



Programa de pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental

UNIVERSIDADE PAULISTA

GUILHERME BOGDANOV GIORGINI

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM CARCINOMAS
MAMÁRIOS PRIMÁRIOS CANINOS**

São Paulo

2025

GUILHERME BOGDANOV GIORGINI

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM CARCINOMAS
MAMÁRIOS PRIMÁRIOS CANINOS**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan

São Paulo

2025

Giorgini, Guilherme Bogdanov.
Perfil de expressão de microRNAs em carcinomas mamários primários caninos / Guilherme Bogdanov Giorgini. - 2025.
114 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2025.

Área de concentração: Oncologia veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

1. MicroRNA. 2. Triplo negativo. 3. Epigenética. 4. Biologia tumoral. I. Bondan, Eduardo Fernandes (orientador). II. Título.

GUILHERME BOGDANOV GIORGINI

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM CARCINOMAS
MAMÁRIOS PRIMÁRIOS CANINOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP como requisito para o exame de qualificação para obtenção do título de doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan

Prof. Dr. José Guilherme Xavier

Prof. Dr. Atílio Sersun Calefi

Prof. Dr^a. Cássia Correa Yasumaru

Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva

DEDICATÓRIA

Àqueles que amo, dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha mãe Néia que forneceu todo o suporte e incentivo para a realização dessa jornada. Que me auxiliou nos momentos oportunos e que compreendeu minha ausência em diversos momentos para a dedicação a este estudo.

Agradeço ao orientador Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan, pelos conselhos, por sua visão analítica e por sua preocupação na realização deste estudo. Agradeço também ao professor por ter visto na minha pessoa, potencial para a realização de um projeto, mesmo que com diversas dificuldades ao longo do caminho, perseverou e sempre se mostrou disponível e compreensivo.

Aos professores Atílio Sersun Calefi, Ivana Barbosa Suffredini, José Guilherme Xavier e Rodrigo Augusto da Silva que colaboraram diretamente para a realização e validação dessa pesquisa, compartilhando os seus conhecimentos e expertises comigo.

À equipe do laboratório da UNIP, que sempre com gentileza me acolheu para a fase experimental da minha pesquisa e que não mediu esforços para a conciliação dos meus interesses com os da rotina.

A CAPES/PROSUP por financiar, por meio da concessão de uma bolsa a realização dessa pesquisa.

A Sociedade Paulista de Medicina Veterinária (SPMV) e aos colegas médico-veterinários que me auxiliaram exaustivamente na realização da amostragem, etapa que desde o mestrado tem sido dificultosa para mim. Aos que auxiliaram, mais uma vez, obrigado. Agradeço também a direção e aos coordenadores dos hospitais públicos que apoiaram incondicionalmente a minha ausência como médico veterinário em detrimento da minha dedicação ao doutorado.

A todos os meus amigos e colegas que colaboraram diretamente e indiretamente a realização dessa pesquisa.

RESUMO

A neoplasia mamária canina é um grupo de neoplasias frequentes em cadelas adultas e idosas, caracterizada por acentuada heterogeneidade clínica, histológica e molecular. Essa diversidade estrutural e funcional faz com que tumores com aparência semelhante apresentem comportamentos biológicos distintos, reforçando a necessidade de uma abordagem diagnóstica mais completa. A elevada prevalência dessa doença e seu impacto prognóstico justificam a integração de diferentes métodos de avaliação, capazes de oferecer uma melhor visão do comportamento e da agressividade da neoplasia. Neste estudo, foram analisados parâmetros clínicos, histológicos, imunofenotípicos e epigenéticos, com o objetivo de identificar associações entre estadiamento TNM, tipo histológico, classificação fenotípica, grau de malignidade e biomarcadores amplamente utilizados, como e-caderina, receptor de estrogênio, receptor de progesterona, HER-2 e Ki67. As neoplasias classificadas como fenótipo triplo negativo consistentemente foram associadas a fatores de maior agressividade, proliferação acentuada e menor diferenciação celular. Entre os microRNAs avaliados, o miR-143 destacou-se pela subexpressão nas neoplasias com características mais agressivas, reforçando sua função supressora tumoral amplamente descrita na literatura. De forma geral, os achados deste estudo contribuem para a compreensão da complexa biologia tumoral mamária em cadelas, auxiliando na predição do comportamento clínico e no reconhecimento de tumores de pior prognóstico. A integração entre parâmetros morfológicos, moleculares e epigenéticos reforça a importância de abordagens multidimensionais para o diagnóstico e o prognóstico da neoplasia mamária canina.

Palavras-chave: triplo negativo; miR-143; epigenética; biologia tumoral.

ABSTRACT

Canine mammary neoplasia represents a group of common tumors in adult and elderly female dogs, characterized by marked clinical, histological, and molecular heterogeneity. This structural and functional diversity means that tumors with similar morphological appearance may exhibit distinct biological behaviors, reinforcing the need for a more comprehensive diagnostic approach. The high prevalence of this disease and its prognostic impact justify the integration of different assessment methods capable of providing a broader understanding of tumor behavior and aggressiveness. In this study, clinical, histological, immunophenotypic, and epigenetic parameters were analyzed to identify associations among TNM staging, histological type, phenotypic classification, malignancy grades, and widely used biomarkers such as E-cadherin, estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and Ki-67. Tumors classified as triple-negative phenotype were consistently associated with factors indicative of greater aggressiveness, increased proliferation, and reduced cellular differentiation. Among the microRNAs evaluated, miR-143 stood out due to its underexpression in tumors with more aggressive features, reinforcing its tumor-suppressive function widely described in the literature. Overall, the findings of this study contribute to the understanding of the complex tumor biology of canine mammary neoplasia, supporting the prediction of clinical behavior and the identification of tumors with poorer prognosis. The integration of morphological, molecular, and epigenetic parameters highlights the importance of multidimensional approaches for the diagnosis and prognosis of canine mammary neoplasia.

Keywords: triple-negative; miR-143; epigenetics; tumor biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição racial das portadoras de carcinoma mamário do hospital público de Santo André no período de junho de 2024 a janeiro de 2025. N=25.	56
Figura 2. Peso (em quilogramas) e idade (em anos) da população inclusa na amostragem.	56
Figura 3. Tempo de evolução (em meses) e maior eixo mensurável da neoplasia (em centímetros).	57
Figura 4. Frequência dos diferentes estágios do sistema TNM observados nas cadelas incluídas na pesquisa.	59
Figura 5. Neoplasias classificadas como grau I de malignidade.	61
Figura 6. Neoplasias classificadas como grau II de malignidade.	62
Figura 7. Neoplasias classificadas como grau III de malignidade.	63
Figura 8. Fotomicrografia de corte histológico de mama evidenciando imunomarcção para o receptor de progesterona.	66
Figura 9. Fotomicrografia de corte histológico de mama evidenciando imunomarcção para ER α .	67
Figura 10. Fotomicrografia de corte histológico de mama evidenciando imunomarcção para HER-2	68
Figura 11. Fotomicrografia de corte histológico de mama evidenciando imunomarcção para marcação intercelular de e-caderina.	70
Figura 12. Fotomicrografia de corte histológico de mama evidenciando imunomarcção para expressão de ki67.	72
Figura 13. Expressão relativa de miR-16 apresentada pelas neoplasias de acordo com o grau de diferenciação e grupo controle.	77
Figura 14. Expressão relativa de miR-16 apresentada pelas neoplasias de acordo com o fenótipo neoplásico e grupo controle.	78
Figura 15. Expressão relativa de miR-18a apresentada pelas neoplasias de acordo com o grau de diferenciação e grupo controle.	79

Figura 16. Expressão relativa de miR-18a apresentada pelas neoplasias de acordo com o fenótipo neoplásico e grupo controle. 80

Figura 17. Expressão relativa de miR-18a apresentada de acordo com a marcação do receptor de ER α . 81

Figura 18. Expressão relativa de miR-18a apresentada de acordo com a marcação do receptor de RP. 81

Figura 19. Expressão relativa de miR-18b apresentada pelas neoplasias de acordo com o grau de diferenciação e grupo controle. 82

Figura 20. Expressão relativa de miR-18b apresentada pelas neoplasias de acordo com o fenótipo neoplásico e grupo controle. 83

Figura 21. Expressão relativa de miR-21 apresentada pelas neoplasias de acordo com o grau de diferenciação e grupo controle. 84

Figura 22. Expressão relativa de miR-21 apresentada pelas neoplasias de acordo com o fenótipo neoplásico e grupo controle. 85

Figura 23. Expressão relativa de miR-143 apresentada pelas neoplasias de acordo com o grau de diferenciação e grupo controle. 86

Figura 24. Expressão relativa de miR-143 apresentada pelas neoplasias de acordo com o fenótipo neoplásico e grupo controle. 87

Figura 25. Matriz de correlações estabelecidas entre variáveis clínicas, histológicas, imunofenotípica e de microRNAs nos carcinomas mamários. 88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Possíveis estadiamentos TNM.	17
TABELA 2. Sistema de estadiamento TNM.	18
TABELA 3. Sistema de classificação histológica para neoplasia mamária canina.	23
TABELA 4. Possíveis classificações fenotípicas dos tumores de mama em cadelas.	26
TABELA 5. Dados clínicos e de resenha das pacientes incluídas na amostragem atendidas no hospital público de Santo André no período de junho de 2024 a janeiro de 2025.	55
TABELA 6. Frequência dos tipos histopatológicos observados nas neoplasias mamárias caninas observadas.	58
TABELA 7. Apresentação das pontuações dos critérios estabelecidos por Peña e colaboradores (2014) para os graus de malignidade, somatório de escores e classificação nos grupos.	60
TABELA 8. Frequência dos graus de malignidade pelos critérios estabelecidos por Peña e colaboradores (2014) determinados nas neoplasias mamárias caninas observadas.	63
TABELA 9. Frequência dos tipos histopatológicos associados aos graus de malignidade estabelecidos pelos critérios de Peña e colaboradores (2013).	64
TABELA 10. Escore e resultado da marcação imuno-histoquímica das neoplasias incluídas na pesquisa.	65
TABELA 11. Contingência da positividade ou negatividade de RP associada ao grau de malignidade das neoplasias.	66
TABELA 12. Contingência da positividade ou negatividade da expressão imuno-histoquímica de ER α associada ao grau de diferenciação das neoplasias...	67
TABELA 13. Frequência da positividade ou negatividade do receptor de HER-2 associada ao grau de diferenciação das neoplasias.	69
TABELA 14. Frequência da marcação de e-caderina associada ao grau de diferenciação das neoplasias.	71

TABELA 15. Frequência da marcação de e-caderina associada ao fenótipo das neoplasias.	71
TABELA 16. Frequência da marcação imuno-histoquímica de e-caderina associada a marcação de ER α .	71
TABELA 17. Frequência do índice proliferativo do ki67 associado aos graus de malignidade.	73
TABELA 18. Frequência da marcação do p53 associado aos graus de malignidade.	73
TABELA 19. Frequência dos tipos fenotípicos das neoplasias mamárias caninas observadas.	74
TABELA 20. Apresentação das neoplasias com os resultados da expressão imuno-histoquímica para os receptores RP, ER α e HER-2, com respectiva caracterização de fenótipo e o grau de malignidade da neoplasia.	75
TABELA 21. Frequência dos fenótipos das neoplasias associados aos graus de malignidade.	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATE - Antígenos tumorais específicos.

CDH1 – Gene que codifica a e-caderina.

CMT(s) – Canine Mammary Tumor(s), tumores mamários caninos.

CEA – Antígeno carcinoembrionário.

CpG – Ilhas CpG. Citosina precedida por Guanina.

DAB – Diaminobenzidina.

DNA – Ácido desoxirribonucleico.

EMT – Transição epitélio-mesenquimal.

ER α – Receptor de estrogênio.

HPF – Campos de alta potência.

IHC – Imuno-histoquímica.

ki67 – Antígeno nuclear associado à proliferação celular.

MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase*, via de sinalização celular.

mRNA – RNA mensageiro.

miR – MicroRNA.

p53 – Proteína supressora de tumor codificada pelo gene TP53.

PCR – Reação em cadeia da polimerase.

PCNA - Antígeno nuclear associado à proliferação.

RP - Receptor de progesterona.

RNA – Ácido ribonucleico.

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real com transcrição reversa.

TP53 – Gene que codifica a proteína p53.

TNM – Tumor, linfonodo e metástase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA.....	15
2.2 ESTADIAMENTO CLÍNICO DA NEOPLASIA MAMARÍA CANINA.....	17
2.3 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DA NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA.....	20
2.4 CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA DA NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA.....	24
2.5 BIOMARCADORES DA NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA.....	27
2.5.1 BIOMARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE.....	27
2.5.2 BIOMARCADORES DE POTENCIAL METÁSTÁTICO.....	30
2.6 EPIGENÉTICA E CÂNCER.....	34
2.7 MicroRNA.....	34
3. JUSTIFICATIVA.....	41
4. OBJETIVOS.....	42
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
6. RESULTADOS.....	54
7. DISCUSSÃO.....	89
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
REFERÊNCIAS.....	104

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma das neoplasias mais comuns em cadelas e em mulheres. A neoplasia mamária canina pode representar metade de todos os tumores em cadelas, especialmente em cadelas adultas e não castradas e, aproximadamente, 40 a 50% deles são diagnosticados malignos (LEE *et al.*, 2002). Cadelas com neoplasias malignas apresentam taxa de sobrevivência significativamente mais baixa do que aquelas com neoplasias mamárias benignas (SENHORELLO *et al.*, 2019). O carcinoma mamário em cães tem diversas semelhanças com o câncer de mama em seres humanos, incluindo a alta prevalência dos adenocarcinomas, frequência na ocorrência de metástases e progressão da doença (LEE *et al.*, 2002).

Os fatores prognósticos da doença podem ser estabelecidos por características clínicas da doença, como, por exemplo, tamanho da formação, presença de ulcerações, crescimento progressivo, entre outros, e pela dosagem ou mensuração de biomarcadores tanto no soro quanto nos tecidos tumorais (JAIN *et al.*, 2019). Na medicina humana, os fatores prognósticos têm sido estudados por muitos anos, como métodos de diagnóstico e monitoramento tanto de tratamento quanto de reincidência, uma vez que permitem selecionar pacientes para tratamentos específicos e individualizados, com intensidade e eficácia adequadas, como também para prever o comportamento e a evolução clínica nos cânceres de mama em mulheres (MANUALI *et al.*, 2012; KASZAK *et al.*, 2018).

Como os tumores mamários em cães compreendem uma série de neoplasias de grupos distintos e que possuem morfologia e biologia heterogênea, é difícil a determinação de um único biomarcador adequado para todas as situações (JAIN *et al.*, 2021). A determinação de um biomarcador tumoral para a neoplasia canina pode ser um marco para o diagnóstico precoce da doença em cães, o que pode ajudar a avaliar o progresso da doença e sua resposta ao tratamento cirúrgico e quimioterápico (KASZAK *et al.*, 2018).

Atualmente, sabe-se que diversos cânceres possuem algum tipo de evidência que os liga a mecanismos epigenéticos, tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana. Os processos epigenéticos são caracterizados por alterar a atividade de um gene, sem que haja alterações na sequência de DNA. Essas sinalizações no gene, além de serem reversíveis, podem ser transmitidas às células-

filhas, caracterizando um “código epigenético” (WEINHOLD, 2006). Os microRNAs (miRs) são moléculas pequenas e não codificantes envolvidas na regulação pós-transcricional negativa da expressão gênica (KASZAK *et al.*, 2018). A descoberta dos papéis dos microRNAs no desenvolvimento da neoplasia mamária canina pode oferecer novas oportunidades para o desenvolvimento de novas estratégias para diagnosticar e tratar esse tipo de neoplasia, assim, a pesquisa sobre os tumores mamários em caninos precisa ser estendida ao painel de marcadores tumorais adicionando novos marcadores que auxiliem em fins diagnósticos e terapêuticos (JAIN *et al.*, 2021).

O objetivo do presente estudo foi estabelecer relações comparativas entre os diferentes tipos do estadiamento clínico de cadelas acometidas com a doença, tipo histológico da neoplasia, grau histológico de malignidade, fenótipos moleculares e biomarcadores normalmente realizados na avaliação imuno-histoquímica, conjuntamente com um estudo epigenético de alguns microRNAs envolvidos no processo neoplásico.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA

A neoplasia mamária é mais comum em países onde a esterilização das cadelas não é feita rotineiramente, além de também ser comum em países onde o uso de progestágenos é rotineiramente utilizado para prevenir o estro nessa população específica (PEÑA *et al.*, 2013; SORENMO *et al.*, 2019). Os hormônios ovarianos (progesterona e estrógeno) possuem um papel importante no desenvolvimento da glândula mamária, porém esses hormônios também têm sido implicados no desenvolvimento de tumores (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011; RODRÍGUEZ *et al.*, 2022). Os estrógenos são promotores de células iniciadoras, além de regularem a transcrição de vários proto-oncogenes. Tumores da glândula mamária, tanto benignos quanto malignos, podem expressar receptores para estrógeno (ER α) (KRISTIANSEN *et al.*, 2016). A duração da exposição aos hormônios ovarianos no início da vida determina o risco geral da neoplasia mamária. O risco para o desenvolvimento da doença aumenta de 0,5% para 8% e, em seguida, para 26% à medida que a esterilização é realizada antes do primeiro estro, antes do segundo estro e após qualquer outro estro posterior, respectivamente (SORENMO, 2019).

Os tumores mamários podem se manifestar como um nódulo único ou em múltiplos nódulos, detectados durante a palpação de toda a extensão dos dois pares das cadeias mamárias no exame físico. Os tumores podem estar associados aos tecidos mamários ou aos mamilos. Os linfonodos axilares (para nódulos em M1-M3) e os linfonodos inguinais (para nódulos em M3-M5) também devem ser palpados e avaliados. Os tumores mamários geralmente se apresentam como nódulos firmes e circunscritos, porém também podem apresentar aspecto de placa (PEÑA *et al.*, 2013; RODRÍGUEZ *et al.*, 2022). Aspectos clínicos, como aderência cutânea ou a tecidos adjacentes, temperatura local, edema, inflamação e ulcerações, são aspectos importantes relacionados ao crescimento maligno, contudo a ausência desses sinais não descarta a hipótese de malignidade (CASSALI *et al.*, 2019). Tumores múltiplos não necessariamente implicam piores prognósticos, em vez disso, o prognóstico é influenciado pelo tamanho e diferenciação dos tumores individuais (SORENMO, 2019).

