genoma dos animais estudados. A comparação dos perfis de metilação entre os casos e controles revelou 606 regiões diferencialmente metiladas (p -valor $<0,05$). Nessa etapa, como o BeadChip850K não é específico para o DNA canino, os genes atribuídos à determinadas sondas são referenciados com base no genoma humano hg19. Por esse motivo, realizou-se a inferência da homologia desses genes através do *UCSC Genome Browser*. Posteriormente, foram feitas análises ortológicas dos genes pelo banco de dados Ensembl. Dos 783 genes categorizados por determinadas sondas e que diferem em níveis de metilação, 550 apresentaram similaridades homólogas e ortólogas.

Na análise entre o padrão de metilação do DNA entre os cães com linfoma e os controle, 92 genes diferentemente metilados apresentaram $p < 0,01$, destacando-se os genes descritos na tabela 7. Selecionou-se também algumas probes que representam genes de interesse para o estudo com $p > 0,01$ a $0,05$, apresentando-se hiper ou hipometilados nos casos de linfoma em relação ao grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7: Lista de sondas hipermetiladas e hipometiladas no grupo experimental em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). São Paulo, 2017.

ID Sonda	Gene	Gene description	logFC	p-valor
cg26144202	<i>KCTD11</i>	potassium channel tetramerization domain containing 11	-564.935.117.912.232	0,0001
cg26144202	<i>KDM4B</i>	lysine demethylase 4B	-40.214.998.817.122	0,0006
cg05926784	<i>RFX1</i>	regulatory factor X1	-232.865.135.236.799	0,0008
cg00913953	<i>CHD5</i>	chromodomain helicase DNA binding protein 5	-219.793.357.460.489	0,0011
cg19329121	<i>PDK4</i>	pyruvate dehydrogenase kinase 4	-191.159.241.211.223	0,0025
cg09073539	<i>PAX2</i>	paired box 2	-19.110.476.323.946	0,0036
cg04205107	<i>PLD5</i>	phospholipase D family member 5	-169.503.946.066.706	0,0047
cg17804348	<i>TP73</i>	tumor protein p73	-15.990.516.386.811	0,0054
cg11980500	<i>TBC1D16</i>	TBC1 domain family member 16	-189.968.102.538.758	0,0056
cg01083397	<i>MECP2</i>	methyl-CpG binding protein 2	-176.306.255.238.775	0,0065
cg20674490	<i>RUNX3</i>	runt related transcription factor 3	-189.249.421.576.613	0,0106
cg04709321	<i>RASGRF2</i>	Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 2	-144.343.103.706.994	0,0218
cg17983217	<i>DDAH2</i>	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	-134.883.058.962.272	0,0228
cg05886671	<i>NEUROG3</i>	neurogenin 3	-121.890.262.341.614	0,0231
cg08101036	<i>HOXA3</i>	homeobox A3	-132.568.065.256.385	0,0251
cg06829968	<i>ONECUT1</i>	one cut homeobox 1	-110.506.200.031.854	0,0260
cg01003015	<i>VIM</i>	vimentin	-111.695.841.212.767	0,0336
cg09621572	<i>LTA</i>	lymphotoxin alpha	-110.876.080.768.704	0,0410
cg16788538	<i>BCL7B</i>	BCL tumor suppressor 7B	-107.969.136.790.801	0,0451
cg22281380	<i>GRB10</i>	growth factor receptor bound protein 10	173.156.804.546.141	0,0034
cg09075558	<i>WNT3A</i>	Wnt family member 3A	179.660.497.849.853	0,0243
cg25504403	<i>ORAOV1</i>	oral cancer overexpressed 1	111.866.817.823.371	0,0267
cg26973266	<i>TRAF4</i>	TNF receptor associated factor 4	153.777.903.024.194	0,0298
cg17337672	<i>FGFR2</i>	fibroblast growth factor receptor 2	151.069.810.097.825	0,0341
cg06382559	<i>TLX1</i>	T-cell leukemia homeobox 1	121.422.502.873.281	0,0413
cg09679690	<i>CDK5</i>	cyclin dependent kinase 5	111.973.892.685.677	0,0420

Legenda: ID Sonda- sítio diferentemente metilado; Gene: gene associado à sonda; logFC: M-valor que mostra a diferença de metilação entre o grupo controle e experimental, valores positivos indicam sondas hipermetiladas e valores negativos sondas hipometiladas no grupo controle em relação ao experimental.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo realizou-se uma análise comparativa da metilação global do DNA de leucócitos obtidos de sangue periférico de cães saudáveis e cães com linfoma não Hodgkin. Para tal propósito, utilizamos as técnicas de imunocitoquímica e HPLC. Os resultados demonstram que os animais portadores de linfoma apresentam hipometilação global do DNA comparados ao grupo controle, sugerindo que os cães com linfoma têm um decréscimo sistêmico da metilação global do DNA em comparação aos cães saudáveis. Os termos hipo e hipermetilação se referem a “menos” ou “mais” metilação com relação a algum DNA padrão, no caso da epigenética do câncer, padroniza-se o DNA de células ou tecidos saudáveis (TORAÑO, et al., 2012).

O grupo de cães com linfoma estudado apresentou idade média de 12 anos, com predomínio de fêmeas e cães com raça definida. Em uma revisão de literatura, Teske (1994) concluiu que linfomas afetam predominantemente cães de meia idade (entre 6.3 a 7.7 anos), um estudo realizado no Reino Unido observou que a idade média de 103 cães com linfoma foi 6.7 anos e uma pesquisa brasileira notou a média de 8.7 anos em uma população de 65 cães portadores de linfoma (TESKE, 1994; EDWARDS, et al., 2003; KIMURA, et al., 2011). Bernese Mountain Dog, Boxer, Bulldog, Bullmastiff, Pastor Alemão, Golden Retriever, Labrador Retriever, Scottish Terrier são consideradas as raças com maior risco de desenvolver o linfoma (VILLAMIL, et al., 2009; EDWARDS, et al., 2003). Em dois estudos, no Brasil e nos Estados Unidos, houve predominância de cães sem raça definida (KIMURA, et al., 2011, VILLAMIL, et al., 2009). Na imunofenotipagem houve predomínio do linfoma de células B (66,7%), comparado com 33,3% de linfoma de células T. Numa análise retrospectiva, composta por 608 casos de linfoma canino, 63,8% corresponderam ao fenótipo B, achados

similares foram descritos por Sözman e colaboradores, no qual 64% de 50 casos caracterizavam-se como linfoma de células B (PONCE, et al., 2010; SÖZMEN, et al., 2005).