Não é incomum encontrar mais de um tumor em glândulas diferentes. Mais de 60% dos casos apresentam mais de um tumor, podendo esses serem apresentados na mesma cadeia glandular (unilateral) ou na cadeia glandular contralateral (bilateral). Apesar da relevância clínica, escassos são os estudos em que há abordagem do envolvimento unilateral ou bilateral da cadeia glandular (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011; RODRÍGUEZ *et al.*, 2022). A elevada heterogeneidade relativa às características histológicas, à evolução clínica e às abordagens terapêuticas tornam os métodos uniformes para o tratamento dos tumores mamários particularmente relevante em cadelas com múltiplas apresentações. Todos os tumores individuais devem ser biopsiados porque podem ser de diferentes tipos histológicos. Muitos esforços têm sido direcionados para a padronização do diagnóstico e prognóstico (PECILE *et al.*, 2021).

Todos os tumores malignos da glândula mamária têm potencial para gerar metástases. O risco e padrão metastático são influenciados pelo tipo de tumor, diferenciação histológica e vários fatores prognóstico clínicos. Em geral, os tumores epiteliais malignos metastatizam por meio dos linfonodos regionais para os pulmões, enquanto os tumores de origem mesenquimal também metastizam para os pulmões, mas por via hematológica (CASSALI *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ *et al.*, 2022). Cadelas com tumores malignos têm tempo de sobrevida significativamente menor em comparação a cadelas com tumores benignos (SORENMO *et al.*, 2019).

Cadelas com tumores epiteliais malignos pequenos, bem diferenciados e sem invasão em tecido linfoide tendem a apresentar prognóstico bastante favorável, muitas vezes alcançando controle clínico duradouro apenas com a ressecção cirúrgica completa, especialmente quando o tumor está em estágios iniciais do TNM e apresenta margens cirúrgicas livres (PEÑA *et al.*, 2013; SORENMO *et al.*, 2019). Nessas situações, a sobrevida é significativamente maior devido ao menor potencial metastático e à manutenção de uma arquitetura tumoral mais diferenciada (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011; CASSALI *et al.*, 2019). Em contraste, cadelas com tumores mamários de maior volume, com alto grau histológico, invasão linfática, marcadores de proliferação elevados ou fenótipos moleculares mais agressivos, apresentam comportamento clínico mais imprevisível, maior risco de recidiva e menor tempo de sobrevida (VARALLO *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ *et al.*, 2022). Nesses casos, o prognóstico tende a ser reservado, e a associação com terapias adjuvantes pode

ser necessária para melhorar o controle da doença (SORENMO *et al.*, 2019; MAINENTI *et al.*, 2014). Assim, o prognóstico é determinado não apenas pelo tamanho, mas por uma combinação de fatores histológicos, clínicos e moleculares que refletem a biologia do tumor.

2.2 ESTADIAMENTO CLÍNICO DA NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA

Para a realização do estadiamento da doença do paciente, costuma-se utilizar a classificação TNM (do inglês *Tumor, Node and Metastasis*), proposta por Owen em 1980 e que até hoje é amplamente utilizada e consolidada na literatura. As formações são avaliadas a partir da formação primária de acordo com o seu tamanho, o acometimento ou não do linfonodo regional e a presença ou não de metástase à distância. A doença é classificada de acordo com estágios de I a V. Os possíveis estágios são descritos na TABELA 1 e os critérios para a classificação do estadiamento podem ser visualizados na TABELA 2. Os estágios I, II e III são relativos somente ao tamanho do nódulo primário, sem que haja acometimento dos linfonodos regionais e metástase à distância. O estágio IV contempla qualquer tamanho da formação, porém com linfonodo regional acometido. O último estágio ou estágio V representa a pior condição, na qual, independentemente do tamanho tumoral ou do acometimento do linfonodo regional, a doença já apresenta metástases à distância (OWEN, 1980).

TABELA 1. Possíveis estadiamentos TNM.

I	T ₁ N ₀ M ₀
II	T ₂ N ₀ M ₀
III	T ₃ N ₀ M ₀
IV	T _x N ₁ M ₀
V	T _x N _x M ₁

T: Tumor. N: Linfonodo; M: Metástase.

Adaptado de OWEN, 1980.

TABELA 2. Sistema de estadiamento TNM.

Tumor primário	
T₁	< 3 cm de diâmetro
T₂	3-5 cm de diâmetro
T₃	> 5 cm de diâmetro
Acometimento do linfonodo regional	
N₀	Sem acometimento
N₁	Com acometimento
Metástase à distância	
M₀	Metástase não detectada
M₁	Metástase detectada

Adaptado de OWEN, 1980.

O estadiamento é iniciado por meio da avaliação do tamanho da formação. Como a doença pode se apresentar como um único nódulo ou com diversos nódulos, para a realização do estadiamento é necessária a medição de cada formação primária, sendo considerada para o estadiamento a formação de maior tamanho. A medição do tamanho tumoral é uma avaliação clínica fácil, sendo comumente realizada com o auxílio de um paquímetro e representa uma avaliação importante para o prognóstico. Além disso, é um recurso importante para a definição da abordagem cirúrgica para a qual o paciente será submetido para tratamento. Características clínicas como período do crescimento da formação, evidências clínicas de invasão a tecidos adjacentes e condições inflamatórias, também devem ser consideradas. O tamanho da formação é considerado uma característica prognóstica (CASSALI *et al.*, 2019).

O tamanho do tumor é um parâmetro clínico classicamente associado a pior prognóstico em cães com tumores mamários malignos. Diversos estudos realizados confirmam que o tamanho da formação é uma variável consistentemente relacionada ao prognóstico e que os médicos veterinários devem considerar uma avaliação importante (CARVALHO *et al.*, 2016).

Os linfonodos regionais podem estar normais ou aumentados na palpação. Os linfonodos axilares e inguinais superficiais são palpados durante o exame físico (SORENMO, 2019). A linfadenomegalia, a fixação e/ou a reatividade do linfonodo podem significar infiltração de células cancerígenas, porém a ausência dessas manifestações não descarta a possibilidade de acometimento do linfonodo. A classificação TNM tende a ser finalizada após o procedimento cirúrgico no qual o paciente é submetido, devido à necessidade da avaliação histológica do linfonodo regional que comumente é retirado durante a ressecção cirúrgica tumoral. A citologia do linfonodo regional pode ser empregada anteriormente à cirurgia, porém não é rotineiramente realizada. A presença de células cancerígenas no linfonodo regional é considerada um fator importante de mau prognóstico, com grande impacto no tempo de sobrevivência das cadelas (CASSALI *et al.*, 2019).

Em um estudo prospectivo realizado por Rasotto e colaboradores (2017) foi determinado, dentre diversos aspectos, a taxa de sobrevivência de cadelas com neoplasia mamária. Foram acompanhadas durante 24 meses, 169 cadelas com neoplasia mamária maligna. Foi observado que apenas 19% das cadelas com acometimento do linfonodo regional sobreviveram mais de 12 meses após o procedimento cirúrgico, em comparação a 84% das cadelas que não apresentaram acometimento do linfonodo detectado por exame histopatológico do órgão. Nenhuma cadela no estudo com acometimento do linfonodo sobreviveu por mais de 24 meses, em comparação a 69% sobreviventes que não apresentaram acometimento do linfonodo.

Para a finalização do estadiamento TNM, o paciente deve ser submetido à realização de exames de imagem para a procura de metástases à distância. Para a determinação da possibilidade de metástase pulmonar, o paciente é submetido a três projeções de radiografia torácica (laterolateral direita, laterolateral esquerda e ventrodorsal). Também deve ser realizada ultrassonografia abdominal completa para a identificação de possíveis metástases em fígado, baço e outros órgãos abdominais. Outros lugares para a investigação de metástases incluem linfonodos sublobares, esternais e pré-escapulares, encéfalo e ossos (SORENMO, 2019). Exames de imagem avançados, como tomografia computadorizada e ressonância magnética, podem ser realizados para a determinação do quadro, porém não são rotineiramente realizados. A investigação de metástases à distância é fundamental para a

determinação da conduta terapêutica, uma vez que os pacientes com metástases podem não ser beneficiados da ressecção cirúrgica (CASSALI *et al.*, 2019).

Dentre as neoplasias que mais comumente apresentam metástases (taxa maior que 40%), podemos destacar o carcinoma mioepitelial, o carcinoma adenoescamoso, o carcinoma sólido, o comedocarcinoma, o carcinoma anaplásico e o carcinossarcoma (RASOTTO *et al.*, 2017).

2.3 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DA NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA

Embora os tumores da glândula mamária possam ser benignos ou malignos, aproximadamente 40 a 50% dessas formações são malignas (SORENMO *et al.*, 2019). Uma classificação histológica é realizada de acordo com o tecido de origem da neoplasia (podendo ser tecido epitelial, mioepitelial ou mesenquimal) (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011; PEÑA, 2013). A maioria dos tumores da glândula mamária são de origem epitelial, porém algumas formações podem ter característica histológica mista, apresentando tecido epitelial e mioepitelial conjuntamente, com áreas de tecido ósseo ou cartilaginoso. Tumores de origem exclusivamente mesenquimal, como fibrossarcomas, osteossarcomas ou hemangiossarcomas mamários, são raros, mas geralmente associados a comportamento mais agressivo e pior prognóstico (VARALLO *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ *et al.*, 2022).

As neoplasias mamárias de origem epitelial são tradicionalmente classificadas de acordo com suas fronteiras histopatológicas, grau de diferenciação e padrões arquiteturais, elementos fundamentais para predição do comportamento biológico (PEÑA, 2013; CASSALI *et al.*, 2019). Entre essas, os carcinomas tubulares (ou adenocarcinomas) representam o subtipo mais frequente, caracterizando-se pela manutenção parcial da arquitetura ductal ou tubular típica da glândula mamária normal, o que confere maior grau de diferenciação e, em alguns casos, melhor prognóstico (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011; SORENMO, 2019). O carcinoma *in situ*, por sua vez, consiste em proliferação epitelial maligna restrita à membrana basal, sem invasão estromal, frequentemente apresentando padrão multicêntrico e crescimento ao longo de ductos e lóbulos pré-existentes (CASSALI *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ *et al.*, 2022). Já os carcinomas sólidos representam tumores menos diferenciados, nos

quais há perda completa das estruturas tubulares ou ductais, resultando em massas compostas por ninhos ou placas celulares coesas, geralmente associadas a maior agressividade (PEÑA, 2013). No extremo do espectro morfológico encontram-se os carcinomas anaplásicos, formações epiteliais altamente indiferenciadas, marcadas por intenso pleomorfismo celular, mitoses numerosas e comportamento francamente infiltrativo, não se enquadrando em nenhuma das categorias anteriores e exibindo prognóstico reservado (SORENMO *et al.*, 2019; VARALLO *et al.*, 2019).

Os carcinomas inflamatórios da glândula mamária são anaplásicos e possuem características clínicas e histopatológicas marcantes, como envolvimento do tecido cutâneo saudável adjacente com edema, dor importante, extenso infiltrado de células inflamatórias, células epiteliais malignas nos vasos linfáticos e uma rápida progressão clínica. Pacientes com carcinoma inflamatório geralmente não são beneficiados com a retirada cirúrgica do tumor. A diferenciação histológica dos tumores epiteliais da glândula mamária tem impacto no prognóstico, com piora associada à perda de diferenciação. Os carcinomas *in situ* e os adenocarcinomas têm o melhor prognóstico em comparação ao carcinoma inflamatório e ao carcinoma anaplásico (SORENMO *et al.*, 2019).

Os mioepiteliomas malignos, também denominados carcinomas de células fusiformes ou carcinosarcomas mioepiteliais, são tumores raros que se originam das células mioepiteliais da glândula mamária e representam uma pequena fração das neoplasias mamárias em cadelas (PEÑA *et al.*, 2013; GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011). Devido ao padrão fusiforme e ao arranjo estromal dessas células, a diferenciação entre mioepiteliomas malignos e fibrossarcomas pode ser desafiadora, sendo frequentemente necessária a utilização de imuno-histoquímica para detecção de marcadores como p63, calponina, CK14 e SMA, que auxiliam na confirmação da origem mioepitelial (CASSALI *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ *et al.*, 2022).

Os tumores mistos da glândula mamária consistem em células ductais e mioepiteliais com áreas de cartilagem e osso. A origem do tecido conjuntivo nesses tumores é controversa e pode incluir alterações metaplásicas em células epiteliais, células mioepiteliais ou células estromais intersticiais. Tumores mistos malignos, também chamados de carcinosarcomas, são incomuns em cães e são compostos por células epiteliais malignas e elementos malignos do tecido conjuntivo. O

prognóstico para cães com tumores malignos mistos é ruim e a maioria desenvolve metástase no primeiro ano (SORENMO *et al.*, 2019).

Devido à abundância e possível subjetividade nas classificações descritas em literatura e à dificuldade de determinar prognóstico isoladamente apenas por uma análise histológica, Peña e colaboradores (2014) propuseram um método de classificação histológica e clínica como ferramenta prognóstica em carcinomas mamários em cães. Foram avaliadas 65 cadelas, com pelo menos uma neoplasia nas mamas, tratadas cirurgicamente e acompanhadas por pelo menos 28 meses. O tamanho do tumor, o grau histológico, a idade, o estadiamento clínico TNM e a presença de metástase em linfonodos no momento do diagnóstico foram associados ao grau histológico. Após a ressecção cirúrgica, realizada como tratamento único, o material foi submetido a análise histológica e recebeu uma pontuação de acordo com três fatores (formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e figuras de mitose), com as formações mais diferenciadas recebendo menor pontuação em relação às formações menos diferenciadas. No final da análise, foram somados os escores dos 3 fatores, atribuindo, assim, o grau de diferenciação da formação (TABELA 3).

TABELA 3. Sistema de classificação histológica para neoplasia mamária canina.

A. Formação de túbulos ^a	1	Formação em túbulos é maior que 75%.
	2	Formação em túbulos está entre 10-75%.
	3	Formação em túbulos menor que 10%.
B. Pleomorfismo nuclear ^b	1	Núcleo pequeno uniforme ou regular e ocasionalmente nucléolos.
	2	Moderado grau de variação no tamanho e na forma dos núcleos, núcleos hipercromáticos e presença de nucléolos.
	3	Variação acentuada nos tamanhos e formas nucleares, núcleos hipercromáticos com frequente nucléolo.
C. Figuras de mitose em 10 campos ^c	1	0-9 mitoses / 10 campos HPF.
	2	10-19 mitoses / 10 campos HPF.
	3	> 20 mitoses / 10 campos HPF.
Graduação histológica Somatória (A+B+C)	3-5	I (baixo grau, bem diferenciado).
	6-7	II (intermediário, moderadamente diferenciado).
	8-9	III (alto grau, pouco diferenciado).

^a Nos tumores complexos e mistos, o percentual de formação tubular é pontuado considerando apenas áreas epiteliais. No mioepitelioma maligno, a formação tubular recebe a pontuação 2. Nos carcinomas mamários heterogêneos, a pontuação tubular deve ser avaliada na área maligna mais representativa.

^b Nos tumores complexos e mistos, o pleomorfismo nuclear é avaliado em todos os componentes malignos.

^c HPF, campos de alta potência. Os campos são selecionados na periferia ou nas partes mais mitoticamente ativas da amostra (não apenas nas células epiteliais).

Adaptado de PEÑA *et al.*, 2014.

De acordo com essa classificação, as formações em grau I têm melhor prognóstico e maior tempo de sobrevivência se comparadas as formações dos graus II e III. Além disso, por uma avaliação prognóstica, foi proposta uma subdivisão do grau I em IA e IB, no qual IA seriam formações menores que 1 centímetro e IB seriam

formações entre 1 e 3 centímetros. Em geral, formações menores apresentam melhor prognóstico em relação às formações maiores (PEÑA *et al.*, 2014).

O grau III representou a pior condição, sendo observada com frequência a recidiva após a ressecção cirúrgica e a metástase. Os animais com doença classificada nesse grau também foram os animais que mais morreram em virtude da doença, além de apresentarem o menor tempo de sobrevivência dentre os três possíveis graus. As formações de grau II, ou intermediário, possuem aspectos e comportamentos intermediários às duas classificações anteriores (PEÑA *et al.*, 2014).

2.4 CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA DA NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA

Para a classificação da neoplasia mamária canina, são propostas diversas classificações de acordo com a literatura, porém essas classificações não conseguem identificar diferenças biológicas entre os subtipos histológicos, particularmente em pacientes com o mesmo estado da doença que possuam a mesma estrutura anatômica, morfológica e histológica. Além disso, diversos pesquisadores sugeriram novas classificações histológicas ou ainda sugeriram modificações nas classificações histológicas já consolidadas, resultando em subjetividade nas interpretações (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011; PEÑA *et al.*, 2013; SORENMO *et al.*, 2019). Devido a muitas diferenças nos sistemas de classificação, os oncologistas têm dificuldade em selecionar a classificação que mais define e caracteriza a doença, bem como a progressão (VARALLO *et al.*, 2019).

Os fenótipos celulares podem ser utilizados como uma nova ferramenta que contribui para a compreensão da biologia tumoral, portanto, a imuno-histoquímica das células cancerígenas deve ser considerada como uma ferramenta eficaz no ambiente laboratorial e clínico. Vários marcadores imuno-histoquímicos foram propostos no tratamento de câncer de mama da mulher, sendo já estabelecido um painel de biomarcadores que consegue identificar comportamentos biológicos distintos a partir da análise do perfil fenotípico tumoral (VARALLO *et al.*, 2019). Esse painel inclui os receptores hormonais de estrogênio (ER α) e progesterona (RP), o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) e os índices de proliferação celular ki67 e morte celular p53. No entanto, a superexpressão do HER-2 é fortemente relacionada

à diminuição da expectativa de vida em mulheres. Contudo, na medicina veterinária, ainda são escassos os estudos das classificações fenotípicas para o estadiamento clínico e prognóstico da neoplasia mamária canina (VARALLO *et al.*, 2019).

Os ER α e RP são os biomarcadores mais estudados em medicina veterinária para a neoplasia mamária (MAINENTI *et al.*, 2014). Os hormônios são essenciais para o crescimento normal do tecido mamário e seu desenvolvimento e acredita-se que tenham papel fundamental no crescimento de alguns tumores (SORENMO *et al.*, 2019; TERZAGHI *et al.*, 2020). A maioria das neoplasias mamárias caninas expressam ER α e/ou RP. Em mulheres, as neoplasias com baixa expressão dos receptores hormonais não são sensíveis à terapia endócrina e, geralmente, estão associadas a pior prognóstico, enquanto, as pacientes com neoplasias com expressão dos receptores tendem a apresentar resultados clínicos ligeiramente melhores. Ambos os receptores são detectados apenas nas células tumorais epiteliais. Na medicina veterinária, alguns estudos demonstraram que as expressões de um ou ambos os receptores foram mais frequentes nos tumores benignos e, em geral, a sua expressão é relacionada com um prognóstico mais favorável (KASZAK *et al.*, 2018). Além disso, Peña e colaboradores (2014) destacaram a importância de seguir critérios padronizados para interpretação imuno-histoquímica, recomendando o uso do sistema de escore de Allred, que combina intensidade e percentual de células positivas, garantindo maior reprodutibilidade e comparabilidade entre estudos.

O RP é um marcador com alta sensibilidade e especificidade em amostras obtidas por punção aspirativa por agulha fina, apresentando correspondência acima de 90% com a imuno-histoquímica tradicional. Essa evidência reforça o potencial de uso do RP como marcador diagnóstico precoce e de triagem, especialmente em abordagens minimamente invasivas (XINYI *et al.*, 2025).

O HER-2 é considerado um importante biomarcador tumoral e funciona para regular o crescimento, a sobrevivência e a diferenciação do tumor. É expresso em aproximadamente 30% das neoplasias mamárias caninas, porcentagem essa semelhante em tumores de mama na mulher. Na medicina humana, a superexpressão do HER-2 é fortemente relacionada à diminuição da expectativa de vida, portanto, o medicamento trastuzumabe, combinado com quimioterapia, é frequentemente associado ao tratamento da doença (KRISTIENSEN *et al.*, 2016). Na medicina

veterinária, uma correlação positiva foi observada entre a expressão sérica e tecidual do HER-2 nas neoplasias mamárias. Também foi observada correlação positiva entre a expressão do HER-2 e o índice mitótico, altos graus histológicos e tamanho da formação. É considerado um fator de mau prognóstico, contudo, a ausência de diferença entre a expressão dos HER-2 em tumores malignos e benignos já foi relatada em alguns estudos, sugerindo que a sua expressão não ocorre de maneira uniforme entre as diferentes categorias histológicas. Alguns trabalhos indicam que a expressão do HER-2 pode estar mais relacionada a características biológicas específicas do tumor, como por exemplo proliferação celular aumentada, comportamento agressivo e potencial metastático, do que exclusivamente ao diagnóstico histológico. Essa variabilidade pode refletir heterogeneidade intratumoral, limitações metodológicas da imunomarcagem ou diferenças entre anticorpos utilizados, além de possíveis particularidades da biologia tumoral canina quando comparada ao modelo humano (VARALLO *et al.*, 2019; SAMMARCO *et al.*, 2023; XINYI *et al.*, 2025).

Em 2019, Varallo e colaboradores propuseram a utilização de um sistema de classificação fenotípica em apenas quatro possíveis classificações baseadas na avaliação imuno-histoquímica dos receptores, como descrito na TABELA 4.

TABELA 4. Possíveis classificações fenotípicas dos tumores de mama em cadelas.

Classificação	Receptores hormonais	Receptor HER-2
Luminal A	ER α ⁺ e/ou RP ⁺	HER-2 ⁻
Luminal B	ER α ⁺ e/ou RP ⁺	HER-2 ⁺
HER-2*	ER α ⁻ e RP ⁻	HER-2 ⁺
Triplo negativo	ER α ⁻ e RP ⁻	HER-2 ⁻

O sinal (-) após o nome do receptor indica que a formação é negativa para a presença do receptor e o sinal (+) após o nome do receptor indica que a formação é positiva à presença do receptor. HER-2*: HER-2 superexpresso.

Adaptado de VARALLO *et al.*, 2019.

Os fenótipos classificados como luminal A e B são associados a melhor prognóstico, enquanto as neoplasias com fenótipo HER-2 superexpresso e triplo negativo são mais agressivas e apresentam maior ocorrência de metástases, pior

classificação no sistema TNM e menor tempo de sobrevida. Além disso, as formações fenotipicamente classificadas como HER-2 superexpresso e triplo negativo possuem uma menor possibilidade de tratamento, uma vez que, não possuindo os receptores descritos, não respondem a terapias alvo-receptor (VARALLO *et al.*, 2019).

2.5 BIOMARCADORES DA NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA

Os biomarcadores são proteínas que podem ser mensuradas no sangue ou em tecidos (inclusive em tecidos tumorais) e podem dar informações a respeito da presença de uma doença, resultados do tratamento e ajudar a determinar o prognóstico do paciente. Toda célula cancerígena expressa proteínas específicas que são chamadas de antígenos tumorais específicos (ATE). Em pacientes com câncer, esses antígenos podem servir de biomarcadores se forem detectados em outros tecidos, no soro, ou até mesmo na urina em concentrações maiores que as normalmente encontradas. Portanto, podemos distinguir entre biomarcadores séricos e teciduais/celulares (KASZAK *et al.*, 2018). Os marcadores tumorais séricos desempenham um papel importante no rastreio, diagnóstico precoce e na sua recorrência, ajudando no tratamento e acompanhamento de diversas neoplasias (JAIN *et al.*, 2021).

Na medicina humana, os biomarcadores são amplamente utilizados para o diagnóstico e acompanhamento ao tratamento do câncer de mama. Os biomarcadores podem avaliar características do comportamento tumoral como proliferação celular, apoptose, potencial metastático, angiogênese, entre outros (KASZAK *et al.*, 2018).

2.5.1 BIOMARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE

Uma estimativa do potencial de proliferação celular de um tumor pode ser útil para determinar a malignidade de um tumor. Uma alta taxa de proliferação está relacionada ao rápido crescimento da neoplasia e à sua capacidade de causar metástases locais e à distância. O ki67 e PCNA são biomarcadores relacionados à proliferação celular, enquanto o p53 traz informações de apoptose e carcinogênese celular (KASZAK *et al.*, 2018).

2.5.1.1 Ki67

O ki67 é o biomarcador mais utilizado para o estudo de proliferação celular e apoptose em neoplasias mamárias caninas e é detectado em diversas outras neoplasias. O ki67 é uma proteína nuclear que só pode ser detectada no núcleo celular durante a interfase e durante a mitose. É detectado na fase G1 do ciclo celular e tem a sua detecção aumentada nas fases S e G2. Tem sua expressão mais alta detectada na fase M, contudo, sua expressão desaparece rapidamente após a mitose. Na fase G0 é indetectável. Pode ser detectado tanto no soro quanto no tecido tumoral a ser analisado. A determinação do índice mitótico durante o exame histopatológico não é tão precisa quanto a realização de imuno-histoquímica para o ki67, pois o índice mitótico mostra apenas o número de células submetidas a mitose, enquanto a imuno-histoquímica do ki67 é expressa nas células nas diferentes fases do ciclo celular (KASZAK *et al.*, 2018). No câncer de mama da mulher, a alta expressão do ki67 está relacionada com mau prognóstico, mas, ao mesmo tempo, foi demonstrado que pacientes com alta expressão do ki67 tendem a responder melhor à quimioterapia, provavelmente devido à alta taxa de proliferação celular desses pacientes (CARVALHO *et al.*, 2016).

A expressão do ki67 é mais alta em tumores com piores características clínicas e histopatológicas, como em tumores de grande tamanho, ulcerados, inflamados, quando estão invadindo tecidos adjacentes e ainda quando apresentam infiltração nos linfonodos regionais. Um estudo mostrou que a expressão do ki67 em metástases para linfonodos teve correlação positiva com sua expressão no tecido tumoral. Contudo, em cadelas idosas, a expressão do ki67 tende a ser mais baixa do que nas cadelas jovens e adultas, devido ao fato de os processos de proliferação celular tenderem a serem mais lentos em animais com idade avançada (KASZAK *et al.*, 2018).

2.5.1.2 PCNA

O PCNA significa *Proliferating Cell Nuclear Antigen* — em português, Antígeno Nuclear de Células em Proliferação, portanto, é um marcador de proliferação celular. O PCNA é um antígeno expresso nos núcleos celulares durante a fase de síntese do

DNA do ciclo de divisão celular. Os fatores de crescimento resultantes de danos no DNA induzem os níveis de PCNA a permanecerem elevados. O PCNA tem uma meia vida longa e pode ser expresso nas fases de reparo celular, uma vez que esse antígeno é uma proteína auxiliar para a DNA polimerase δ , enzima envolvida nos processos metabólicos associados a reparo em danos no DNA, incluindo reparo por excisão de nucleotídeos, excisão de bases nitrogenadas, incompatibilidade e reparo na quebra da dupla fita (CARVALHO *et al.*, 2016). Na medicina humana, é considerado um bom biomarcador de proliferação, mas quando utilizado em conjunto com outros biomarcadores. A desvantagem do PCNA como biomarcador é a de que ele não é específico para proliferação, estando também envolvido no reparo do DNA (KASZAK *et al.*, 2018).

Na medicina veterinária, a expressão do PCNA é frequentemente avaliada em casos de neoplasia mamária canina. A expressão do PCNA observada por imunohistoquímica apresenta correlação positiva com o tamanho tumoral, o índice mitótico, o grau nuclear, o grau histológico de malignidade e metástases em linfonodos regionais. Além disso, como o ki67, sua expressão é mais alta em tumores de maior malignidade (KASZAK *et al.*, 2018). Em um estudo realizado, foi confirmada a expressão aumentada de PCNA nos tecidos não neoplásicos adjacentes ao tumor, sugerindo a presença de micrometástases precoces e maior agressividade tumoral, o que foi posteriormente identificado através de exame histopatológico. Portanto, a expressão aumentada do PCNA está associada a pior prognóstico e diminuição da taxa de sobrevivência (CARVALHO *et al.*, 2016).

2.5.1.3 p53

A proteína p53 é um importante biomarcador de transformação celular neoplásica, divisão celular e apoptose. Essa proteína é responsável por reter as células na fase G1 para garantir o reparo adequado no DNA e a indução de apoptose no caso de danos irreversíveis ao DNA, ou seja, acredita-se que a p53 protege as células contra mutações importantes, garantindo, assim, a sua estabilidade genômica. Durante o processo neoplásico, acumula-se no tecido tumoral, e devido a sua mutação, passa a desempenhar um papel de oncogene por ocorrer a perda de suas funções inibidoras de crescimento, resultando em uma proliferação descontrolada e

consequente contribuição para a ocorrência de um ciclo celular não regulado com resistência à apoptose, além de contribuir para a disseminação metastática por meio da angiogênese (LEE *et al.*, 2002). Acredita-se que as mutações na p53 sejam a alteração genética mais comum no câncer de mama em mulheres, como também na neoplasia mamária canina (OLIVEIRA *et al.*, 2017; KASZAK *et al.*, 2018).

Em humanos, a mutação do p53 está associada à progressão tumoral. Essas mutações foram detectadas em 15-34% dos casos analisados e têm sido consideradas um importante biomarcador de mau prognóstico e de diminuição na taxa de sobrevida. A mutação do gene p53, além de ser observada na neoplasia mamária canina, também foi detectada em outras neoplasias já estudadas, como no carcinoma de tireoide, adenocarcinoma adanal, osteossarcoma, linfoma e outras. A mutação do gene p53 pode ser observada tanto em neoplasias mamárias malignas, quanto nas benignas, sugerindo uma propensão dessas lesões à progressão (LEE *et al.*, 2002). Embora várias mutações de p53 tenham sido identificadas, sua funcionalidade ainda não está clara e não há associação evidente entre essas mutações e a incidência de neoplasias mamárias malignas em cães (KASZAK *et al.*, 2018).

2.5.2 BIOMARCADORES DE POTENCIAL METÁSTÁTICO

A habilidade da neoplasia de metastatizar, ou seja, de se instalar em tecidos próximos ou distantes, depende da capacidade de adesão da célula neoplásica a outras células ou a outro tecido. A força dessa conexão pode ser mensurada pela expressão das proteínas envolvidas nesses processos. Existem vários tipos de moléculas de adesão, como integrinas, selectinas, partículas semelhantes a imunoglobulinas e caderinas. As caderinas são proteínas transmembrana dependentes de cálcio e são boas indicadoras de metástase tumoral. Além disso, CEA e CA-15 são glicoproteínas envolvidas na adesão intracelular e representam alguns dos diversos biomarcadores disponíveis para o câncer de mama em humanos (KASZAK, 2018).

2.5.2.1 E-CADERINA

A e-caderina faz parte das caderinas, que são um grupo de glicoproteínas transmembrana dependentes de cálcio responsáveis pela adesão intercelular. A e-caderina está presente na maioria dos tecidos epiteliais, particularmente na glândula mamária e desempenha um papel importante para a manutenção estrutural e funcional, garantindo a integridade do tecido epitelial. Como a e-caderina é o principal componente das junções epiteliais, alterações estruturais ou funcionais na mesma podem comprometer a adesão intercelular, favorecendo o desenvolvimento do tumor e facilitando a motilidade das células neoplásicas e aumentando, assim, o risco metastático tumoral (CANADAS *et al.*, 2019).

A e-caderina liga-se a um grupo de proteínas interligadas chamadas cateninas, em particular, com a β -catetina. A β -catetina interage com o domínio citoplasmático da e-caderina e permite o agrupamento de estruturas juncionais. Qualquer disjunção desse complexo reduz a adesão celular. A β -catetina é uma proteína citoplasmática que é degradada na neoplasia, o que resulta no seu acúmulo no citoplasma e nos núcleos das células tumorais. Sua expressão está associada à progressão tumoral, surgimento de metástases e mau prognóstico. Normalmente, são determinadas as expressões de β -catetina no sangue, juntamente com as de e-caderina (KASZAK, 2018).

A e-caderina favorece a adesão intracelular, contribuindo para manter os arranjos arquitetônicos do tecido e evitando o descolamento e a migração celular. A e-caderina é considerada um fator importante na supressão da invasão tumoral. Alterações na expressão e/ou função da e-caderina têm sido implicadas na possibilidade de o tumor primário originar metástases (PENÃ *et al.*, 2013). A e-caderina também participa da transição epitélio-mesenquimal (EMT), um processo de modulação fenotípica caracterizada pela perda de características epiteliais e aquisição de características semelhantes a mesenquimal. Uma dessas características da EMT é uma regulação negativa e progressiva de moléculas de adesão intercelular (como a própria e-caderina) e expressão *de novo* de marcadores mesenquimais, levando a mudanças fenotípicas notáveis. Esse programa constitui uma vantagem adaptativa para as células neoplásicas, interrompendo o contato intercelular e aumentando a sua capacidade de atingir tecidos adjacentes (CANADAS *et al.*, 2019).

Em humanos, a expressão diminuída ou negativa da e-caderina está correlacionada com o grau histológico da formação, tamanho tumoral e comprometimento do linfonodo regional e está associada à mau prognóstico (KASZAK *et al.*, 2018). Em cães, os carcinomas de baixa expressão de e-caderina são geralmente tumores de moderado e alto grau de malignidade, caracterizados por ruptura dos arranjos em tubos e alto pleomorfismo nuclear, com padrão de crescimento invasivo e prognóstico desfavorável (CANADAS *et al.*, 2019). Como nas cadelas, a maioria das neoplasias mamárias é de origem epitelial, uma expressão reduzida da e-caderina está relacionada ao aumento do desenvolvimento tumoral, à progressão da doença, à malignidade do tumor, à agressividade das suas metástases e ao curto tempo de sobrevida (KASZAK *et al.*, 2018).

2.5.2.2 CEA

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína envolvida na adesão intracelular (KASZAK *et al.*, 2018). É uma glicoproteína produzida pela mucosa gastrointestinal, localizada nas membranas das células epiteliais em pequenas quantidades, e a sua expressão aumentada é observada nos cânceres de mama, cólon e pulmões em humanos. Foi o primeiro biomarcador utilizado no câncer de mama em humanos e, atualmente, em associação com o CA 15-3. Geralmente é mensurado no soro (XINYI *et al.*, 2025). Existe uma correlação positiva entre as alterações nos níveis plasmáticos de CEA e a resposta ao tratamento em humanos com câncer de mama. É também um marcador útil para a detecção precoce de recorrência e metástase. A expressão aumentada do CEA corresponde positivamente com características clínico-patológicas do tumor, tamanho e grau do tumor e acometimento do linfonodo regional. No entanto, estudos confirmaram que apenas os resultados das medições do CEA em associação ao CA 15-3 podem ser considerados sensíveis e específicos (KASZAK *et al.*, 2018).

Um estudo mensurou o CEA sérico em 77 cadelas para avaliação prognóstica e de resposta ao tratamento. As cadelas foram divididas em 4 grupos (Grupo 1: cadelas saudáveis; Grupo 2: cadelas com carcinomas sem metástases e menores que 3 cm; Grupo 3: cadelas com carcinomas sem metástases e maiores que 3 cm; Grupo 4: cadelas com carcinoma e metástase em linfonodo). Os níveis de CEA foram

determinados por ELISA no dia do diagnóstico e em 15 dias após a cirurgia de mastectomia. As dosagens de CEA foram elevadas nas cadelas com carcinoma, principalmente nas cadelas com formações maiores que 3 cm, como também nas cadelas com acometimento no linfonodo regional. Foi observado que a mastectomia reduziu a concentração de CEA no sangue quando dosado após 15 dias da cirurgia. Além disso, os níveis elevados de CEA foram associados a piores prognósticos, portanto, sugerindo que o CEA possui bom valor biomarcador para o acompanhamento do tratamento e para a indicação prognóstica nas formações mais agressivas (SENHORELLO *et al.*, 2019).