Primeiramente, ressalta-se que a quantificação da metilação global do DNA extraído de amostras de sangue periférico foi efetuada com sucesso pelas técnicas de HPLC e ICQ. A inclusão de leucócitos em parafina possibilitou o uso de uma técnica de baixo custo, demonstrada inicialmente em células neoplásicas, a imunomarcção nuclear do anticorpo contra a 5MeCyt proporcionou a visualização da imunorreatividade em diferentes graus nos leucócitos circulantes. Por meio do uso de escores, foi possível diferenciar nos núcleos dos leucócitos marcações escuras e uniformes (consideradas fortes) a marcações claras e pontuais (consideradas fracas), sugestivas de hiper e hipometilação da cromatina, respectivamente (Hernandez-Blazquez, et al., 2000). Ressalta-se que houve uma correlação moderada entre os resultados obtidos pelos métodos ICQ e HPLC (considerado “método ouro” na quantificação da metilação global), dessa forma, a ICQ refletiu visualmente os resultados obtidos pelo HPLC. Morimoto e colegas (2016) e Hernandez-Blazquez e colaboradores (2000) demonstraram que tumores mais agressivos apresentam menores níveis de metilação global do DNA em análises imunoistoquímicas de tecidos neoplásicos, o nosso estudo sugere que essa tendência de metilação aberrante também pode ser observada em leucócitos circulantes de cães portadores de linfoma e sadios. As similaridades dos achados em células e tecidos reforçam a importância do estudo da metilação nos leucócitos circulantes, principalmente pelo fácil acesso às amostras por método de coleta não invasivo.

Embora a análise por HPLC seja uma técnica com alto custo de equipamentos e demanda uma maior quantidade de DNA extraído de boa qualidade (5 µg), a extração do DNA e seu processamento foram eficientes nos leucócitos caninos, o volume da amostra e o tempo de armazenagem (leucócitos mantidos congelados por meses) se mostraram adequados e capazes de serem reproduzidos e utilizados rotineiramente. Nossos resultados corroboram com os de Frizo e colaboradores (2013), que demonstraram hipometilação global do DNA de leucócitos de pessoas com diferentes tipos de câncer (hematológicos, vesícula urinária, gastrointestinal, próstata, mama, rim, pulmão e laringe) pelo método de cromatografia líquida/espectrometria de massas (LC/MS). Outro estudo mostrou que a redução na metilação global de DNA detectável no sangue periférico é um evento inicial no desenvolvimento de MBCN em humanos (WONG DOO, et al., 2016). A hipometilação global do DNA é um achado quase que geral em muitos tecidos neoplásicos humanos e em células precursoras do câncer (GOELZ, et al., 1985; ESTELLER, 2008).

A metilação de DNA tem sido intensamente pesquisada como um fator epigenético envolvido na carcinogênese, porém, o seu verdadeiro papel durante o desenvolvimento do câncer ainda é bastante discutível. As causas da perda de metilação global ainda não são bem definidas, mas fatores endógenos e exógenos, como dieta (insuficiência de folato), idade, fumo, consumo de álcool e outros carcinógenos podem alterá-la (BRENNAN & FLANAGAN, 2012). Experimentos com ratos mostraram que a redução na 5MeC em tecidos tumorais pode, por si só, induzir a carcinogênese, possivelmente por promover ativação de proto oncogenes, influenciar a mobilização de retrotransposons no genoma, causando instabilidade cromossômica (EDEN, et al., 2003; GAUDET, et al., 2003, ISKOW, et al., 2010). Lim et al. (2008) reportou que pacientes assintomáticos com adenoma colorretal (precursor do câncer colo retal humano) já

apresentavam hipometilação do DNA de leucócitos anteriormente ao desenvolvimento do câncer invasivo, e a ocorrência de hipometilação tanto no tecido neoplásico como em tecidos adjacentes histologicamente normais, sugerem um papel causal ao padrão de metilação (YUASA, 2010; BRENNAN & FLANAGAN, 2012). Por essas razões, muitas análises epidemiológicas sugerem um efeito sistêmico da hipometilação do DNA derivado do sangue periférico na predisposição ao câncer e utilizam a metilação de leucócitos como um promissor biomarcador de risco em humanos (BRENNAN & FLANAGAN, 2012; LI, et al., 2014).

Por outro lado, o alto índice de proliferação celular e taxas de biossíntese de ácidos nucleicos associados à má alimentação e absorção em pacientes oncológicos podem gerar um estado de deficiência do grupo metil, sendo assim, a hipometilação global também pode ser vista como uma consequência do câncer durante o desenvolvimento da doença (LELBACH et al., 2007; DUTHIE, et al., 2002). Importante ressaltar que em tumores epiteliais de ovário humano há evidências que a hipo e a hipermetilação do DNA coexistam no mesmo tumor, mas em diferentes sequências, sugerindo que a metilação é um processo dinâmico (EHRlich, et al., 2006).

Pelo presente estudo não foi possível reforçar o papel da hipometilação como causa ou consequência ou estabelecer uma relação entre hipometilação global de leucócitos e risco de câncer, sendo necessárias futuras investigações epidemiológicas para clarificar como esses processos biológicos operam nos leucócitos e afetam a formação e o desenvolvimento tumoral no linfoma canino e em outras neoplasias.

A interpretação da metilação aberrante do sangue periférico apresenta outra questão, os processos imunológicos relacionados à inflamação no desenvolvimento do câncer desencadeiam mudanças nas subpopulações leucocitárias, as quais podem alterar o perfil epigenético do DNA de sangue periférico, portanto, a presença de metilação

aberrante pode refletir eventos coincidentes no desenvolvimento do linfoma como resposta inflamatória ou imune, porém, o verdadeiro papel da metilação na regulação imune ainda é limitado (TESCHENDORFF, et al., 2009; WONG DOO, et al., 2016). No presente estudo não houve correlação entre a quantidade de metilação global e a quantidade de linfócitos circulantes.

Outro fator relevante no padrão de metilação é a idade, em seres humanos há uma queda da metilação global com o envelhecimento (TERRY, et al., 2011). O tecido tumoral é epigeneticamente mais antigo do que a idade cronológica de seus doadores, a discrepância entre as idades epigenética e cronológica pode predizer a incidência de câncer ou mortalidade, Zheng et al. (2016) concluiu que a idade epigenética sanguínea pode espelhar anormalidades epigenéticas relacionadas ao desenvolvimento de câncer, servindo como um biomarcador de detecção tumoral precoce. Em particular, o declínio das stem cells hematopoiéticas em indivíduos mais velhos é determinado pelas modificações da metilação causadas pela idade. Ferraresso e colegas (2014) relacionaram o acúmulo de hipermetilação do promotor de TFPI-2 com a idade de cães portadores de linfoma de grandes células B difusas. Esse estudo observou uma tendência de diminuição na metilação global dos leucócitos com o aumento da idade dos cães, no entanto, estudos epidemiológicos em larga escala com uma população hígida e mais homogênea são necessários para confirmar esses dados.

Em concordância com a classificação utilizada por Sokołowska et al (2012), 44,4% dos linfomas apresentaram um índice de proliferação celular alto (Ki-67: 50-70%), 33,3% moderado (Ki-67: 20-50%) e apenas 22,2% dos casos tiveram baixa expressão (Ki-67<20%). Em linfomas de células B de alto grau caninos, valores de Ki-67 intermediários foram relacionados com um prognóstico melhor (POGGI, et al.,

2016). Os achados sugerem um aumento na metilação global do DNA de leucócitos circulantes (HPLC) em pacientes com tumores que apresentam porcentagens de Ki-67 mais elevadas, sendo necessários estudos que correlacionem o tempo de sobrevida e quantidade de metilação global do DNA para clarificar esses achados.