2.5.2.3 CA 15-3

O antígeno carboidrato 15-3 (CA 15-3), um produto do gene da mucina 1, é uma molécula glicosilada transmembrana que é superexpressa de forma aberrante em muitos adenocarcinomas em forma subglicosilada e depois liberada na circulação. O antígeno contém epítomos que são reconhecidos por dois anticorpos monoclonais murinos: as glicoproteínas semelhantes à mucina de alto peso molecular DF3 e 115d8. Durante a carcinogênese, a expressão da membrana da oncoproteína associada à superfície celular muda de apical para circunferencial com a perda da polaridade das células epiteliais, agindo assim, como moléculas antiadesivas e facilitando o desprendimento de células malignas, aumentando o potencial metastático e invasivo das células tumorais (MANUALI *et al.*, 2012). A dosagem sérica de CA 15-3 correlaciona-se positivamente com características clínicas e patológicas do tumor, como acometimento do linfonodo, tamanho do tumor e estágio da doença. No entanto, como mencionado anteriormente, para aumentar a sensibilidade recomenda-se dosar o CA 15-3 juntamente com o CEA (KASZAK *et al.*, 2018).

Embora o CA 15-3 seja um dos biomarcadores séricos mais empregados na medicina humana em pacientes com câncer de mama, seu baixo grau de sensibilidade e especificidade limita seu uso para fins diagnósticos. Assim, esse marcador é utilizado principalmente para o monitoramento da resposta terapêutica e detecção de recidivas, especialmente quando interpretado em conjunto com outros biomarcadores, como o CEA, o que aumenta a acurácia clínica da avaliação (KASZAK *et al.*, 2018).

2.6 EPIGENÉTICA E CÂNCER

O conceito de epigenética foi primeiramente postulado por Waddington (1942) para descrever eventos influenciados pelo ambiente, que residem entre o genótipo e sua expressão fenotípica. Tais eventos ocorrem independentemente da sequência nucleotídica do DNA e têm como produto final mudanças herdáveis da função gênica e de sua expressão fenotípica (WADDINGTON, 2012). Mais recentemente, a epigenética é definida como o estudo das mudanças na função do gene que são herdáveis mitoticamente e/ou meioticamente e que não implicam uma mudança na sequência de DNA (DUPONT *et al.*, 2009).

As alterações epigenéticas podem ocorrer por meio da metilação do DNA, das modificações pós-traducionais das histonas e dos RNAs não codificantes (ncRNA) que interferem no acesso de diversos fatores de transcrição ao DNA, modulando, conseqüentemente, a expressão gênica e podendo dar origem aos fenótipos patológicos (MOORE *et al.*, 2013). A existência de uma complexa interação entre as variadas formas de controle epigenético gerou o termo proposto por alguns pesquisadores como “*código epigenético*”, o qual modula, por sua vez, a expressão gênica em resposta a estímulos endógenos e/ou ambientais (SAWAN *et al.*, 2008).

2.7 MicroRNA

Os microRNAs (miRs) correspondem a uma classe de pequenos RNAs de fita simples com uma média de comprimento de 17 a 25 nucleotídeos. Eles se originam de regiões não codificadoras de proteína (íntrons) e desempenham um papel na regulação gênica pós-transcricional sob condições fisiológicas normais (KIM *et al.*, 2009). A biogênese do miR ocorre no núcleo da célula, onde ele é transcrito dos íntrons ou de regiões não codificantes do DNA pela enzima polimerase II, produzindo assim o pri-miR. O pri-miR é clivado no núcleo pela ação da enzima RNase III (também conhecida como Drosha), resultando em um ou mais precursores de miR, chamados pré-miR (SALVADOR-BERBANÉ *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2024). Estes geralmente têm 70 a 90 nucleotídeos em comprimento e uma estrutura secundária não pareada (cuja conformação espacial assemelha-se a um grampo de cabelo) (KIM *et al.*, 2009). Após esse processo, o pré-miR é reconhecido pela proteína

exportina 5 que a transporta para o citoplasma, onde uma segunda enzima RNase III (esta chamada de Dicer) cliva a região que contém o grampo, formando, assim, um miR de fita dupla (composto pela fita simples madura e fita complementar) que se ligará à proteína argonauta (Ago). Uma das fitas do miR de fita dupla é reconhecida pelo complexo proteico denominado complexo silenciador induzido por RNA (RISC). As fitas são finalmente separadas e o miR maduro é incorporado ao RISC, que atua no impedimento da tradução, seja inibindo a transcrição de um RNA mensageiro ou ainda a sua degradação por perfeita complementariedade (SALVADOR-BERBANÉ *et al.*, 2018).

É consolidado que os miRs participam de diferentes processos celulares de grande importância, como por exemplo, a regulação da proliferação celular, a diferenciação, a angiogênese, a migração e a apoptose. Diversos estudos têm indicado que a expressão dos miRs é alterada em vários tipos de cânceres e, adicionalmente, podem ser observadas diferenças na sua expressão de acordo com os diferentes estágios da mesma neoplasia (KASZAK *et al.*, 2018). Estudos mostraram que alguns miRs podem desregular a diferenciação celular, a proliferação e os processos de apoptose podendo ser importantes na intensificação do câncer. Vários miRs do tecido foram relatados e seus perfis de expressão podem ser utilizados como potenciais biomarcadores para diagnóstico, prognóstico e terapia (JAIN *et al.*, 2021).

Podemos classificar os miRs em dois tipos: miR oncogênico (oncomiR), que atua inibindo os genes supressores do tumor, e miR supressor, que inibe a expressão do gene oncogênico. Ambos os miRs podem atuar como biomarcadores e a alteração na expressão é usada para detecção precoce de doenças e para a condução do tratamento (JAIN *et al.*, 2021).

2.7.1 miR-16

Em humanos, o miR-16 controla a via intrínseca de apoptose em linhagens celulares do câncer de mama (BOGGS *et al.*, 2008). Em um estudo realizado na medicina humana, com mulheres apresentando câncer de mama, foi observado que os níveis do miR-16 foram significativamente maiores nas pacientes que não

apresentavam acometimento metastático em linfonodo em comparação àquelas com metástase detectada no linfonodo. Além disso, os níveis plasmáticos do miR-16 não diminuíram nas pacientes que foram submetidas à quimioterapia no pós-operatório, diferentemente de outros microRNAs testados, como o miR-27A e o miR-132, provavelmente, por desempenhar um papel nos processos inflamatórios (STÜCKRATH *et al.*, 2015).

O miR-16 atua como um regulador negativo de vias de sobrevivência celular, exercendo efeito direto sobre o gene BCL-2, um importante inibidor da apoptose. Estudos em modelos humanos de câncer de mama mostram que a superexpressão do miR-16 reduz os níveis proteicos de BCL-2 em linhagens MCF-7, células responsivas a estrogênio amplamente utilizadas para investigar mecanismos hormonodependentes da tumorigênese (ZHANG *et al.*, 2013). O gene BCL-2, inicialmente descrito em linfomas e posteriormente identificado em diversos tecidos epiteliais, é frequentemente expresso em carcinomas mamários humanos e associado à resistência apoptótica. De forma complementar, a supressão experimental do miR-16 resulta em aumento da expressão de BCL-2 em células MDA-MB-231, linhagem de fenótipo triplo negativo caracterizada por comportamento mais agressivo e menor dependência hormonal, reforçando o papel pró-apoptótico do miR-16 e sua relevância em tumores de pior prognóstico (ZHANG *et al.*, 2013; MADADI *et al.*, 2019). Esses achados sustentam a função do miR-16 como um modulador crítico do equilíbrio proliferação/apoptose, com implicações diretas na progressão tumoral.

2.7.2 miR-18a

O miR-18a integra o cluster miR-17-92, um dos mais estudados em oncologia, descrito como um conjunto de miRs com forte potencial oncogênico, envolvidos em proliferação, evasão de apoptose e remodelação do microambiente tumoral (SALVADOR-BERNABÉ *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2024). Em termos funcionais, o miR-18a atua como regulador pós-transcricional, ligando-se à região 3'UTR de diversos mRNAs, incluindo genes relacionados à sinalização hormonal e ao controle do ciclo celular (BORGES, 2022; FERREIRA *et al.*, 2024). No contexto do câncer de mama, em mulheres e cadelas, destacam-se como alvos relevantes o gene ESR1, que codifica o ER α e genes associados à proliferação e diferenciação epitelial, o que

justifica a classificação do miR-18a como oncomiR em múltiplos modelos tumorais (ABBATE *et al.*, 2023; FERREIRA *et al.*, 2024).

Na mama humana, estudos transcriptômicos demonstraram que o miR-18a se encontra aumentado em tumores ER α negativos, altamente proliferativos, integrando perfis de expressão associados a pior prognóstico (EGELAND *et al.*, 2020). Além da análise *bulk*, abordagens com hibridização *in situ* cromogênica (CISH) revelaram que o miR-18a não está restrito ao compartimento epitelial, mas é fortemente expresso no estroma intratumoral, sobretudo em macrófagos, plasmócitos e linfócitos em tumores com intenso infiltrado inflamatório. Esse padrão sustenta a ideia de que o miR-18a participa tanto da biologia da célula tumoral quanto da modulação do microambiente imune, reforçando o seu papel em fenótipos mais agressivos e pouco dependentes de estrogênio (EGELAND *et al.*, 2020).

Em cadelas com neoplasias mamárias, o miR-18a já foi consistentemente descrito como superexpresso em carcinomas, quando comparado à glândula mamária normal e a tumores benignos, o que reforça a sua relevância na carcinogênese mamária canina (ABBATE *et al.*, 2022; ABBATE *et al.*, 2023). Estudos de RT-qPCR em amostras parafinadas demonstraram que altos níveis de miR-18a se associam à perda de expressão de ER α , à redução do mRNA de ESR1 e a índices proliferativos elevados, sugerindo um eixo epigenético no qual o aumento de miR-18a contribui para o fenótipo ER α negativo e para o comportamento biológico mais agressivo dos carcinomas mamários (ABBATE *et al.*, 2023). Revisões recentes em oncologia comparada salientam que o miR-18a, juntamente com outros oncomiRs, desponta como biomarcador potencialmente útil para prognóstico e estratificação de risco em tumores mamários caninos (BORGES, 2022; FERREIRA *et al.*, 2024).

2.7.3 miR-18b

O miR-18b pertence ao cluster miR-106a-363, considerado um “paralelo funcional” do cluster miR-17-92, compartilhando alvos e vias de sinalização relacionadas à oncogênese (SALVADOR-BERNABÉ *et al.*, 2018; BORGES, 2022). Assim como o miR-18a, o miR-18b está envolvido na regulação de genes associados à resposta hormonal, proliferação celular e remodelação tecidual, podendo atuar como

regulador negativo de mRNAs cruciais em vias de diferenciação epitelial e de receptores nucleares (BORGES, 2022; FERREIRA *et al.*, 2024). Em diferentes modelos tumorais, o miR-18b é descrito predominantemente como oncomiR, compondo perfis de expressão associados a maior agressividade, menor diferenciação e pior evolução clínica (FERREIRA *et al.*, 2024).

Na mama humana, análises combinando expressão gênica e de mRNAs demonstraram que o miR-18b encontra-se elevado em tumores ER α negativos, com alta taxa mitótica e características *basal-like*, frequentemente acompanhado de alta densidade de infiltrado inflamatório (EGELAND *et al.*, 2020). No contexto das neoplasias mamárias caninas, estudos em amostras parafinadas mostraram que o miR-18b se encontra significativamente superexpresso em carcinomas em comparação com glândula normal e tumores benignos, em paralelo ao miR-18a (ABBATE *et al.*, 2022). Em trabalho subsequente, a mesma linha de pesquisa demonstrou que a superexpressão de miR-18b se correlaciona negativamente com os níveis de mRNA de ESR1 e com a imunexpressão de ER α , além de se associar positivamente a índices proliferativos elevados, caracterizando um perfil de tumores de maior grau histológico e pior prognóstico (ABBATE *et al.*, 2023). Esses achados sustentam a hipótese de que o miR-18b, em conjunto com o miR-18a, constitui um importante eixo epigenético de regulação negativa do ER α na espécie canina, integrando o panorama mais amplo de alterações epigenéticas descritas em tumores mamários de cadelas (BORGES, 2022; FERREIRA *et al.*, 2024).

2.7.4 miR-21

O miR-21 é um dos microRNAs mais estudados e consistentemente superexpressos no câncer de mama, tanto em mulheres quanto em cadelas. Sua expressão elevada está associada à progressão tumoral e a pior prognóstico, sendo considerado um importante oncomiR (PEÑA *et al.*, 2013; SAMMARCO *et al.*, 2023). Entre seus principais alvos estão genes que regulam apoptose, adesão e controle do ciclo celular, como BCL-2, PTEN, PDCD4, tropomiosina 1 e maspina, todos envolvidos na sobrevivência e no comportamento agressivo das células tumorais (VARALLO *et al.*, 2019). A superexpressão do miR-21 contribui para proliferação, invasão, angiogênese e formação de metástases, reforçando seu papel central na biologia dos

tumores mamários (MADADI *et al.*, 2019). Além disso, níveis elevados desse miR estão ligados à indução precoce da EMT, processo em que as células epiteliais perdem coesão e adquirem maior capacidade de migração, favorecendo a disseminação tumoral (JAIN *et al.*, 2021).

Um estudo realizado com 40 cadelas, mensurou o miR-21 por qPCR no soro sanguíneo e demonstrou a regulação positiva do miR-21 em cadelas com neoplasia mamária. Foi observada diferença significativa entre o grupo controle e as cadelas com neoplasia, sendo que as maiores dosagens foram observadas nas cadelas com tumores associados a maior malignidade. A principal descoberta desse estudo mostrando alta expressão do miR-21 em pacientes com neoplasias mamárias benignas e malignas revela que o miR-21 pode ser um biomarcador valioso para o prognóstico na neoplasia mamária canina (JAIN *et al.*, 2021).

2.7.5 miR-143

O miR-143 é classicamente reconhecido como um microRNA de função supressora tumoral, com papel essencial na manutenção da homeostase epitelial e na regulação negativa de vias associadas à proliferação celular, migração, metabolismo lipídico e EMT. Em condições fisiológicas, apresenta-se altamente expresso em tecidos diferenciados e no estroma mamário, atuando na inibição de genes pró-oncogênicos, como KRAS, ERK5, BCL-2, HK2 e DNMT3A, e modulando negativamente as vias de sinalização MAPK/ERK e PI3K/AKT, que estão frequentemente ativadas em processos de transformação neoplásica (SALVADOR-BERNABÉ *et al.*, 2018).

Em condições fisiológicas, o miR-143 é abundantemente expresso em tecidos diferenciados e no estroma mamário, desempenhando papel no controle da proliferação e diferenciação epitelial. Sua perda de expressão é considerada um evento precoce da carcinogênese em diversos modelos, incluindo mama humana e canina, refletindo na diferenciação celular e progressão para fenótipos mais agressivos (FERREIRA *et al.*, 2024). Estudos demonstram que tumores mamários com maior grau de malignidade, maior capacidade invasiva e fenótipos mais agressivos costumam apresentar níveis menores de miR-143, reforçando seu papel

essencial na manutenção da estabilidade celular e na prevenção da transformação tumoral (SALVADOR-BERNABÉ *et al.*, 2018; VARALLO *et al.*, 2019; SAMMARCO *et al.*, 2023).

3. JUSTIFICATIVA

O Brasil possui uma posição de destaque em relação à população canina, com cerca de 60 milhões de cães, a terceira maior população canina mundial. No Brasil, assim como em outros países, a ocorrência da neoplasia mamária em cadelas é altíssima e, devido à falta de informação à população, muitas cadelas são submetidas à avaliação do quadro em fases tardias da doença. Adicionalmente, o estudo da neoplasia mamária contribui para o melhor conhecimento do câncer de mama, uma vez que muitas neoplasias podem apresentar comportamento tumoral semelhante. O estudo dos biomarcadores e dos mecanismos epigenéticos compõe uma ferramenta importante para o diagnóstico e tratamento da doença, além de também contribuir para o estudo da biologia tumoral.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Correlacionar a expressão dos miRs com as diferentes classificações clínicas, histológicas e fenotípicas da neoplasia mamária canina.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a expressão relativa dos miR-16, miR-18a, miR-18b, miR-21 e miR-143 em amostras de neoplasia mamária canina, correlacionando-os com o comportamento e com a agressividade tumoral.

- Comparar a expressão desses miRs em tecidos macroscopicamente saudáveis com o tecido tumoral.

- Avaliar a associação entre os diferentes graus histológicos e a expressão de biomarcadores no tecido neoplásico.

- Verificar a relação entre a classificação histológica e o fenótipo das neoplasias, assim como correlacionar com outros marcadores prognósticos.

- Investigar o potencial prognóstico dos biomarcadores e dos miRs.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

A pesquisa intitulada “Estudo de biomarcadores moleculares e epigenéticos para proliferação celular e potencial metastático em diferentes estadiamentos clínicos e fenotípicos da neoplasia mamária canina”, foi autorizada e protocolada sob o CEUA-UNIP nº 6542220324.

5.2 Critérios de seleção para a amostragem

Foram triadas como candidatas à amostragem pacientes caninas, fêmeas, de idade adulta ou senil, sem predileção por raça, de porte físico variado, inteiras ou castradas. A busca pelo atendimento ocorreu de maneira espontânea do responsável das cadelas, mediante a justificativa de tratamento cirúrgico após a identificação de um algum tumor ou aumento de volume mamário. As pacientes tiveram todo o seu atendimento realizado nas dependências do Hospital Veterinário Público do município de Santo André no estado de São Paulo. O período de amostragem foi realizado de julho de 2024 a janeiro de 2025.