Os dados obtidos pelos métodos HPLC motivou um delineamento adicional nessa análise. Na medicina humana, avanços nas tecnologias epigenéticas, baseadas na hibridização em microarranjos têm oferecido a possibilidade de examinar o estado epigenético em diferentes loci associados com o fenótipo do câncer. Essa técnica é direcionada a dois tipos de dados: agrupamento de genes (descoberta de perfis de metilação) ou identificação de padrões incomuns na seleção de genes de interesse (DEATHERAGE, et al., 2009).

Como até o momento não há disponibilidade dessa técnica específica para amostras caninas, nós utilizamos o *Infinium Human MethylationEPIC BeadChip* (850K) para a análise comparativa de perfis de metilação do DNA de leucócitos de cães portadores de linfoma e cães saudáveis. Wong e colaboradores (2013) investigaram a utilidade da plataforma Illumina® *Infinium Human Methylation BeadChip* 450K (interroga 482.421 ilhas CpGs) para analisar a metilação do DNA em amostras de camundongos, e demonstraram que um subconjunto de sondas encontradas nessa matriz (13.715 sondas) foi capaz de demonstrar perfis de metilação do DNA no genoma de camundongo, sendo uma opção viável e acessível para essa espécie.

Han e Zhao (2009) revelaram um número total de ilhas CpGs maior no genoma canino em relação ao humano, no entanto, o cão apresenta menos ilhas CpGs associadas a regiões promotoras do que os humanos (nos genes homólogos examinados no estudo) e uma abundância de ilhas CpGs se encontra nas regiões não codificadoras (incluindo

regiões intergênicas e intrônicas) do genoma canino. Ainda que se observem essas diferenças, pela nossa análise, das 853.307 ilhas CpGs investigadas, houve hibridização de 34.574 sondas nas amostras caninas. Desse total, foi possível observar diferença significativa no nível de metilação de 606 sondas, e através das similaridades homólogas e ortólogas, possibilitou identificar 550 genes diferentemente metilados entre os dois grupos. Num estudo comparativo entre genes homólogos humanos e caninos, 5.331 genes (52,3%) apresentavam ilhas CpGs associadas a região promotora presentes em ambos os genomas (HAN & ZHAO, et al., 2009).

Devido a essa localização, essas ilhas podem estar relacionadas com a expressão gênica, sendo que a hipermetilação desses sítios são correlacionados com alterações na regulação transcricional, tanto para a sua inativação (regiões promotoras), quanto para a sua transcrição facilitada (corpo do gene) (PORTELLA & ESTELLER, 2010). A hipometilação em regiões promotoras específicas podem ativar a expressão aberrante de oncogenes e induzir a perda de imprinting em alguns loci (PORTELLA & ESTELLER, 2010).

Entre os 550 genes relacionados aos sítios diferentemente metilados, destacam-se três genes que estavam hipermetilados no grupo experimental ($p < 0,001$):

- KCTD11 (potassium channel tetramerization domain containing 11): gene supressor tumoral, alguns tipos de câncer apresentam um decréscimo na sua expressão, como o adenocarcinoma prostático e o meduloblastoma humano (ZAZZERONI, et al., 2014).

- RFX1 (regulatory factor X1): fator de transcrição, frequentemente silenciado epigeneticamente em glioblastomas humanos, RFX1 regula diretamente a expressão de

CD44, esse mecanismo pode contribuir para a proliferação e invasão de células de glioblastoma (FENG, et al., 2014).

- KDM4B (lysine demethylase 4B): proteína envolvida na desmetilação de histona e tem papel na carcinogênese de muitos tumores sólidos. A expressão de KDM4B pode estar associada com um subtipo agressivo de linfoma Hodgkin e envolvida com radioresistência (BUR, et al., 2016).

Na análise entre os padrões de metilação do DNA entre os grupos experimental e controle alguns genes relacionados à progressão e ao desenvolvimento do câncer ($p < 0,05$) apresentaram-se hipermetilados nos cães com linfoma:

- RUNX3 (runt related transcription factor 3): gene supressor tumoral, membro da família de fatores de transcrição RUNT. Em câncer gástrico humano, RUNX3 é frequentemente inativado por perda de alelos ou pelo silenciamento gênico secundário à hipermetilação da região promotora (BAE & CHOI, 2004).

- RASGRF3 (Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 2): gene supressor tumoral que exerce papel essencial na proliferação de linfócitos, sinalização de células T e linfomagenese (RUIZ, et al., 2007). Hipermetilação de RASGRF3 foi associada a recorrência de câncer prostático (MAHAPATRA, et al., 2012).

- BCL7B (BCL tumor suppressor 7B): membro da família de genes BCL7 (juntamente com os genes BCL7A e BCL7C). Em humanos, a diminuição da expressão de BCL7A está relacionada ao desenvolvimento de LNH e linfoma epiteliotrópico (MORTON, et al., 2009; CARBONE, et al., 2008). A deleção do BCL7B em pacientes com a síndrome Williams-Beuren aumenta o risco de transformações malignas. BCL7B

regula negativamente a via de sinalização Wnt (associada à proliferação celular), e positivamente, a via apoptótica (UEHARA, et al., 2015).

Genes observados hipometilados no grupo experimental incluem:

- TRAF4 (Tumor Necrosis Factor receptor associated factor 4): os membros da família TRAF exercem um importante papel na regulação da sobrevivência, proliferação celular e resposta ao estresse. Hiperexpressão de TRAF4 foi descrita em linfomas de zona marginal humano, destacando seu papel como fator de transcrição na patogênese do linfoma (ARRIBAS, et al., 2012). A redução da expressão de TRAF4 promoveu efeitos inibitórios na habilidade proliferativa de cultura de células de osteossarcoma (YAO, et al., 2014).

- CDK5 (Cyclin dependent kinase 5): membro da família de quinases dependentes de ciclinas, exerce papel na resposta ao dano do DNA e ativação do checkpoint do ciclo celular. Hipometilação de CDK5 foi descrita em linfoma de células do manto (LESHCHENKO, et al., 2010). Pacientes com linfoma difuso de grandes células B apresentam uma maior expressão de CDK5 em comparação com indivíduos saudáveis (FARINA, et al., 2017).

Embora haja um diferencial nos padrões de metilação desses genes, não foi possível localizar no genoma canino em qual região gênica (região promotora, CpG shore ou corpo do gene) que se localizam essas ilhas CpGs. A falta de tecnologias de análise de perfis de metilação do genoma global específica para cães dificulta grandemente a aplicação desta metodologia nesse modelo de estudo e ressalta a necessidade de se desenvolver BeadChips específicos para a espécie canina.

Os genes encontrados diferentemente metilados ainda não foram descritos nos linfomas caninos, é importante validar nossos achados em estudos mais amplos e conduzidos para detectar regiões diferentemente metiladas e loci específico de cada um dos 550 genes descritos, através de técnicas de PCR e sequenciamento, além de verificar suas expressões gênicas em tecidos neoplásicos e cultivos celulares. Esse seguimento poderá identificar metilação aberrante em regiões específicas de importância funcional e melhorar o entendimento do papel da metilação de DNA nos linfomas, objetivando também a pesquisa de novos alvos terapêuticos e possíveis biomarcadores para linfomas caninos.

Além disso, nossos resultados reiteram a importância da utilização da biópsia líquida na pesquisa do câncer, o uso de sangue periférico ao invés de tecido tumoral apresenta como principais vantagens o fácil acesso e a possibilidade de coletar amostras do mesmo paciente em diferentes momentos, possibilitando utilizá-lo para pesquisar biomarcadores diagnósticos e fazer o acompanhamento durante o tratamento.

Por fim, este ensaio foi pioneiro em associar o linfoma canino com hipometilação global do DNA e padrões de metilação aberrantes em leucócitos obtidos de sangue periférico. No entanto, se faz necessário investigar o papel exato da hipometilação global e da hipermetilação de regiões promotoras durante a patogênese para fornecer uma melhor compreensão do linfoma canino.

7. CONCLUSÕES

- Esse estudo mostrou que os cães com linfoma multicêntrico apresentam um decréscimo da metilação global do DNA obtido de leucócitos periféricos em comparação aos cães saudáveis.
- Os genes *KCTD11*, *KDM4B*, *RFX1* apresentaram-se diferentemente metilados ($p < 0,001$) entre o grupo controle e o grupo experimental.
- As técnicas de HPLC e ICQ foram eficazes em quantificar a metilação global do DNA de leucócitos circulantes e uma correlação moderada foi observada entre elas.
- O kit *Infinium Human MethylationEPIC BeadChip* (850K) permitiu a análise comparativa de perfis de metilação do DNA de leucócitos de cães portadores de linfoma e cães saudáveis, porém apresentou falhas no processo de hibridização, prejudicando a análise de algumas das 850.000 ilhas CpGs pesquisadas.

8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Parte dos resultados obtidos nesta dissertação foi apresentada em forma de pôster no *3rd World Veterinary Cancer Congress*.

9. REFERÊNCIAS

- Aresu, L. Canine lymphoma, more than a morphological diagnosis: what we have learned about diffuse large B-cell lymphoma. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, n. 77, 2016.
- Arribas, A.J.; Campos-Martín, Y.; Go´mez-Abad, C.; Algara, P.; Sanchez-Beato, M.; Rodriguez-Pinilla, M.S.; Montes-Moreno, S.; Martinez, N.; Alves-Ferreira, J.; Piris, M.A.; Mollejo, M. Nodal marginal zone lymphoma: gene expression and miRNA profiling identify diagnostic markers and potential therapeutic targets. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 9-21, 2012.
- Bae, S.C.; Choi, J.K. Tumor suppressor activity of RUNX3. **Oncogene**, v. 23, p. 4336–4340, 2004.
- Bibikova, M.; Lin, Z.; Zhou, L.; Chudin, E.; Garcia, E.W.; Wu, B.; Doucet, D.; Thomas, N.J.; Wang, Y.; Vollmer, E.; Goldmann, T.; Seifart, C.; Jiang, W.; Barker, D.L.; Chee, M.S.; Floros, J.; Fan, J.B. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. **Genome Research**, v. 6, n. 3, p. 383-93, 2006.
- Bibikova, M.; Barnes, B.; Tsan, C.; Ho, V.; Klotzle, B.; Le, J.M.; Delano, D.; Zhang, L.; Schroth, G.P.; Gunderson, K.L.; Fan, J.B.; Shen, R. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. **Genomics**, v. 98, n. 4, p. 288-95, 2011.
- Breen, M.; Modiano, J.F. Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans- man and his best friend share more than companionship. **Chromosome Research**, v. 16, p. 145–154, 2008.
- Brennan, K.; Flanagan, J. Is there a link between genome-wide hypomethylation in blood and cancer risk? **Cancer Prevention Research**, v. 5, p. 1345-1357, 2012.
- Bronson, R.T. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. **American Journal of Veterinary Research**. 43:2057-2059, 1982.
- Broyde, A.; Boycov, O.; Strenov, Y.; Okon, E.; Shpilberg, O.; Bairey, O. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. **American Journal of Hematology**, v. 84, n. 6, p. 338-43, 2009.
- Bryan, J.N.; Jabbes, M.; Berent, L.M. *et al.* Hypermethylation of the *DLCL1* CpG island does not alter gene expression in canine lymphoma. **BMC Genetics**. 10:73, 2009.
- Bur, H.; Haapasaari, K.; Turpeenniemi-Hujanen, T.; Kuittinen, O.; Auvinen, P.; Marin, K.; Soini, Y.; Karihtala, P. Strong KDM4B and KDM4D expression associates with radioresistance and aggressive phenotype in classical Hodgkin lymphoma. **Anticancer Research**, v. 36, p. 4677-4684, 2016.

Cancer Statistics. National Cancer Institute at the National Institutes of Health: Disponível em: <www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>. Acesso em: 1 mai. 2014.

Cancer Stat Facts: Non-Hodgkin Lymphoma. National Cancer Institute at the National Institutes of Health: Disponível em: <seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl.html>. Acesso em: 5 mai. 2014.

Carbone, A.; Bernardini, L.; Valenzano, F.; Bottillo, I.; De Simone, C. *et al.* Array-based comparative genomic hybridization in early-stage mycosis fungoides: recurrent deletion of tumor suppressor genes BCL7A, SMAC/ DIABLO, and RHOV. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 47, n. 12, p. 1067–1075, 2008.

Cedar, H.; Bergman, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. **Nature Reviews**, v. 10, p. 295-304, 2009.

Choi, J.Y.; James, S.R.; Link, P.A.; McCann, S.E.; Hong, C.C.; Davis, W., *et al.* Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 30, p. 1889-97, 2009.

Choi, J.D.; Lee, S.S. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. **Genomics & Informatics**, v. 11, n. 4, p. 164-173, 2013.

Chung, C.J.; Chang, C.H.; Chuu, C.P.; Yang, C.R.; Chang, Y.H.; Huang, C.P.; Chen, W.C.; Chung, M.C.; Chang, H. Reduced 5-Methylcytosine Level as a Potential Progression Predictor in Patients with T1 or Non-Invasive Urothelial Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 677-690, 2015.

De Carvalho, D.D.; You, J.S.; Jones, P.A. DNA methylation and cellular reprogramming. **Trends in Cell Biology**, v. 20, n. 10, p. 609-617, 2010.

Deatherage, D.E; Potter, D.; Yan, P.S.; Huang, T.H.M; Lin, S. Methylation Analysis by Microarray. **Methods in Molecular Biology**, v. 556, n. 15, p. 117–139, 2009.

Deaton, A.M.; Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes and Development**, v. 25, p. 1010-1022, 2011.

Dessimoz, C.; Gabaldón, T.; Roos, D. S.; Sonnhammer, E.; Herrero, J. Toward Community Standards in the Quest for Orthologs. **Bioinformatics**, v. 28, n. 6, p. 900-904, 2012.

Du, P.; Zhang, X.; Huang, C.; Jafari, N.; Kibbe, W.A.; Hou, L.; Lin, S.M. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 587, p. 1-9, 2010.

Dugué, P.A.; Brinkman, M.T.; Milne, R.L.; Wong, E.M.; FitzGerald, L.M.; Bassett, J.K.; Joo, J.E.; Jung, C.H.; Makalic, E.; Schmidt, D.F.; Park, D.J.; Chung, J.; Ta, A.D.; Bolton, D.M.; Lonie, A.; Longano, A.; Hopper, J.L.; Severi, G.; Saffery, R.; English,

D.R.; Southey, M.C.; Giles, G.G. Genome-wide measures of DNA methylation in peripheral blood and the risk of urothelial cell carcinoma: a prospective nested case-control study. **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 6, p. 664-73, 2016.