As pacientes foram submetidas previamente à consulta com anamnese e exame físico e à realização de exames complementares (exames hematológicos, como hemograma completo, dosagem da atividade sérica das enzimas alanina transferase e fosfatase alcalina, dosagem sérica de albumina, ureia e creatinina, ultrassonografia abdominal para a verificação de metástases abdominais e demais condições de saúde, radiografia torácica para a determinação de metástase em parênquima pulmonar e exames cardiológicos, como eletrocardiograma e ecocardiograma, sendo esses últimos requisitos pré-operatórios do serviço anestesiológico do hospital).

Foram inclusas para amostragem as primeiras 45 pacientes diagnosticadas com um nódulo único em cadeia mamária e com indicação de terapêutica cirúrgica para tratamento (mastectomia total unilateral, mastectomia regional, anaplastia, lumpectomia ou nodulectomia da formação, todas essas técnicas associadas ou não a ovário-histerectomia, de acordo com o *status* do sistema reprodutor da paciente).

Foram obtidas para a amostragem cadelas em diferentes tempos de evolução da doença e diferentes estágios do estadiamento TNM, portanto, animais com acometimento de linfonodo e/ou evidência de metástase regional ou à distância foram incluídas na pesquisa.

Não foram incluídas na amostragem cadelas com comorbidades detectadas na avaliação física ou pelos exames complementares realizados, cadelas com histórico prévio de tratamento oncológico (tanto por neoplasia mamária, quanto por qualquer outro tipo de neoplasia), cadelas com mais de um tumor na cadeia mamária ou na cadeia contralateral.

O grupo controle foi constituído de pacientes que foram submetidas a procedimento de ovário-histerectomia eletiva, portanto, sem indicação terapêutica e de maneira espontânea, sendo coletado pequeno fragmento de tecido mamário saudável para a verificação da expressão e atividade de miRs nesse tecido.

Os dados de resenha e informações da anamnese das cadelas incluídas no projeto foram tabulados para estudo epidemiológico da população da pesquisa. Os animais foram identificados de acordo com idade (em anos), raça, peso em quilogramas (kg) e *status* do sistema reprodutor (diferenciando cadelas inteiras das cadelas castradas).

Como informações de anamnese foram incluídas o tempo de evolução da neoplasia (em anos), a localização da cadeia (direita ou esquerda), a localização da mama acometida na cadeia (levando em consideração a presença de cinco mamas em cada cadeia) e características particulares de cada neoplasia, como aderências, ulcerações, pigmentações, dor à palpação, edema, calor, rubor, aspecto pendular ou séssil, formato circular ou irregular e consistência, podendo ser firme, macia ou flutuante.

5.3 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas durante a intervenção cirúrgica das cadelas que, invariavelmente, seriam submetidas ao ato operatório como forma de terapia indicada pelo médico veterinário responsável pelo atendimento da paciente. O tutor foi

informado previamente da intenção de inclusão da paciente na pesquisa e a coleta foi realizada somente após a autorização assinada no termo de consentimento livre e esclarecido. De cada paciente incluída no projeto, foram coletados 3 tipos de amostras comentadas a seguir.

Para a determinação do grau histológico e fenotípico da neoplasia foram coletados fragmentos do tumor, sendo esses imediatamente conservados a formol 10% tamponado em temperatura ambiente. Para a coleta do material de neoplasias de grandes proporções, foi dada preferência para a coleta da periferia tumoral, cerca de 1 cm³ de tecido neoplásico e com a inclusão da área de transição com tecido considerado macroscopicamente saudável. Para formações muito pequenas, o nódulo foi incluído por completo, também ocorrendo a inclusão de tecido de transição e tecido saudável. Esse material foi emblocado em parafina e os cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina.

Como a triagem inicial realizada pelo serviço veterinário do Hospital Veterinário Público de Santo André não incluía a avaliação citológica do linfonodo previamente à cirurgia, as pacientes foram submetidas à retirada do linfonodo sentinela e/ou regional da neoplasia. Para a visualização da rede linfática, as pacientes foram submetidas a coloração linfática com azul patente na dose de 2 mg/kg (Linfazul 2,5%®). A injeção do corante foi realizada pela via intradérmica peritumoral antes da realização da cirurgia da retirada no nódulo. Uma vez tendo sido identificada a rede linfática e os linfonodos (sentinela ou regional), o primeiro linfonodo associado à neoplasia foi retirado e imediatamente conservado a formol 10% tamponado em temperatura ambiente. A coleta do linfonodo foi realizada para verificação do acometimento neoplásico e dar seguimento à classificação clínica pelo sistema TNM.

Por fim, para a realização das extrações de RNA e posteriores análises epigenéticas, um pequeno fragmento de 2 mm³ da neoplasia foi coletado e imediatamente congelado a -20°C até o início do processamento. Os critérios para coleta deste material, foram semelhantes aos critérios estabelecidos para a realização do exame histopatológico (periferia das formações), exceto pela não inclusão de tecido saudável. Logo, o material coletado para a análise epigenética foi considerado exclusivamente neoplásico.

5.4 Realização do estadiamento clínico pelo sistema TNM

As formações neoplásicas foram avaliadas meticulosamente com auxílio de um paquímetro. As neoplasias foram mensuradas em centímetros (cm) para cada eixo (largura x altura x comprimento) e o valor do maior eixo foi considerado para a classificação T do sistema TNM. Os linfonodos coletados na amostragem foram emblocados em parafina e os cortes histológicos submetidos à coloração de hematoxilina e eosina. As lâminas foram avaliadas por microscopia óptica quanto a presença ou não de células neoplásicas, determinando a classificação N. A presença de metástase à distância foi determinada durante a triagem pré-operatória pelos exames de imagem. As pacientes foram submetidas a 3 projeções de radiografia torácica (ventrodorsal, laterolateral direita e laterolateral esquerda) e ultrassonografia abdominal com no máximo 21 dias prévios à data do procedimento cirúrgico, concluindo a classificação M. As pacientes foram classificadas em estágios de acordo com os critérios estabelecidos por Owen, descritos na seção 2.2.

5.5 Avaliação histopatológica das neoplasias

5.5.1 Triagem e seleção de carcinomas

Em um primeiro momento, para triagem das neoplasias e inclusão somente das neoplasias de interesse à pesquisa, as amostras foram diagnosticadas considerando as características morfológicas gerais, celulares e teciduais, conforme classificação proposta por Goldschmidt e colaboradores (2011). Para tal, as neoplasias foram classificadas como carcinomas simples, mistos, complexos e outras variantes especiais, de acordo com a presença e o padrão de proliferação de células luminais. A definição dos subtipos de carcinoma simples (tubular, papilífero, cístico, sólido, dentre outros) foi realizada com os critérios histopatológicos estabelecidos para os tumores mamários caninos.

As neoplasias malignas diagnosticadas com padrão de proliferação celular mioepitelial ou mesenquimal, assim como neoplasias benignas diagnosticadas como adenoma (incluindo todas as variações) e as amostras de tecido com diagnóstico não neoplásico (ectasia ductal, hiperplasia mamária, dentre outros) foram excluídas da

amostragem, uma vez que a próxima etapa de classificação histológica seria exclusiva para a classificação de carcinomas.

5.5.2 Classificação histológica de grau de malignidade

Na segunda etapa, as amostras foram submetidas a graduação histológica do grau de malignidade, utilizando o sistema proposto por Peña e colaboradores (2013), derivado do método de classificação da neoplasia mamária na mulher. Foram atribuídas pontuações a três parâmetros morfológicos avaliados em áreas representativas da neoplasia. Cada critério recebeu uma pontuação de 1 a 3, na qual as pontuações menores representam maior diferenciação do tecido, enquanto as pontuações maiores irão representar a indiferenciação, portanto, maior grau de malignidade.

O primeiro critério avaliado foi a formação de túbulos, referindo-se à proporção da área da neoplasia que apresentava diferenciação glandular com formação de túbulos ou ácinos revestidos por células epiteliais. Foi atribuído 1 ponto às neoplasias que apresentaram mais de 75% da massa tumoral com formação tubular. As neoplasias que apresentaram de 10 a 75% da massa tumoral com formação tubular receberam 2 pontos. Por fim, receberam 3 pontos as formações com menos de 10% de massa tumoral composta por túbulos.

O pleomorfismo celular foi o segundo critério avaliado. Ao tecido neoplásico foi atribuída uma pontuação de acordo com a variação do tamanho e da forma do núcleo celular, da cromatina e dos nucléolos. Amostras com núcleos uniformes, discretamente aumentados, cromatina fina e nucléolos pouco evidentes receberam 1 ponto. Foram atribuídos 2 pontos às neoplasias com núcleo de tamanho e formas moderadamente variáveis, cromatina densa e nucléolos visíveis. A indiferenciação celular nesse critério foi determinada pela presença de núcleos muito variados, hiper cromáticos, com nucléolos grandes e múltiplos, sendo atribuídos à neoplasia 3 pontos.

O terceiro e último critério avaliado foi o índice mitótico. A contagem das figuras de mitose foi realizada em dez campos de grande aumento (400x) nas áreas mais proliferativas da neoplasia. A pontuação seguiu a recomendação de Peña e

colaboradores (2013), considerando os campos de alta potência. Para as neoplasias em que foram contadas até 9 figuras de mitose nos dez campos de grande aumento, foi atribuída a pontuação 1. A contagem de mitoses intermediária, entre 10 e 19 figuras de mitose, conferiu a pontuação 2 às neoplasias. Neoplasias com 20 ou mais figuras de mitose nos campos de alta potência receberam a pontuação 3.

A soma da pontuação dos três critérios determinou o grau histológico de malignidade das neoplasias. As neoplasias com pontuação total de 3 a 5 (bem diferenciadas) receberam a classificação de grau I de malignidade. A classificação intermediária incluiu as neoplasias moderadamente diferenciadas, com pontuação de 6 a 7, tendo sua classificação de malignidade determinada como grau II. A pontuação 8 a 9 caracterizou as neoplasias mais indiferenciadas ou pouco diferenciadas, sendo classificadas como grau III. Os cortes histológicos foram avaliados por dois observadores de forma independente e eventuais divergências foram reavaliadas conjuntamente até o estabelecimento de um consenso.

5.6 Avaliação imuno-histoquímica

As amostras triadas como carcinoma e emblocadas em parafina foram encaminhadas para avaliação imuno-histoquímica para a determinação da classificação fenotípica e de outros marcadores. Dos blocos de parafina, foram realizadas novas lâminas silanizadas. Após a desparafinação e reidratação em séries decrescentes de álcool, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos. A recuperação antigênica foi conduzida por aquecimento a 95°C em solução tampão EDTA (pH 8,9) por 35 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com albumina sérica bovina para o bloqueio específico, e, posteriormente, incubadas a 4°C durante a noite com os anticorpos (e-caderina, ER α , RP, HER-2 e ki67). Após lavagem em PBS, as lâminas foram tratadas com o EnvisionFlex, HRP Detection Kit® (Agilen Dako) e reveladas com 3,3'-diaminobenzidina. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas com resina sintética para leitura.

Os anticorpos específicos utilizados na incubação *all night* foram Estrogen Receptor α ® (Dako Omnis, Clone EP1, Monoclonal rabbit, pronto para uso),

Progesterone Receptor® (Dako Omnis, Clone PgR 1294, Monoclonal mouse, pronto para uso), Ki67 Antigen® (Agilent Dako, Clone MIB-1, Monoclonal mouse, pronto para uso) e c-erB-2 Oncoprotein® (Agilent Dako, Clone polyclonal, Polyclonal Rabbit, diluição 1,2:1000).

5.6.1 Classificação fenotípica

Para a avaliação dos receptores hormonais ER α e RP, as lâminas imunomarcadas foram avaliadas por microscopia óptica e a marcação foi determinada utilizando o escore de Allred e colaboradores (1998), que combina o percentual das células marcadas e a intensidade de marcação. Ao percentual de células marcadas foi atribuído 0 a nenhuma célula marcada; 1, a 1 em 100; 2, ao intervalo entre 1 em 100 e 1 em 10; 3, ao intervalo entre 1 em 10 e 1/3 do campo; 4, ao intervalo entre 1/3 e 2/3 do campo; e 5, para marcações > 2/3 de células marcadas no campo. A intensidade média da coloração das células positivas recebeu a pontuação de 0 para nenhuma, 1 para fraca, 2 para intermediária e 3 para forte. Amostras com escore final de 0 e 1 foram consideradas negativas e aquelas com escore entre 2 e 8 foram consideradas positivas.

A expressão do HER-2 foi analisada quando houve marcação de membrana em mais de 10% das células neoplásicas, conforme o método semiquantitativo descrito por Koeppen e colaboradores (2001). As amostras foram classificadas em negativas (escore 0), quando não houve nenhuma marcação ou marcações incompletas em menos de 10% das células; fraca (escore +1) para marcações fracas ou incompletas em mais de 10% das células; moderada (escore +2) para marcações moderadas em mais de 10% das células; intensa (escore +3) para marcações completas e contínuas em mais de 10% das células. Os escores +2 e +3 foram considerados positivos para a superexpressão de HER-2.

Após a realização da análise da expressão dos receptores hormonais e do HER-2, as neoplasias receberam uma classificação fenotípica em 4 diferentes fenótipos, de acordo com os critérios estabelecidos por Varallo e colaboradores (2019). O primeiro fenótipo chamado de Luminal A, incluiu as neoplasias com pelo menos um dos receptores hormonais considerado positivo e o receptor de HER-2

negativo. No segundo fenótipo (Luminal B), as amostras incluídas apresentam pelo menos um dos receptores hormonais positivos, assim como a superexpressão de HER-2. O terceiro fenótipo, determinado como superexpressão de HER-2, incluiu as neoplasias que apresentaram somente a superexpressão do HER-2, sem a positividade para nenhum marcador hormonal. Por fim, o quarto fenótipo, chamado de Triplo Negativo, incluiu as neoplasias com nenhum marcador positivo, ou seja, negativos para HER-2, RP e ER α .

5.6.2 E-caderina

A expressão de e-caderina foi analisada semiquantitativamente, por presença de marcação (ausente ou presente) e intensidade da coloração (em 0, +1, +2 e +3) da adesão celular entre as membranas celulares dos carcinomas. As neoplasias foram classificadas em marcação ausente nas neoplasias sem nenhuma marcação detectável, baixa expressão quando a intensidade da marcação foi fraca (+1), moderada expressão quando a intensidade da marcação foi moderada (+2) e alta expressão, caracterizada pela mais forte intensidade de marcação (+3).

5.6.3 ki67

Para determinação do ki67, foi mensurada a quantidade de núcleos corados (positivos) em 1000 células tumorais contadas nas áreas de maior marcação da neoplasia (*hot spots*). À contagem, foi atribuída um percentual, o índice de proliferação ki67 (%). As neoplasias com índice menores que 15% foram consideradas de baixo índice proliferativo. O índice proliferativo intermediário contemplou as neoplasias com o percentual entre 15 e 30%. Já as neoplasias de pior prognóstico, ou seja, alto índice proliferativo, foram aquelas neoplasias com percentual maior que 30%.

5.6.4 p53

Para a determinação da marcação do p53 foram avaliadas a quantidade e intensidade de marcações nucleares das células neoplásicas e foi atribuído uma

classificação da marcação. Foram consideradas negativas as amostras sem nenhum tipo de marcação. As neoplasias com baixa marcação incluíram as amostras com baixa intensidade de marcação ou marcação em menos de 50% da lâmina. Amostras consideradas positivas incluíram amostras com marcação em mais de 50% da lâmina. As amostras consideradas com mutação ou superexpressão do p53 incluíram as amostras com marcações intensas em mais de 50% ou com marcações intracitoplasmáticas.

5.7 Avaliação epigenética

As amostras foram submetidas à extração do RNA total, conforme descrito a seguir. Após extração e determinação de pureza do material obtido, as amostras foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) para posterior quantificação da expressão relativa dos miRs por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

5.7.1 Extração de ácido ribonucleico (RNA) total do tecido

Para determinação da expressão do miRs, o RNA total do tecido tumoral foi isolado após lise celular em 0,5 ml do reagente TRIzol®, seguido de separação da fase aquosa pela adição de 0,2 ml de clorofórmio e centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Em seguida, a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) em tubos novos devidamente identificados e a precipitação do RNA total foi realizada com adição de 0,5 ml de isopropanol absoluto gelado. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente (10 minutos) e o RNA precipitado por centrifugação a 14.000 rpm por 15 min a 4°C. Em seguida, o RNA precipitado (pellet) foi lavado com etanol 75% em água DEPC gelada e ressuspenso em 50 µL de água DEPC e armazenado a -80°C. A quantidade e a pureza do RNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

5.7.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado a partir da transcrição reversa de 2000 ng de RNA total, na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em uma reação com volume final de 20 µl contendo 500 mM de dNTP, 25 mg/ml de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 mM de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. Em seguida, a reação de síntese de cDNA aconteceu por 50 minutos a 50°C, seguida por 5 minutos a 85°C. Após o término, o cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

5.7.3 Quantificação da expressão relativa dos miRs por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

A expressão relativa dos miRs foi determinada em reações com volume final de 10 µL contendo 1 µL do cDNA sintetizado (50 ng), 5 µL de SYBR Green I Master (LightCycler® 480, Roche Applied Science) e 1 µL contendo 8 pmoles dos iniciadores específicos para miR 16 (F – 5' TAGCAGCACGTAAATATTG 3' e R – 5' TTCAGCAGCACAGTTAATACTGGA 3'), miR 18a (F – 5' GTGCTTTTTGTTCTAAGGTGCA 3' e R – 5' ACATAACTTCTTATGCCAGAAGG 3'), miR 18b (F – 5' CCTGTGTTAAGGTGCATCT 3' e R – 5' CCTGTGCCGGAAGGGGCATTTA 3'), miR 21 (F – 5' TAGCTTATCAGACTGATGTT 3' e R – 5' GACAGCCCATCGACTGCTGTTGC 3') e miR 143 (F – 5' GGTGCAGTGCTGCATCTCTG 3' e R – 5' GAGCTACAGTGCTTCAT 3') e q.s.q. de água *Milli-Q Rnase free*. Como normalizadores foram utilizados os genes RNU6 (F – 5' GTGCTCAGTTTAGTAGTGCATC 3' e R – 5' AAAAGTATGAAACTTTATGAATTC 3'). A determinação da quantidade relativa dos transcritos ocorreu por meio do método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$.

5.8 Análise estatística

A análise de significância estatística para avaliar as quantificações dos biomarcadores mensurados com as classificações clínicas, histológicas e fenotípicas

da neoplasia mamária foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 10.0 (www.graphpad.com) por meio dos testes estatísticos de Brown-Forsythe (ANOVA), com distribuição normal avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e/ou Kolmogorov-Smirnov e nível de significância mínimo de $p < 0,05$. Para os dados sem normalidade, foi realizado o teste de Kruskal Wallis, seguido de teste de post hoc de Dunn para avaliar a significância entre os grupos com significância mínima de $p < 0,05$.

As associações entre variáveis categóricas foram realizadas pelo teste exato de Fisher com significância mínima de $p < 0,05$.

Para avaliar o grau de associação linear entre as variáveis quantitativas e ordinais, foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman. A análise estatística e a confecção dos gráficos foram realizadas utilizando a linguagem de programação estatística R (versão 4.5.1) e a linguagem Python (versão 3.11). A visualização dessas associações foi realizada por meio de matrizes de correlação coloridas (correlogramas) utilizando o pacote corrplot. Para variáveis com dados incompletos da população, os dados ausentes foram tratados por pairwise, permitindo a inclusão de todos os indivíduos nas análises multivariadas.

6. RESULTADOS

6.1 Amostragem

Foram coletadas ao total amostras de 45 cadelas com suspeita de neoplasia mamária. As amostras foram catalogadas e enviadas para a triagem histopatológica. Foram descartadas amostras de cadelas com neoplasias malignas mioepiteliais (mioepiteliomas malignos (8)), mesenquimais (condrossarcomas (1)) e epiteliais com características distintas à morfologia tubular (carcinomas inflamatórios (1) e carcinomas de células escamosas (1)), neoplasias epiteliais benignas (adenomas mamários (1) e papilomas ductais (1)) e cadelas com alteração em tecido mamário de origem não neoplásica (hematomas (1), ectasias ductais (1), cistos adenoides (1) e hiperplasias mamárias(1)). Também foram descartadas amostras nas quais o linfonodo coletado não continha material suficiente para análise precisa da malignidade (3). Após a realização da triagem histológica do tecido mamário e do linfonodo, foram inclusas no N amostral 25 amostras. Os dados apresentados a seguir já contemplam a amostragem com a exclusão desses pacientes.

6.2 População incluída na pesquisa

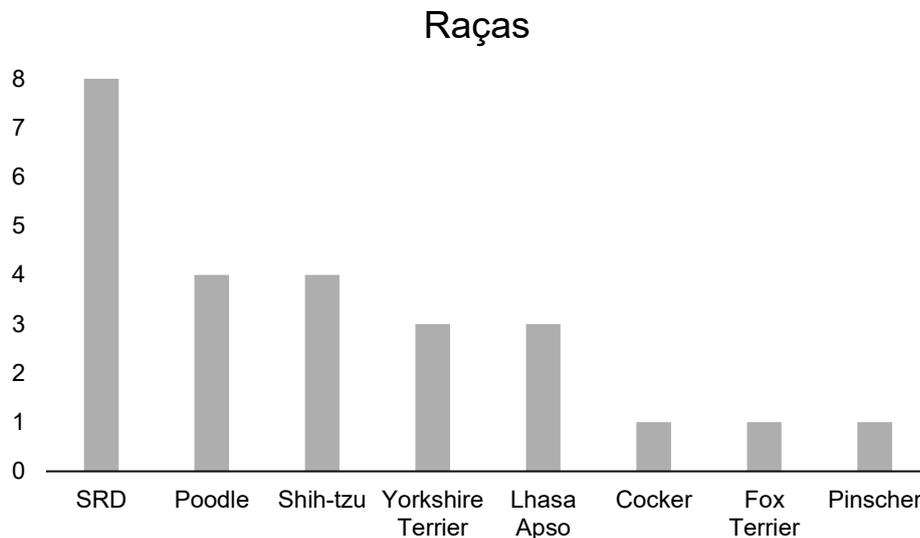
A amostragem incluiu um padrão diversificado de pacientes. A Figura 1 contempla as raças incluídas na amostragem. As cadelas SRD (Sem Raça Definida) foram as que mais representaram a amostra (8), seguidas por cadelas das raças Poodle (4), Shih Tzu (4), Lhasa Apso (3) e Yorkshire Terrier (3). Outras raças contempladas com apenas 1 representante incluíram Cocker, Fox Terrier e Pinscher. Os dados clínicos e de resenha das pacientes são apresentados na TABELA 5.

TABELA 5. Dados clínicos e de resenha das pacientes incluídas na amostragem atendidas no hospital público de Santo André no período de junho de 2024 a janeiro de 2025. N=25.

ID	Tipo histológico	Raça	Idade	Peso	Inteira	Evolução	Mama	Tamanho	Linfonodo	Metástase
1	Carcinoma cístico-papilífero	SRD	3	12	Não	-	M5	6	-	-
2	Carcinoma complexo	Shih Tzu	9	6	Sim	5	M4	1	-	-
3	Carcinoma complexo	Poodle	16	14	Sim	24	M4	3	-	-
4	Carcinoma complexo	Poodle	9	3,9	Sim	6	M2	4	-	-
5	Carcinoma complexo	Lhasa Apso	14	5,6	Sim	24	M4	4	-	-
6	Carcinoma micropapilífero	Lhasa Apso	12	7	Não	4	M5	4	Sim	-
7	Carcinoma misto	Pinscher	5	2,3	Sim	3	M1	2	-	-
8	Carcinoma misto	SRD	13	11,4	Não	2	M5	6	-	-
9	Carcinoma misto	Shih Tzu	9	6,2	Sim	5	M4	2	-	-
10	Carcinoma misto	Shih Tzu	8	5	Sim	12	M5	4	-	-
11	Carcinoma misto	Fox Terrier	8	7,2	Sim	8	M4	7	-	-
12	Carcinoma papilífero	SRD	12	20	Sim	5	M2	8	-	-
13	Carcinoma papilífero	SRD	13	18,5	Não	-	M3	3	-	-
14	Carcinoma papilífero	Poodle	9	4,9	Sim	2	M4	3	-	-
15	Carcinoma papilífero	Poodle	8	4	Sim	-	M5	5	-	-
16	Carcinoma sólido	SRD	14	9,6	Sim	-	M4	4	-	-
17	Carcinoma tubular	SRD	11	3	Sim	12	M4	4	-	-
18	Carcinoma tubular	Shih Tzu	10	9,3	Sim	12	M4	10	-	-
19	Carcinoma tubular	Cocker	15	7	Sim	-	M4	6	-	-
20	Carcinoma tubular	Yorkshire	11	4	Sim	2	M4	3	-	-
21	Carcinoma tubular	Yorkshire	12	3	Sim	24	M5	4	-	-
22	Carcinoma tubulopapilífero	SRD	11	6,95	Sim	-	M5	3	-	-
23	Carcinoma tubulopapilífero	SRD	10	10	Não	14	M2	9	-	-
24	Carcinoma tubulopapilífero	Yorkshire	12	3,7	Não	2	M5	7	-	-
25	Carcinoma tubulopapilífero	Lhasa apso	10	4,5	Sim	-	M5	1	-	-

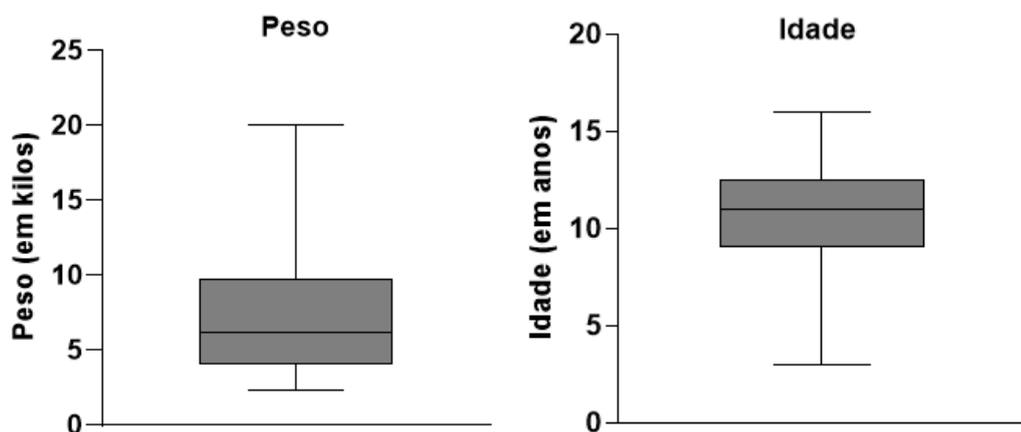
Legenda: Idade em anos. Peso em Kg. Evolução em meses. Tamanho do nódulo no maior eixo em cm. Linfonodo com presença de metástase.

Figura 1. Distribuição racial das portadoras de carcinoma mamário do hospital público de Santo André no período de junho de 2024 a janeiro de 2025. N=25.



A idade da população inclusa variou de 3 até 16 anos de idade, obtendo média de $10,56 \pm 2,97$ anos de idade. O peso da população variou de 2,3 a 20 kg, com média de $7,56 \pm 4,64$ kg (Figura 2). Não foram identificados pacientes *outliers* em ambas as variáveis pelo método de ROUT e Grubbs ($\alpha = 0,05$).

Figura 2. Peso (em quilogramas) e idade (em anos) da população inclusa na amostragem.



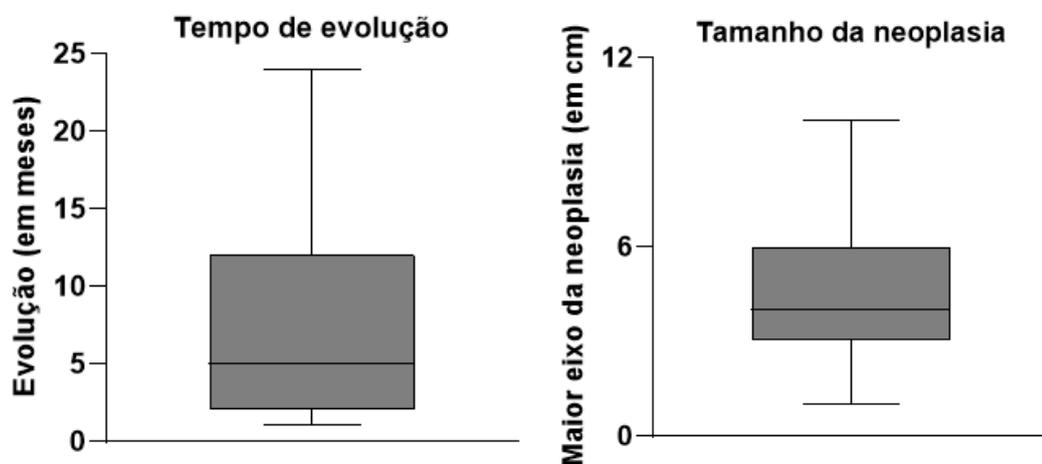
O estudo incluiu cadelas com diferentes *status* do sistema reprodutor. Das 25 cadelas inclusas na amostragem, 19 apresentavam o sistema reprodutor em sua totalidade (76%), não tendo sido submetidas a qualquer cirurgia de esterilização durante sua vida. Em contrapartida, 6 cadelas já era esterilizadas no dia da

intervenção cirúrgica (24%). A esterilização dessas pacientes ocorreu em diferentes fases da vida, de acordo com as informações obtidas na anamnese. Não foi estabelecido nenhum tipo de correlação entre o *status* reprodutor e as variáveis clínicas, histológicas, fenotípicas e epigenéticas.

6.3 Dados clínicos da neoplasia

As neoplasias foram avaliadas em sua singularidade. Das 25 neoplasias, 14 foram localizadas na cadeia mamária esquerda e 11 na cadeia mamária direita. As mamas mais acometidas foram as mamas abdominais caudais ou M4 (11 casos) e as mamas inguinais ou M5 (9 casos). As demais mamas (torácica cranial, torácica caudal e abdominal cranial) constituíram a minoria dos casos (5 casos ao total). O tempo de evolução variou de 1 a 24 meses, com média de $8,71 \pm 7,88$ meses. A neoplasia foi mensurada em seu maior eixo e o resultado foi determinante para a classificação clínica a seguir. O tamanho do maior eixo de cada neoplasia variou de 1 a 10 centímetros, com média de $4,52 \pm 2,34$ centímetros. Não foram identificados pacientes *outliers* em ambas as variáveis pelo método de ROUT e Grubbs ($\alpha = 0,05$). A Figura 3 apresenta os dados epidemiológicos das neoplasias incluídas na pesquisa.

Figura 3. Tempo de evolução (em meses) e maior eixo mensurável da neoplasia (em centímetros).



6.4 Avaliação histopatológica e classificação clínica pelo sistema TNM

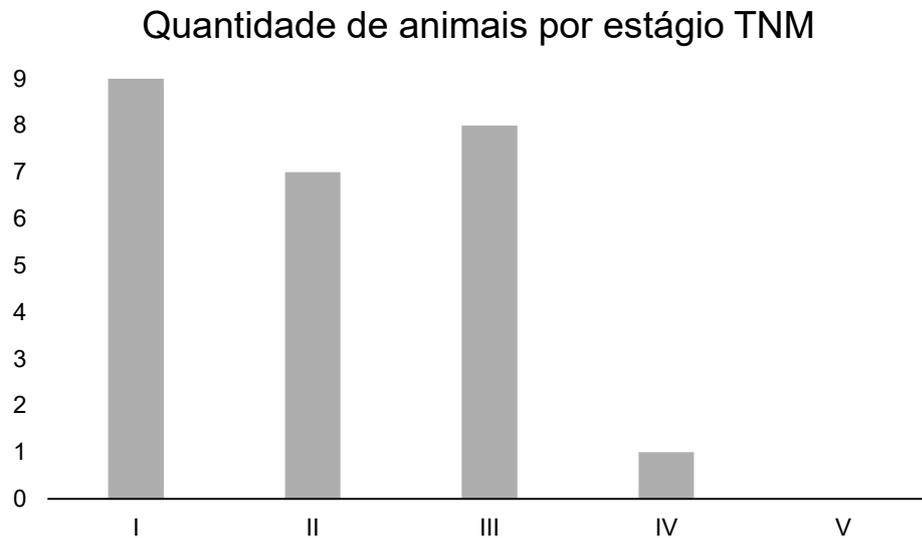
A avaliação histopatológica revelou heterogeneidade morfológica entre os carcinomas, com predominância dos carcinomas mistos (20%) e tubulares (20%). Os carcinomas complexos, tubulopapilífero e papilíferos também tiveram representatividade na amostragem (16% cada). Os carcinomas micropapilífero, cístico-papilífero e sólido apresentaram menor ocorrência, cada um correspondendo a 4% da amostra (TABELA 6).

TABELA 6. Frequência dos tipos histopatológicos observados nas neoplasias mamárias caninas observadas.

Classificação histopatológica	Frequência (n)	Percentual (%)
Carcinoma misto	5	20
Carcinoma tubular	5	20
Carcinoma tubulopapilífero	4	16
Carcinoma complexo	4	16
Carcinoma papilífero	4	16
Carcinoma micropapilífero	1	4
Carcinoma sólido	1	4
Carcinoma cístico-papilífero	1	4
Total	25	100

Os linfonodos também foram submetidos a avaliação histopatológica. Foram identificadas metástases em 5 linfonodos, contudo 4 dessas metástases pertenciam a neoplasias que foram descartadas na amostragem (4 de mioepitelioma maligno e uma de condrossarcoma). Portanto, das amostras incluídas na pesquisa, apenas 1 linfonodo revelou presença de metástase. Após essa avaliação, foi permitida a classificação das pacientes pelo sistema TNM, conforme demonstrado na Figura 4. No estágio I (T₁N₀M₀) foram incluídas 9 representantes; no estágio II (T₂N₀M₀) foram incluídas 7 representantes; e no estágio III (T₃N₀M₀) foram incluídas 8 representantes. Como somente uma amostra foi positiva para linfonodo com metástase regional, apenas uma cadela foi incluída no estágio IV (T_xN₁M₀). Nenhuma cadela restante, após a triagem dos carcinomas, apresentou metástase a distância, portanto, o estágio V (T_xN_xM₁) não apresentou representante.

Figura 4. Frequência dos diferentes estágios do sistema TNM observados nas cadelas incluídas na pesquisa.



6.5 Avaliação histopatológica de grau de malignidade

A graduação histológica das formações seguiu os critérios de Peña e colaboradores (2014), considerando os parâmetros de diferenciação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico, sendo possível a neoplasia ser classificada em grau I de malignidade (bem diferenciada), grau II de malignidade (moderadamente diferenciada) e grau III de malignidade (pouco diferenciada). A análise histopatológica foi realizada por dois patologistas independentes e eventuais discordâncias foram reanalisadas até a obtenção de um consenso. Na TABELA 7, as neoplasias são apresentadas de acordo com as pontuações de seus escores para cada critério estabelecido, bem como com o somatório dos critérios, atribuindo-se, assim, a classificação nos grupos histológicos de acordo com o grau de malignidade.

TABELA 7. Apresentação das pontuações dos critérios estabelecidos por Peña e colaboradores (2014) para os graus de malignidade, somatório de escores e classificação nos grupos.