Duthie, S.J.; Narayanan, S.; Brand, G.M.; Pirie, L.; Grant, G. Impact of folate deficiency on DNA stability. **Journal of Nutrition**, v. 132(8 Suppl), p. 2444S-2449S, 2002.

Eden, A.; Gaudet, F.; Waghmare, A.; Jaenisch, R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. **Science**, v. 300, p. 455, 2003.

Edwards, D.S.; Henley, W.E.; Harding, E.F.; Dobson, J.M.; Wood, J.L.N. Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 4, p. 200–206, 2003.

Ehrlich, M.; Woods, C.B.; Yu, C.M.; Dubeau, L.; Yang, F.; Campan, M.; Weisenberger, D.J.; Long, T.I.; Youn, B.; Fiala, E.S.; Lair, P.W. Quantitative analysis of associations between DNA hypermethylation, hypomethylation, and DNMT RNA levels in ovarian tumors. **Oncogene**, v. 25, p. 2636-2645, 2006.

Elvers, I.; Turner-Maier, J.; Swofford, R.; Koltoonian, M.; Johnson, J.; Stewart, C.; Zhang, C.; Schumacher, S.E.; Beroukhi, R.; Rosenberg, M.; Thomas, R.; Mauceli, E.; Getz, G.; Di Palma, F.; Modiano, J.F.; Breen, M.; Lindblad-Toh, K.; Alföldi, J. Exome sequencing of lymphomas from three dog breeds reveals somatic mutation patterns reflecting genetic background. **Genome Research**, v. 25, p. 1634–1645, 2015.

Espada, J.; Esteller, M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, p. 238–246, 2010.

Esteller, M. Epigenetics in cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 11, p. 1148-1159, 2008.

Fabris, S.; Bollati, V.; Agnelli, L. *et al.* Biological and clinical relevance of quantitative global methylation of repetitive DNA sequences in chronic lymphocytic leukemia. **Epigenetics**, v. 6, n. 2, p. 188-194, 2011.

Farina, F.M.; Inguscio, A.; Kunderfranco, P.; Cortesi, A.; Elia, L.; Quintavalle, M. MicroRNA-26a/cyclin-dependent kinase 5 axis controls proliferation, apoptosis and in vivo tumor growth of diffuse large B-cell lymphoma cell lines. **Cell Death and Disease**, v. 8, p.1-11, 2017.

Feng, C.; Zhang, Y.; Yin, J.; Li, J.; Abounader, R.; Zuo, Z. Regulatory factor X1 is a new tumor suppressive transcription factor that acts via direct downregulation of CD44 in glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 16, n. 8, p. 1078–1085, 2014.

Fernandes, N.C.C.; Guerra, J.M.; Ressio, R.A.; Wasquez, D.G.; Etlinger-Cotonelli, D.; Lorente, S.; Nogueira, E.; Dagli, M.L.Z. Liquid-based cytology and cell block immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples. **Veterinary and Comparative Oncology**, p. 1-10, 2015.

Ferraresso, S.; Bresolin, S.; Arico, A. *et al.* Epigenetic Silencing of TFPI-2 in Canine Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. 1-10, 2014.

Figuera, R.A.; Souza, T.M.; Silva, M.C.; Brum, J.S.; Graça, D.L.; Kommers, G.D.; Irigoyen, L.F.; Barros, C.S.L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da mesorregião do centro ocidental rio-grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 223-230, 2008.

Fleming, J.M.; Creevy, K.E.; Promislow, D.E.L. Mortality in North American dogs from 1984 to 2004: an investigation into age, size, and breed related causes of death. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 187-198, 2011.

Fosmire, S.P.; Thomas, R.; Jubala, C.M.; Wojcieszyn, J.W.; Valli, V.E.; Getzy, D.M.; Smith, T.L.; Gardner, L.A.; Ritt, M.G.; Bell, J.S., *et al.* Inactivation of the p16 cyclin-dependent kinase inhibitor in high-grade canine non-Hodgkin's T-cell lymphoma. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 467-478, 2007.

Fournel-Fleury, C.; Magnol, J. P.; Bricaire, P.; Marchal, T.; Chabanne, L.; Delverdier, A.; Bryon, P.A.; Felman, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, p. 35-59, 1997.

Friso, S.; Udali, S.; Guarini, P. *et al.* Global DNA hypomethylation in peripheral blood mononuclear cells as a biomarker of cancer risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 22, n. 3, p. 348-55, 2013.

Fujiwara-Igarashi, A.; Goto-Koshino, Y.; Mochizuki, H. *et al.* Inhibition of p16 tumor suppressor gene expression via promoter hypermethylation in canine lymphoid tumor cells. **Research in Veterinary Science**, v. 97, p. 60-63, 2014.

Gabaldón, T.; Koonin, E.V. Functional and evolutionary implications of gene orthology. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, p. 360-366, 2013.

Gaudet, F.; Hodgson, J.G.; Eden, A.; Jackson-Grusby, L.; Dausman, J.; Gray, J.W. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. **Science**, v. 300, n. 5618, p. 187-192, 2003.

Gerdes, J.; Schwab, U.; Lemke, H.; Stein, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer**, v. 31, n. 1, p. 13-20, 1983.

Giantin, M.; Aresu, L.; Arico, A.; Gelain, M.E.; Riondato, F.; Comazzi, S.; Dacasto, M. Evaluation of tyrosine-kinase receptor c-kit mutations, mRNA and protein expression in canine lymphoma: might c-kit represent a therapeutic target? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 154, p.153-159, 2013.

Goelz, S.E.; Vogelstein, B.; Hamilton, S.R.; Feinberg, A.P. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. **Science**, v. 228, n. 4696, p. 187-190, 1985.

Hahn, K.A.; Richardson, R.C.; Hahn, E.A.; Chrisman, C.L. Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 528-540, 1994.

Han, L.; Zhao, Z. Contrast features of CpG islands in the promoter and other regions in the dog genome. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 117–124, 2009.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

Hansen, K.; Khanna, C. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development. **European Journal of Cancer**. 40:858-880, 2004.

Hayes, H.M.; Tarone, R.E.; Cantor, K.P., *et al*: Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with dog owner's use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 1226-1231, 1991.

Hernandez-Blazquez, F.J.; Habib, M.; Dumollard, J-M.; Barthelemy, C.; Benchaib, M.; Capoa, A.; Niveleau, A. Evaluation of global DNA hypomethylation in human colon cancer tissues by immunohistochemistry and image analysis. **Gut**, v. 47, p. 689–693, 2000.

Hiraoka H1, Minami K, Kaneko N, Shimokawa Miyama T, Okamura Y, Mizuno T, Okuda M. Aberrations of the FHIT gene and Fhit protein in canine lymphoma cell lines. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 6, p. 769-77, 2009.

Heerboth, S.; Lapinska, K.; Snyder, N.; Leary, M.; Rollinson, S.; Sarkar, S. Use of Epigenetic Drugs in Disease: An Overview. **Genetics & Epigenetics**, v. 6, p. 9–19, 2014.