ID	Classificação histológica	DT	PN	IM	Escore	Grau
1	Carcinoma cístico-papilífero	2	2	1	5	I
2	Carcinoma complexo	3	2	2	7	II
3	Carcinoma complexo	1	1	1	3	I
4	Carcinoma complexo	2	2	1	5	I
5	Carcinoma complexo	2	2	1	5	I
6	Carcinoma micropapilífero	3	2	3	8	III
7	Carcinoma misto	3	1	1	5	I
8	Carcinoma misto	1	1	2	4	I
9	Carcinoma misto	2	2	1	5	I
10	Carcinoma misto	3	1	1	5	I
11	Carcinoma misto	1	2	2	5	I
12	Carcinoma papilífero	3	2	3	8	III
13	Carcinoma papilífero	3	1	2	6	II
14	Carcinoma papilífero	2	2	2	6	II
15	Carcinoma papilífero	1	1	1	3	I
16	Carcinoma sólido	3	3	3	9	III
17	Carcinoma tubular	2	2	2	6	II
18	Carcinoma tubular	2	3	3	8	III
19	Carcinoma tubular	2	2	2	6	II
20	Carcinoma tubular	2	2	3	7	II
21	Carcinoma tubular	2	2	2	6	II
22	Carcinoma tubulopapilífero	3	2	3	8	III
23	Carcinoma tubulopapilífero	3	2	1	6	II
24	Carcinoma tubulopapilífero	2	2	1	5	I
25	Carcinoma tubulopapilífero	3	1	3	7	II

Legenda: DP: diferenciação tubular, PN: pleomorfismo nuclear, IM: índice mitótico.

A maior parte das neoplasias do estudo foram classificadas como grau I de malignidade representando 44% da amostragem (Figura 5), seguido das neoplasias classificadas como grau II com 36% da amostragem (Figura 6). As neoplasias de pior prognóstico, ou seja, aquelas classificadas como grau III de malignidade corresponderam a 20% da amostragem (Figura 7). As representações são apresentadas na TABELA 8.

Figura 5. Neoplasias classificadas como grau I de malignidade. Nota-se preservação significativa das estruturas tubulares, baixo pleomorfismo nuclear e baixo índice mitótico. (A) Carcinoma misto ID 11 (nota-se presença do componente epitelial maligno (→) associado ao componente mesenquimal benigno (→), aumento de 10x). (B) Carcinoma complexo ID 4 (nota-se proliferação epitelial tubular associada a proliferação mioepitelial (→), aumento de 40x). (C) Carcinoma misto ID 9 (nota-se componente epitelial maligno (→) associado a área desmoplásica (→), aumento de 40x). (D) Carcinoma tubulopapilífero ID 24 (nota-se presença de disposição tubular associada a arranjos papilares (→), aumento de 40x). Coloração hematoxilina e eosina.

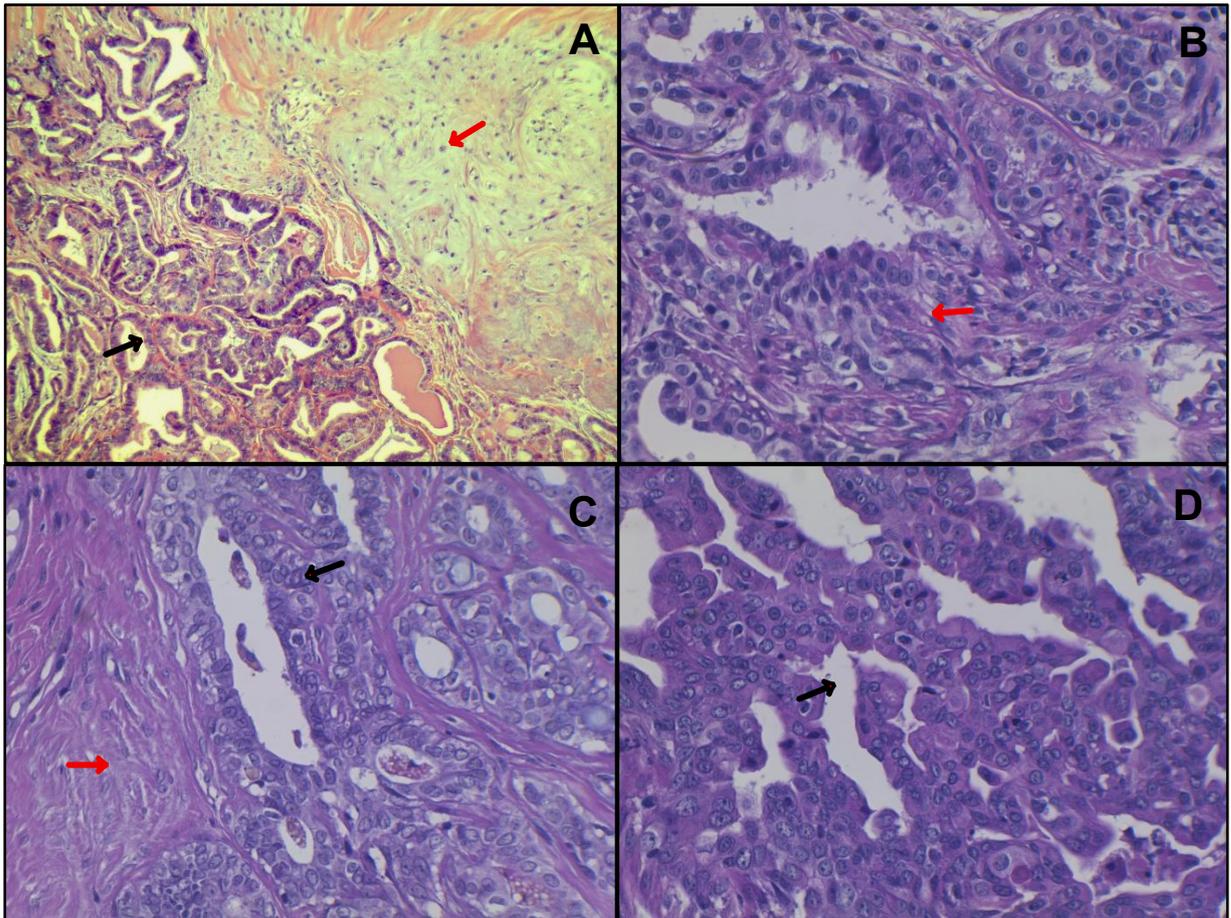


Figura 6. Neoplasias classificadas como grau II de malignidade. Diminuição acentuada da proporção de ácinos e túbulos, moderado pleomorfismo nuclear e índice mitótico intermediário. (A) Carcinoma tubular ID 20 (nota-se elevada densidade nuclear, aumento de 40x). (B) Carcinoma tubulopapilífero ID 25 (nota-se anisocariose (→), aumento de 40x). (C) Carcinoma complexo ID 2 (nota-se presença de componente mioepitelial (→), aumento de 40x). (D) Carcinoma tubular ID 21 (nota-se elevada densidade tubular, aumento de 40x). Coloração hematoxilina e eosina.

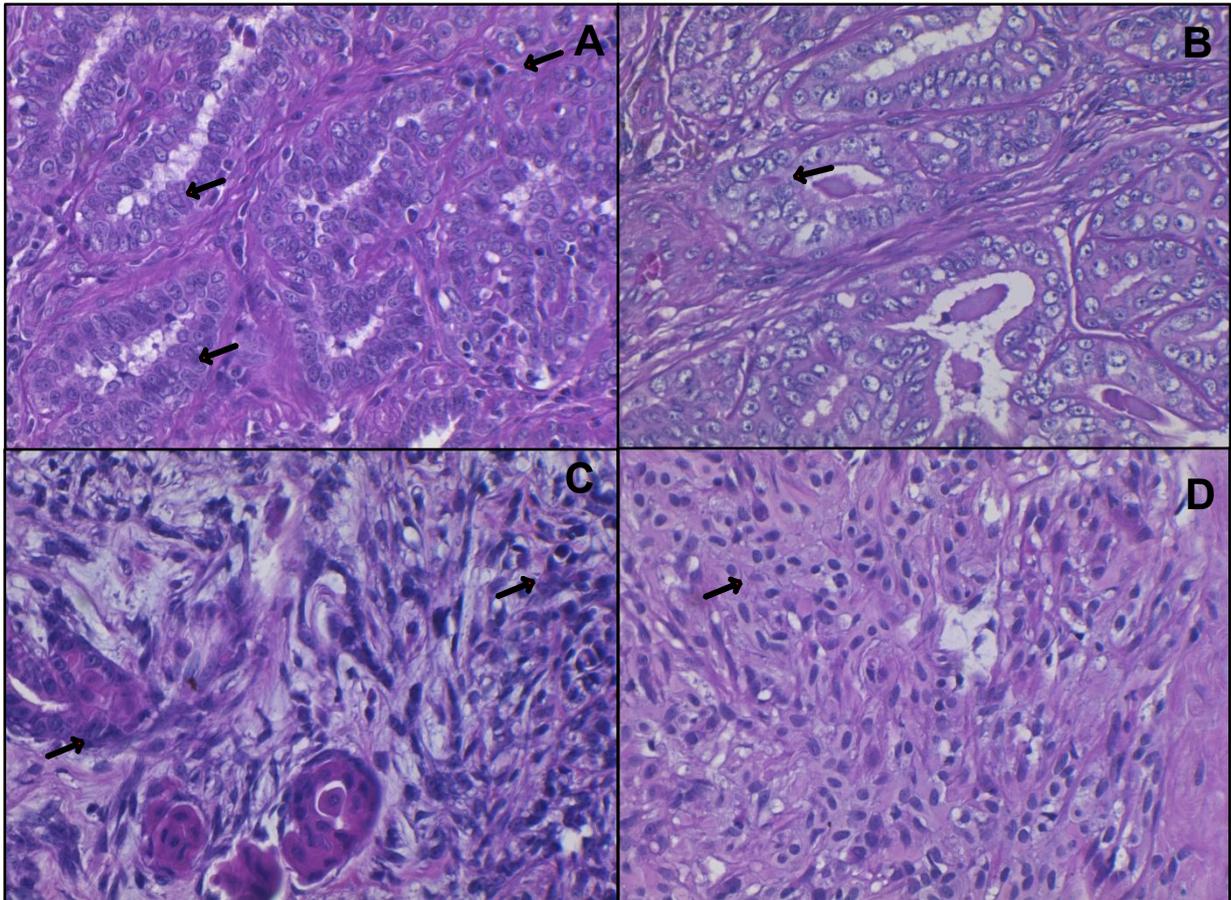


Figura 7. Neoplasias classificadas como grau III de malignidade. Perda quase total da disposição tecidual em ácinos ou túbulos, alto pleomorfismo nuclear e elevado índice mitótico. (A) Carcinoma micropapilífero ID 6 (nota-se disposição micropapilar, com núcleos dotados de cromatina frouxa e nucléolos evidentes (→), aumento de 40x). (B) Carcinoma sólido ID 16 (nota-se o predomínio de blocos de células epiteliais, aumento de 40x). (C) Carcinoma tubulopapilífero ID 22 (nota-se distorção luminal e anisocariose (→), aumento de 40x). (D) Carcinoma papilífero ID 12 (nota-se perda da disposição papilar e pleomorfismo nuclear acentuado, aumento de 40x). Coloração hematoxilina e eosina.

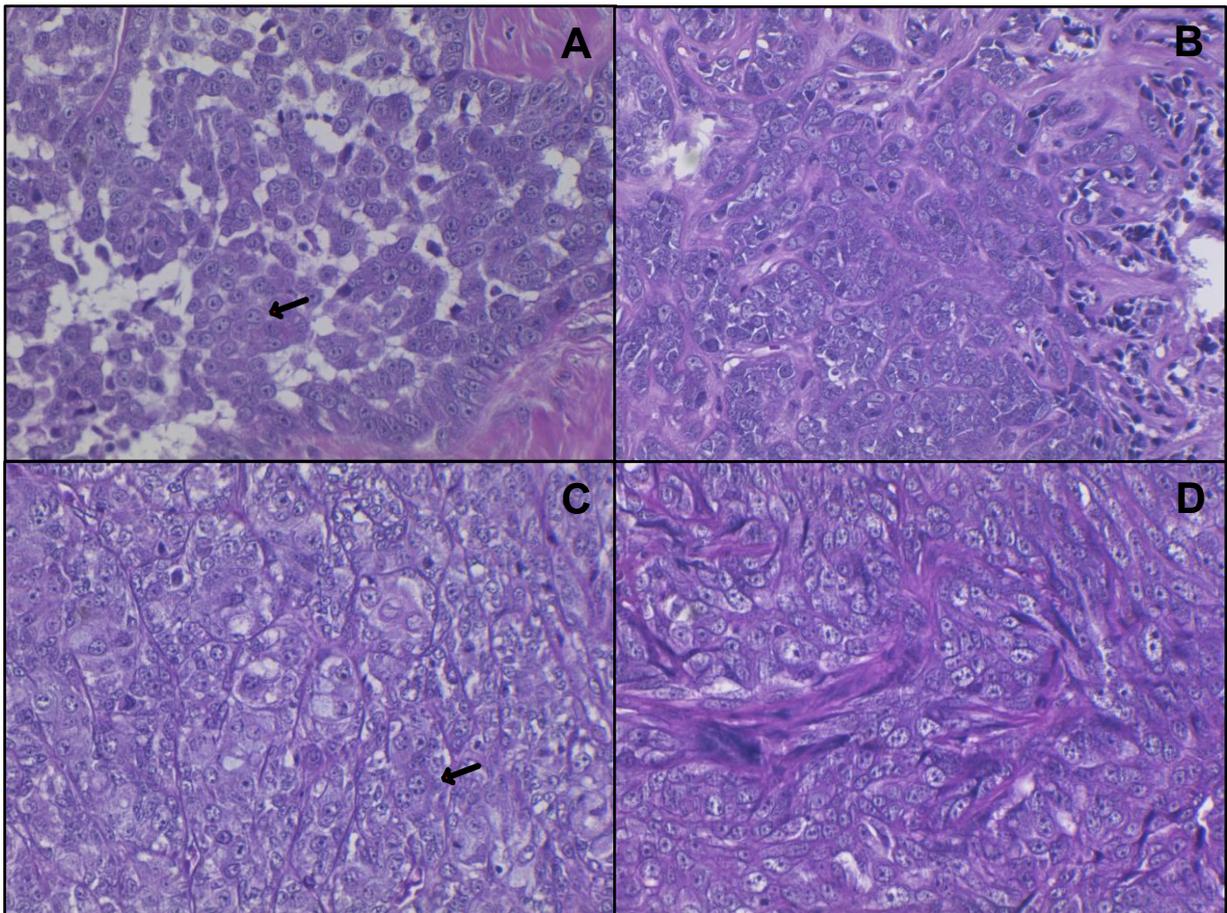


TABELA 8. Frequência dos graus de malignidade pelos critérios estabelecidos por Peña e colaboradores (2013) determinados nas neoplasias mamárias caninas observadas.

Grau histológico	Frequência (n)	Porcentagem (%)
Grau I (bem diferenciado)	11	44
Grau II (moderadamente diferenciado)	9	36
Grau III (pouco diferenciado)	5	20
Total	25	100

A TABELA 9 contempla as frequências dos tipos histológicos associados aos graus de malignidade que foram estabelecidos após a classificação. Foi verificada associação estatisticamente significativa entre os tipos histológicos e os graus de malignidade, por realização do teste de Fisher com valor de $p = 0,0185$. Observa-se que os carcinomas mistos se concentram predominantemente no grau I e os carcinomas tubulares quase predominam no grau II. O grupo III compreende o grupo mais heterogêneo, incluindo a penas uma neoplasia dos tipos tubulopapilífero, tubular, papilífero, micropapilífero e sólido.

TABELA 9. Frequência dos tipos histopatológicos associados aos graus de malignidade estabelecidos pelos critérios de Peña e colaboradores (2013).

Classificação histopatológica	Grau I	Grau II	Grau III
Carcinoma misto	5	0	0
Carcinoma tubular	0	4	1
Carcinoma tubulopapilífero	1	2	1
Carcinoma complexo	3	1	0
Carcinoma papilífero	1	2	1
Carcinoma micropapilífero	0	0	1
Carcinoma sólido	0	0	1
Carcinoma cístico-papilífero	1	0	0
Total	11	9	5

6.6 Avaliação imuno-histoquímica

As amostras foram classificadas de acordo com a reação aos marcadores descritos da pesquisa. Cada marcador testado está representado individualmente, na TABELA 10 e os resultados serão discutidos a seguir.

TABELA 10. Escore e resultado da marcação imuno-histoquímica das neoplasias incluídas na pesquisa.