Iskow, R.C.; McCabe, M.T.; Mills, R.E.; Torene, S.; Pittard, W.S.; Neuwald, A.F.; van Meir, E.G.; Vertino, P.M.; Devine, S.E. Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1253-1261, 2010.

Ito, D.; Frantz, A.M.; Modiano, J.F. Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 159, p. 192-201, 2014.

Jones, P.A.; Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 415-428, 2002.

Jones, P.A.; Baylin, S.B. The Epigenomics of Cancer. **Cell**, v. 128, n. 23, p. 683–692, 2007.

Kent, W.J., Sugnet, C.W.; Furey, T.S.; Roskin, K.M.; Pringle, T.H.; Zahler, A.M.; Haussler, D. The human genome browser at UCSC. **Genome Research**, v. 12, n. 6, p. 996-1006, 2002 (<http://genome.ucsc.edu/>).

Kimura, K.C.; Zanini, D.A.; Nishiya, A.T.; Dias, R.A.; Dagli, M.L.Z. Morphology and Immunophenotypes of Canine Lymphomas: a Survey from the Service of Animal Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 3, p. 199-206, 2011.

Kimura, K.C. *Linfoma canino: papel do meio ambiente*. 2012. 139f. Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Kirkness, E.F.; Bafna, V.; Halpern, A.L.; Levy, S.; Remington, K.; Rusch, D.B.; Delcher, A.L.; Pop, M.; Wang, W.; Fraser, C.M.; Venter, J.C. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. **Science**, v. 301, p. 1898-1903, 2003.

Kuo, K.C.; McCune, R.A.; Gehrke, C.W.; Midgett, R.; Ehrlich, M. Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 20, p. 4763-4776, 1980.

Kurdyukov, S.; Bullock, M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. **Biology**, v. 5, n. 3, p. 1-21, 2016.

Lander, E.S. *et al.* International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 15, p. 860-921, 2001.

Laird, P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature**, v. 3, p. 253-266, 2003.

Lelbach, A.; Muzes, G.; Feher, J. Current perspectives of catabolic mediators of cancer cachexia. **Medical Science Monitor**, v. 13, p. 168-173, 2007.

Leshchenko, V.V.; Kuo, P.; Shaknovich, R.; Yang, D.T.; Gellen, T, *et al.* Genomewide DNA methylation analysis reveals novel targets for drug development in mantle cell lymphoma. **Blood**, v. 116, v. 7, p. 1025-1034, 2010.

Li L.; Choi, J.; Lee, K. *et al.* DNA methylation in peripheral blood: a potencial biomarker for cancer molecular epidemiology. **Journal of Epidemiology**, v. 22, n. 5, p. 384-394, 2012.

Li, J.; Huang, Q.; Zeng, F.; Li, W.; He, Z.; Chen, W.; Zhu, W.; Zhang, B. The Prognostic Value of Global DNA Hypomethylation in Cancer: A Meta-Analysis. **PLoS**, v. 9, n. 9, p. 1-9, 2014.

Lim, U.; Flood, A.; Choi, S.W.; Albanes, D.; Cross, A.J.; Schatzkin, A., *et al.* Genomic methylation of leukocyte DNA in relation to colorectal adenoma among asymptomatic women. **Gastroenterology**, v. 134, p. 47-55, 2008.

Madewell, B.R.; Thesen, G.H. Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions. In *Veterinary Cancer Medicine*. (2th ed) Theilen, G.H., Madewell, B.R. Philadelphia: Lea and Febiger, 1987.

Magaña, A.A.; Wrobel, K.; Caudillo, Y.A.; Zaina, S.; Lund, G.; Wrobel, K. High-performance liquid chromatography determination of 5-methyl-20-deoxycytidine, 20-deoxycytidine, and other deoxynucleosides and nucleosides in DNA digests. **Analytical Biochemistry**, v. 374, p. 378–385, 2008.

Mahapatra, S.; Klee, E.W.; Young, C.Y.; Sun, Z.; Jimenez, R.E.; Klee, G.G.; Tindall, D.J.; Donkena, K.V. Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 10, p. 2882-95, 2012.

Marconato, L. The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: a review of recent developments and future prospects. **The Veterinary Journal**, v. 188, p. 34-38, 2011.

Marconato, L.; Gelain, M.E.; Cornazzi, S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. **Hematology Oncology**, v. 31, p. 1-9, 2013.

Melnyk, A., Rodriguez, W.C., Pugh, W.C., Cabannillas, F. Evaluation of the revised European-American lymphoma classification confirms the clinical relevance of immunophenotype in 560 cases of aggressive non-Hodgkins lymphoma. **Blood**, v. 89, n.12, p. 4514–4520, 1997.

Merlo, D.F.; Rossi, L.; Pellegrino, C. *et al.* Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 22: 976-984, 2008.

Modiano, J.F.; Breen, M.; Burnett, R.C.; Parker, H.G.; Inusah, S.; Thomas, R.; Avery, P.R.; Lindblad-Toh, K.; Ostrander, E.A.; Cutter, G.C.; Avery, A.C. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. **Cancer Research**, v. 65, n. 13, p. 5654-61, 2005.

Moran, S.; Arribas, C.; Esteller, M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. **Epigenomics**, v. 8, n. 3, p. 389-399, 2016.

Morimoto, C.Y.; Tedardi, M.V.; Da Fonseca, I.I.M.; Kimura, K.C.; Sanches, D.S.; T.; Epiphany, T.M.F.; Strefezzi, R.F.; Dagli, M.L.Z. Evaluation of the global DNA methylation in canine mast cell tumour samples by immunostaining of 5-methyl cytosine. **Veterinary and Comparative Oncology**, p. 1-5, 2016.

Morton, L.M.; Purdue, M.P.; Zheng, T.; Wang, S.S.; Armstrong, B. *et al.* Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with germline variation in genes that regulate the cell cycle, apoptosis, and lymphocyte development. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v. 18, n. 4, p. 1259-1270, 2009.

Owen, L. **Classification of tumors in domestic animals**. Geneva: World Health Organization. p. 46-47. 1980.

Paoloni, M. and Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 147-156, 2008.

Pastor, M.; Chalvet-Monfray, K.; Marchal, T. *et al.* Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 301-310, 2009.

Pelham, J.T.; Irwin, P.J.; Kay, P.H. Genomic hypomethylation in neoplastic cells from dogs with malignant lymphoproliferative disorders. **Research in Veterinary Science**, v. 74, p. 101-104, 2003.

Poggi, A.; Miniscalco, B.; Morello, E.; Comazzi, S.; Gelain, M.E.; Aresu, L.; Riondato, F. Flow cytometric evaluation of ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 13, n. 4, p. 475-480, 2013.

Poggi, A.; Miniscalco, B.; Morello, E.; Gattino, F.; Delaude, A.; Ferrero Poschetto, L.; Aresu, L.; Gelain, M.E.; Martini, V.; Comazzi, S.; Riondato, F. Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, p. 1-10, 2016.

Ponce, F.; Magnol, J.P.; Ledieu, D.; Marchal, T.; Turinelli, V.; Chalvet-Monfray, K.; Fournel-Fleury, C. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **The Veterinary Journal**, v. 167, p. 158-166, 2004.

Ponce, F.; Marchal, T.; Magnol, J.P.; Turinelli, V.; Ledieu, D.; Bonnefont, C.; Pastor, M.; Delignette, M.L.; Fournel-Fleury, C. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 3, p. 414-433, 2010.

Portela, A.; Esteller, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057-68, 2010.

Qureshi, S.A.; Bashir, M.U.; Yaqinuddin, A. Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer. **International Journal of Surgery**, v. 8, p. 194-198, 2010.

R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, 2015. www.r-project.org

Reif, J.S.; Lower, K.S.; Ogilvie, G.K. Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma. **American Journal Epidemiology**, v. 141, p. 352-359, 1995.

Richards, K.L.; Suter, S.E. Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin lymphoma? **Immunological Reviews**, v. 263, n. 1, p. 173-191, 2015.

Ritchie, M.E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C.W.; Shi, W.; Smyth, G.K. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47, 2015.

Ruiz, S.; Santos, E.; Bustelo, X.R. RasGRF2, a guanosine nucleotide exchange factor for Ras GTPases, participates in T-cell signaling responses. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, p. 8127–42, 2007.

Schalkwyk L.C.; Pidsley, R.; Wong, C.C. *et al.* WateRmelon: Illumina 450 methylation array normalization and metrics. R package version 1.4.0, 2013.

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**, v. 370, p. 1–13, 2015.

Schübeler, D. Function and information content of DNA methylation. **Nature**, v. 517, n. 15, p. 321–326, 2015.

Setoguchi, A.; Sakai, T.; Okuda, M.; Minehata, K.; Yazawa, M.; Ishizaka, T.; Watari, T.; Nishimura, R.; Sasaki, N.; Hasegawa, A.; Tsujimoto, H. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 433–439, 2001.

Sharma, S.; Kelly, T.K.; Jones, P.A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27–36, 2010.

Shen, H.; Laird, P.W. Interplay between the cancer genome and epigenome. **Cell**, v. 153, n. 28, p. 38–55, 2013.

Sokołowska, J.; Micun, J.; Malicka, E.; Lechowski, R. Proliferation activity in canine lymphomas. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, n. 4, p. 727–734, 2012.

Sözmen, M.; Tasca, S.; Carli, E.; Lorenzi, D.; Furlanello, T. Caldin, M. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 323–329, 2005.

Takashima-Uebelhoer, B.B.; Barber, L.G.; Zagarins, S.E.; Procter-Gray, E.; Gollenberg, A.L.; Moore, A.S.; Bertone-Johnson, E.R. Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non-Hodgkin's lymphoma. **Environmental Research**, v. 112, p. 171–176, 2012.

Teschendorff, A.E.; Marabita, F.; Lechner, M. *et al.* A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. **Bioinformatics**, v. 29, n. 2, p. 189–196, 2013.

Teh, A.L.; Pan, H.; Chen, L.; Ong, M.L.; Dogra, S.; Wong, J.; MacIsaac, J.L.; Mah, S.M.; McEwen, L.M.; Saw, S.M.; Godfrey, K.M.; Chong, Y.S.; Kwek, K.; Kwok, C.K.; Soh, S.E.; Chong, M.F.; Barton, S.; Karnani, N.; Cheong, C.Y.; Buschdorf, J.P.; Stünkel, W.; Kobor, M.S.; Meaney, M.J.; Gluckman, P.D.; Holbrook, J.D. The effect of genotype and in utero environment on interindividual variation in neonate DNA methylomes. **Genome Research**, v. 24, n. 7, p. 1064–74, 2014.

Terry, M.B.; Cruzata, L.D.; Vin-Raviv, N.; Wu, H.C.; Santella, R.M. DNA methylation in white blood cells. **Epigenetics**, v. 6, n. 7, p. 828-837, 2011.

Teske, E.; Van Heerde, P.; Rutteman, G.R.; Kurzman, I.D.; Moore, P.F.; MacEwen, E.G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 12, p. 1722-1728, 1994.

Teske, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkins lymphoma. **The Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 4, p. 209-219, 1994.

Thomas, R.; Smith, K.C.; Gould, R.; Gower, S.M.; Binns, M.M.; Breen, M. Molecular cytogenetic analysis of a novel high-grade canine T-lymphoblastic lymphoma demonstrating co-expression of CD3 and CD79a cell markers. **Chromosome Research**, v. 9, p. 649-657, 2001.

Thomas, R.; Seiser, E.L.; Motsinger-Reif, A.; Borst, L.; Valli, V.E.; Kelley, K.; Suter, S.E.; Argyle, D.; Burgess, K.; Bell, J.; *et al.* Refining tumor-associated aneuploidy through ‘genomic recoding’ of recurrent DNA copy number aberrations in 150 canine non-hodgkin lymphomas. **Leukemia & Lymphoma**, v.52, p. 1321-1335, 2011.

Toraño, E.G.; Petrus, S.; Fernandez, A.F.; Fraga, M.F. Global DNA methylation in cancer: review of validated methods and clinical significance. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 50, n. 10, p. 1733-1742, 2012.

Tomiyasu, H.; Fujiwara-Igarashi, A.; Goto-Koshino, Y.; Fujino, Y.; Ohno, K.; Tsujimoto, H. Evaluation of DNA methylation profiles of the CpG island of the ABCB1 gene in dogs with lymphoma. **American Journal of Veterinary Research**. 75(9):835–41, 2014.

Uehara, T.; Kage-Nakadai, E.; Yoshina, S.; Imae, R.; Mitani, S. The Tumor Suppressor BCL7B Functions in the Wnt Signaling Pathway. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 11, p. 1-19, 2015.

Vail, D.M.; Pinkerton, M.E.; Young, K.M. Hematopoietic Tumors. In Withrow and MacEwen’s Small Animal Clinical Oncology. (5th ed), Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R.L. St. Louis: Saunders Elsevier, 2013; p. 608–678.

Vail, D.; MacEwen, E.G. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. **Cancer Investigation**, v. 18, p. 781-792, 2000.

Valli, V.E.; Kass, P.H.; Myint, M.S., Scott, F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 5, p. 738-748, 2013.

Valli, V.E.; San Myint, M.; Barthel, A. Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 198-211, 2011.

Veldhoen, N.; Stewart, J.; Brown, R.; Milner, J. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene**, v. 16, p. 249-255, 1998.

Vezzali, E.; Parodi, A.L.; Marcato, P.S.; Bettini, G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline nonhodgkin lymphoma according to the WHO. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 38-49, 2009.

Vilella, A.J.; Severin, J.; Ureta-Vidal, A.; Durbin, R.; Heng, L.; Birney, E. Analysis of complete, duplication aware phylogenetic trees in vertebrates. **Genome Research**, v. 19, n. 2, p. 327-335, 2009 (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Villamil, J.A.; Henry, C.J.; Hahn, A.W.; Bryan, J.N.; Tyler, J.W.; Caldwell, C.W. Hormonal and Sex Impact on the Epidemiology of Canine Lymphoma. **Journal of Cancer Epidemiology**, p. 1-7, 2009.

Walker, B.A.; Wardell, C.P.; Chiecchio, L.; Smith, E.M.; Boyd, K.D.; Neri, A.; Davies, F.E.; Ross, F.M.; Morgan, G.J. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. **Blood**, v. 117, n. 2, p. 553–562, 2011.