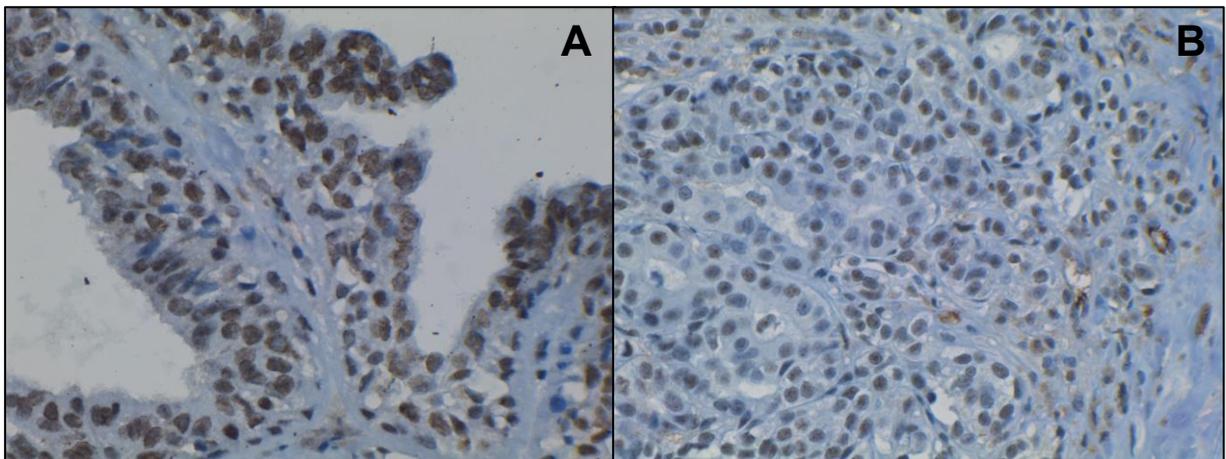
ID	Tipo histológico	Escore RP	RP	Escore ERα	ERα	Escore H	HER-2	Escore E.	E-caderina	ki67	p53
1	Carcinoma cístico-papilífero	+8	Positivo	+6	Positivo	+2	Positivo	+2	Moderada	26%	N
2	Carcinoma complexo	+7	Positivo	0	Negativo	+1	Negativo	+2	Moderada	40%	F
3	Carcinoma complexo	+2	Negativo	+5	Positivo	+2	Positivo	+2	Moderada	13%	P
4	Carcinoma complexo	+6	Positivo	+5	Positivo	0	Negativo	+3	Alta	-	N
5	Carcinoma complexo	+4	Positivo	+3	Positivo	+3	Positivo	+1	Baixa	33%	F
6	Carcinoma micropapilífero	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	+2	Moderada	-	F
7	Carcinoma misto	+7	Positivo	+5	Positivo	+3	Positivo	+3	Alta	21%	*
8	Carcinoma misto	0	Negativo	0	Negativo	+2	Positivo	+2	Moderada	-	F
9	Carcinoma misto	+2	Negativo	+3	Positivo	+1	Negativo	+2	Moderada	-	N
10	Carcinoma misto	+6	Positivo	+2	Negativo	0	Negativo	+2	Moderada	15%	N
11	Carcinoma misto	+7	Positivo	+6	Positivo	+2	Positivo	+3	Alta	13%	F
12	Carcinoma papilífero	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Ausente	27%	N
13	Carcinoma papilífero	0	Negativo	+2	Negativo	0	Negativo	+2	Moderada	-	N
14	Carcinoma papilífero	0	Negativo	0	Negativo	+1	Negativo	+1	Baixa	-	N
15	Carcinoma papilífero	+8	Positivo	+6	Positivo	+2	Positivo	+3	Alta	13%	N
16	Carcinoma sólido	0	Negativo	0	Negativo	+1	Negativo	+1	Baixa	-	N
17	Carcinoma tubular	+2	Negativo	0	Negativo	+2	Positivo	+2	Moderada	-	N
18	Carcinoma tubular	+2	Negativo	0	Negativo	+2	Positivo	+1	Baixa	35%	N
19	Carcinoma tubular	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	+1	Baixa	-	F
20	Carcinoma tubular	0	Negativo	+4	Positivo	+2	Positivo	+2	Moderada	-	F
21	Carcinoma tubular	+6	Positivo	+5	Positivo	+2	Positivo	+2	Moderada	4%	P
22	Carcinoma tubulopapilífero	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	+2	Moderada	-	F
23	Carcinoma tubulopapilífero	+3	Positivo	0	Negativo	+3	Positivo	+2	Moderada	28%	*
24	Carcinoma tubulopapilífero	+4	Positivo	0	Negativo	0	Negativo	+2	Moderada	14%	P
25	Carcinoma tubulopapilífero	+2	Negativo	+4	Positivo	+1	Negativo	+3	Alta	24%	0

Legenda: H: HER-2. E: E-caderina. Legenda da marcação p53: N = negativa. F = fraca. 2 = Positiva. * = superexpresso.

6.6.1 Expressão de RP

A expressão do receptor de progesterona foi verificada em 11 amostras e negativada em 14 amostras. A TABELA 10 apresenta a positividade ou negatividade do receptor nas neoplasias e o escore associado à condição. Na Figura 8 são apresentados exemplos de amostras com as marcações realizadas por imunohistoquímica.

Figura 8. Fotomicrografia de corte histológico de mama evidenciando imunomarcção para o receptor de progesterona. (A) Carcinoma papilífero, escore + 8, (B) Carcinoma complexo, escore +7. DAB/Hematoxilina de Harris. Aumento de 400X.



A TABELA 11 apresenta os dados contingenciados da presença da marcação de RP com o grau de malignidade. Observou-se significância estatística entre os grupos realizado pelo teste exato de Fisher, com valor de $p = 0,0164$. Nota-se maior positividade do receptor nas neoplasias bem diferenciadas, em contrapartida da negatividade das neoplasias de comportamento mais agressivo.

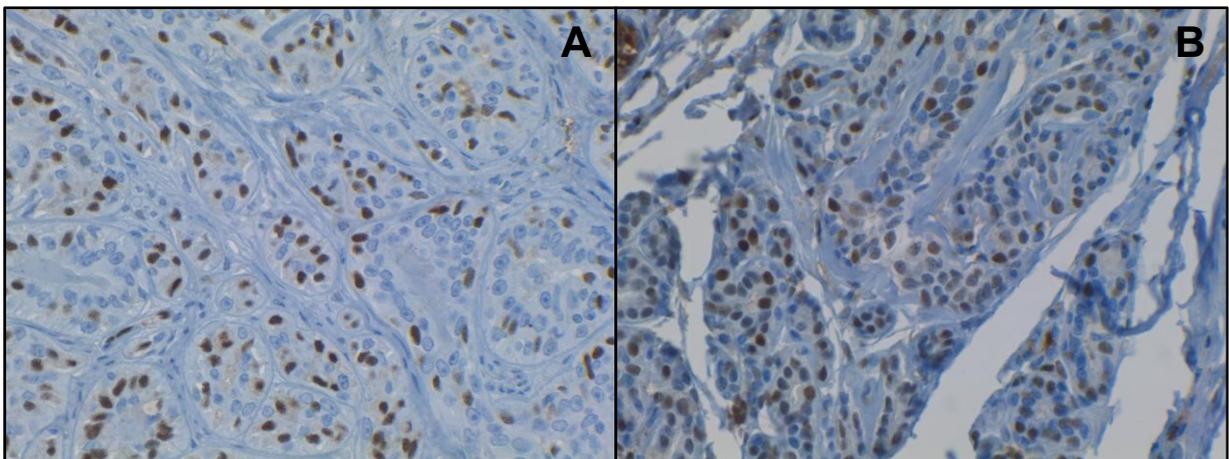
TABELA 11. Contingência da positividade ou negatividade de RP associada ao grau de malignidade das neoplasias.

Grau de malignidade	Positivo	Negativo
Bem diferenciado (I)	8	3
Moderadamente diferenciado (II)	3	6
Pouco diferenciado (III)	0	5

6.6.2 Expressão de ER α

A expressão de ER α foi detectada em 11 amostras e negatizada em 14 amostras. A TABELA 10 apresenta a positividade/negatividade das neoplasias ao receptor e o escore associado. Na figura 9 são apresentados exemplos de marcações positivadas e negativas na imuno-histoquímica realizada.

Figura 9. Fotomicrografia de corte histológico de mama evidenciando imunomarcção para ER α . (A) Carcinoma tubulopapilífero, escore +4, (B) Carcinoma complexo, escore +5. DAB/Hematoxilina de Harris. Aumento de 400X.



A TABELA 12 apresenta os dados da presença da expressão imuno-histoquímica de ER α com o grau de malignidade. Observou-se significância estatística entre os grupos segundo teste de exato de Fisher, com valor de $p = 0,0164$. Observamos correlação negativa entre a marcação de ER α e o grau histológico, no qual a expressão do receptor é menor nas neoplasias mais agressivas (Teste de Spearman, $r = -0,57$, $p = 0,0032$).

TABELA 12. Contingência da positividade ou negatividade da expressão imuno-histoquímica de ER α associada ao grau de diferenciação das neoplasias.

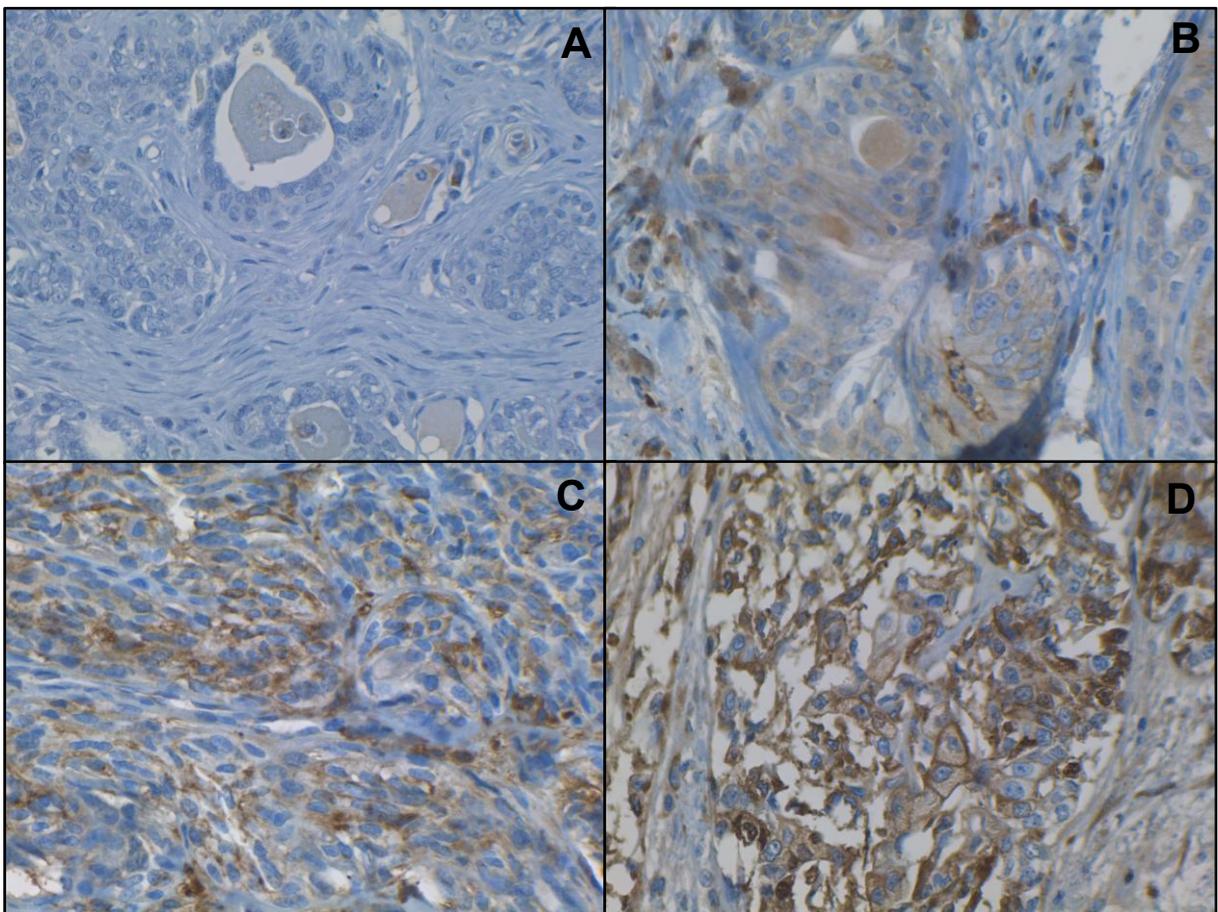
Grau de malignidade	Positivo	Negativo
Bem diferenciado (I)	8	3
Moderadamente diferenciado (II)	3	6
Pouco diferenciado (III)	0	5

Embora a contagem total das neoplasias positivas pra ER α seja a mesma encontrada para RP, algumas neoplasias eram positivas pra somente um dos receptores e negativa para o outro. Contudo, nas neoplasias do grau III, ambos receptores não foram detectados por marcação imuno-histoquímica.

6.6.3 Expressão de HER-2

A superexpressão do HER-2 foi considerada positiva em 12 neoplasias e negativa em 13 neoplasias. A TABELA 10 apresenta a positividade/negatividade das neoplasias ao HER-2 e o respectivo escore associado. Na Figura 10 são apresentados exemplos de marcações positivas e negativas na imuno-histoquímica realizada.

Figura 10. Fotomicrografia de corte histológico de mama evidenciando imunomarcção para HER-2. (A) Carcinoma tubulopapilífero considerado negativo, escore 0, (B) Carcinoma císticopapilífero, escore +2, (C) Carcinoma complexo, escore +2, (D) Carcinoma tubulopapilífero, escore +3. DAB/Hematoxilina de Harris. Aumento de 400X.



A TABELA 13 apresenta os dados da presença da marcação imunohistoquímica de HER-2 com o grau de diferenciação da neoplasia. Não há diferença significativamente estatística entre os grupos segundo teste exato de Fisher, com valor de $p = 0,3470$.

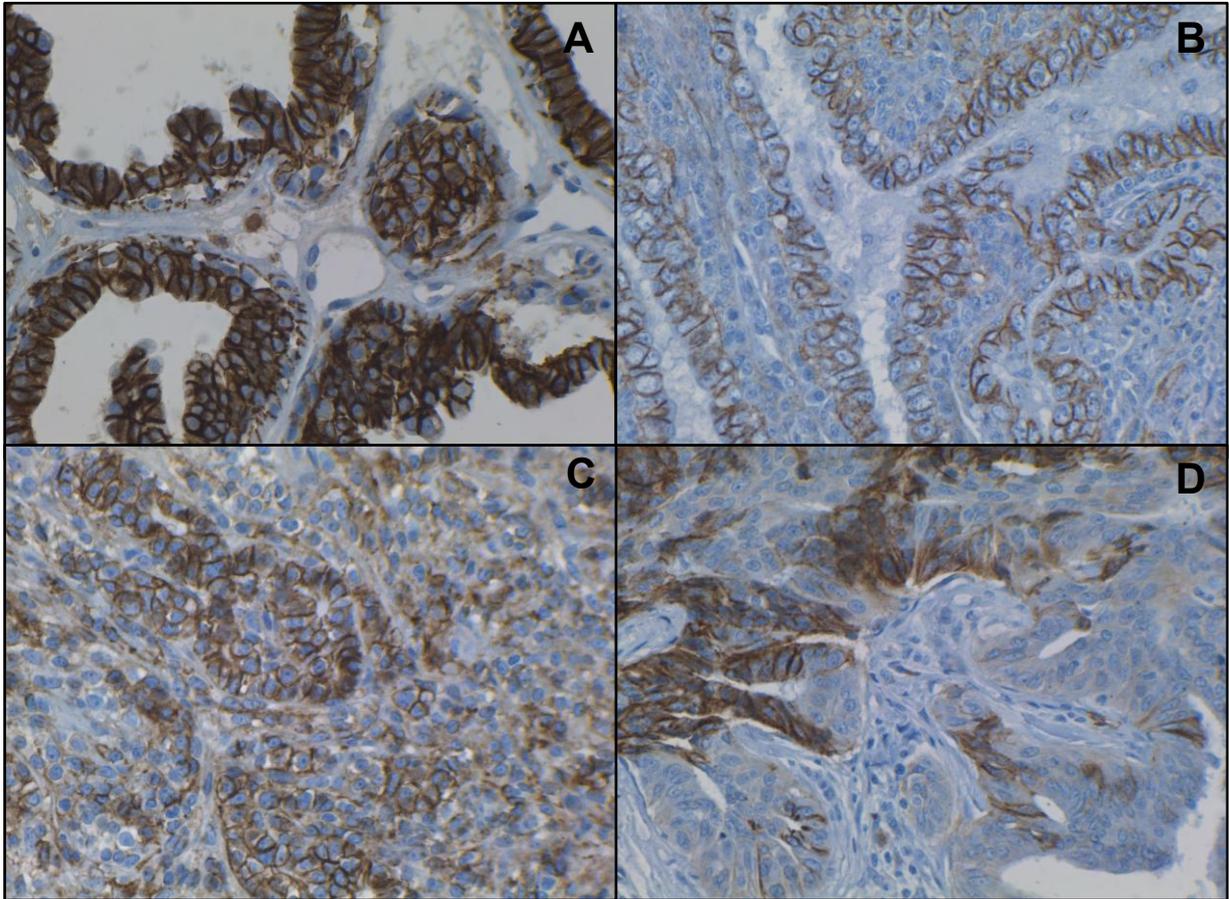
TABELA 13. Frequência da positividade ou negatividade do receptor de HER-2 associada ao grau de diferenciação das neoplasias.

Grau de malignidade	Positivo	Negativo
Bem diferenciado (I)	7	4
Moderadamente diferenciado (II)	4	5
Pouco diferenciado (III)	1	4

6.6.4 Expressão de e-caderina

A expressão de e-caderina foi determinada nas 25 amostras. Apenas uma amostra foi considerada negativa, 5 amostras apresentaram baixa expressão do marcador, 14 amostras apresentam expressão moderada e 5 amostras apresentaram alta expressão. A TABELA 10 apresenta a variação da expressão da e-caderina de acordo com as neoplasias pesquisadas e a Figura 11 exemplifica os diferentes tipos de expressão considerados nessa pesquisa.

Figura 11. Fotomicrografia de corte histológico de mama evidenciando imunomarcção intercelular para e-caderina. (A) Carcinoma papilífero, escore +3, (B) Carcinoma tubulopapilífero, escore +2, (C) Carcinoma complexo, escore +2, (D) Carcinoma papilífero, escore +1. DAB/Hematoxilina de Harris. Aumento de 400X.



Não foram observadas associações com resultado estatístico significativo entre as marcações de e-caderina e os graus de diferenciação e fenótipos, determinados pelo teste exato de Fisher, com valor de $p = 0,2486$ e $p = 0,3655$ respectivamente, contudo, foi observada correlação negativa entre a expressão de e-caderina e os graus de malignidade (Teste de Spearman, $r = -0,5$, $p = 0,0109$) e a expressão de e-caderina e os fenótipos (Teste de Spearman, $r = -0,56$, $p = 0,0037$). A contingência histológica é demonstrada na TABELA 14 e fenotípica na TABELA 15.

TABELA 14. Frequência da marcação de e-caderina associada ao grau de diferenciação das neoplasias.

Grau de malignidade	Negativo	Baixa	Moderada	Alta
Bem diferenciado (I)	0	1	6	4
Moderadamente diferenciado (II)	0	2	6	1
Pouco diferenciado (III)	1	2	2	0

TABELA 15. Frequência da marcação de e-caderina associada ao fenótipo das neoplasias.

Fenótipo	Negativo	Baixa	Moderada	Alta
Luminal A	0	0	4	2
Luminal B	0	1	5	3
HER-2 superexpresso	0	1	2	0
Triplo negativo	1	3	3	0

A e-caderina foi avaliada em associação com a expressão de ER α e os resultados são apresentados na TABELA 16. Há diferença significativa determinada pelo teste exato de Fisher com valor de $p = 0,0270$. Foi verificada correlação positiva (Teste de Spearman, $r = 0,54$, $p = 0,0003$) entre a marcação de ER α e de e-caderina, ou seja, as neoplasias com maior expressão de e