Wang, SS.; Vose, JM. Epidemiology and Prognosis of T-Cell Lymphoma. In: Foss, F. T-cell Lymphomas. Contemporary Hematology. Vol. XV. New York: Springer Science+Business Media, p. 25-39, 2013.

Wong Doo, N., Makalic, E.; Joo, J.E.; Vajdic, C.M.; Schmidt, D.F.; Wong, E.M.; Jung, C.H.; Severi, G.; Park, D.J.; Chung, J.; Baglietto, L.; Prince, H.M.; Seymour, J.F.; Tam, C.; Hopper, J.L.; English, D.R.; Milne, R.L.; Harrison, S.J.; Southey, M.C.; Giles, G.G. Global measures of peripheral blood-derived DNA methylation as a risk factor in the development of mature B-cell neoplasms. **Epigenomics**, v. 8, n. 1, p. 55-66, 2016.

Wong, N.C.; Ng, J.; Hall, N.E.; Lunke, S.; Salmanidis, M.; Brumatti, G.; Ekert, P.G.; Craig, J.M.; Saffery, R. Exploring the utility of human DNA methylation arrays for profiling mouse genomic DNA. **Genomics**, v. 102, p. 38–46, 2013.

Woo, H.D.; Kim, J. Global DNA hypomethylation in peripheral blood leukocytes as a biomarker for cancer risk: a meta-analysis. **PLoS**, v. 7, n. 4, p. 1-8, 2012.

Woodcock, D.M.; Lawler, C.B.; Linsenmeyer, M.E.; Doherty, J.P.; Warren, W.D. Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 12, p. 7810–7816, 1997.

Wu, H.C.; Wang, Q.; Yang, H.I.; Tsai, W.Y.; Chen, C.J.; Santella, R.M. Global DNA methylation levels in white blood cells as a biomarker for hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 7, p. 1340-1345, 2012.

Wu, H.C.; Delgado-Cruzata, L.; Flom, J.D.; Perrin, M.; Liao, Y.; Ferris, J.S.; Santella, R.M.; Terry, M.B. Repetitive element DNA methylation levels in white blood cell DNA

from sisters discordant for breast cancer from the New York site of the Breast Cancer Family Registry. **Carcinogenesis**, v. 33, n.10, p.1946–1952, 2012.

Yang, F.; O'Brien, P.C.M.; Milne, B.S.; Graphodatsky, A.S.; Solanky, N.; Trifonov, V.; Rens, W.; Sargan, D.; Ferguson-Smith, M.A. A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps. **Genomics**, v. 62, p. 189–202, 1999.

Yao, W.; Wang, X.; Cai, Q.; Gao, S.; Wang, J.; Zhang, P. Knockdown of TRAF4 expression suppresses osteosarcoma cell growth in vitro and in vivo. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 34, p. 1655-1660, 2014

Yuasa Y. Epigenetics in molecular epidemiology of cancer a new scope. **Advanced Genetics**, v. 71, p. 211-235, 2010.

Zanini, D.A.; Kimura, K.C.; Nishiya, A.T.; Ubukata, R.; Leandro, R.M.; Brito, C.P.; Trombetti, M.; Lagoa, A.C.; Macedo, Rodrigues, L.C.S.; Rosendo, J.A.S; Arndt, H.L; Dias, R.A; Dagli, M.L.Z. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's lymphoma. **Ciência Rural**, v.43, n.7, p. 1302-1308, 2013.

Zazzeroni, F.; Nicosia, D.; Tessitore, A.; Gallo, R.; Verzella, D.; Fischietti, M.; Vecchiotti, D.; Ventura, L.; Capece, D.; Gulino, A.; Alesse, E. KCTD11 Tumor suppressor gene expression is reduced in prostate adenocarcinoma. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2014.

Zheng, Y.; Joyce, B.T.; Colicino, E.; Liu, L.; Zhang, W.; Dai, Q.; Shrubsole, M.J.; Kibbe, W.A.; Gao, T.; Zhang, Z.; Jafari, N.; Vokonas, P.; Schwartz, J.; Baccarelli, A.A.; Hou, L. Blood Epigenetic Age may Predict Cancer Incidence and Mortality. **EBioMedicine**, v. 5, p. 68–73, 2016.

ANEXO 1

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Estudo da metilação global do DNA no sangue periférico de cães saudáveis e cães com câncer**” protocolo nº 024/16 sob a responsabilidade de Maria Lúcia Zaidan Dagli e Tatiane Moreno Ferrarias Epiphany, apresentado pelo Departamento de Radiologia e Oncologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 23.03.16

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Outubro/2017
Espécie/linhagem	cães
Nº de animais	Material coletado de cães (sangue periférico)
Peso/Idade	5 anos
Sexo	Não se aplica
Origem	Não se aplica

CEUA-FMUSP, 23 de Março de 2016

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

ANEXO 2

Comitê de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da metilação global do DNA no sangue periférico de cães saudáveis e cães com câncer.", protocolado sob o CEUA nº 1747271015, sob a responsabilidade de **Maria Lucia Zaidan Dagli** e equipe; Tatiane Moreno Ferrarlas Epiphânio - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 02/03/2016.

We certify that the proposal "Study of global DNA methylation in peripheral blood from healthy and cancer bearing dogs.", utilizing 60 Dogs (60 males), protocol number CEUA 1747271015, under the responsibility of **Maria Lucia Zaidan Dagli** and team; Tatiane Moreno Ferrarlas Epiphânio - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 03/02/2016.

Vigência da Proposta: de 01/10/1 a 31/10/1

Área: Patologia

Procedência: Clínicas e hospitais veterinários da cidade de São Paulo.

Espécie: Cães

sexo: Machos

Idade: > 5 anos

N: 60

Linhagem: Diversas

Peso: diversos

Resumo: Alterações no padrão de metilação de DNA tanto em genes específicos quanto no

genoma global têm sido associadas com diferentes tipos de neoplasias na medicina humana. Tais alterações incluem principalmente hipermetilação de genes supressores tumorais, hipometilação de oncogenes e baixos níveis de metilação global. Estudos recentes investigam mudanças no padrão de metilação global do DNA nos leucócitos em diferentes tipos de neoplasias em humanos (linfoma, leucemia, cólon, bexiga, estômago, mama e fígado) e têm demonstrado um elevado risco de câncer nos indivíduos que apresentam menor quantidade de metilação global de DNA. Apesar da alta prevalência de câncer em cães, não há pesquisas que relacionam a metilação global de DNA de células sanguíneas e o desenvolvimento de neoplasias na literatura veterinária. O presente estudo visa quantificar a 5-metil citosina em leucócitos de cães da cidade de São Paulo, saudáveis e portadores de linfoma ou doenças mielo e linfoproliferativas, e analisar

possíveis correlações entre o padrão de metilação global do DNA e a suscetibilidade ao câncer.

O reconhecimento de alterações moleculares é fundamental para auxiliar no desenvolvimento de biomarcadores e possivelmente determinar melhores formas de tratamento. A oncologia veterinária representa uma área de grande interesse para clínicos veterinários e pesquisadores no tocante a estudos transacionais, desse modo, se torna relevante a abordagem da metilação global de DNA em leucócitos nessa espécie, uma vez que os cães são considerados excelentes modelos comparativos de linfomas e doenças mielo e linfoproliferativas.

São Paulo, 02 de março de 2016

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo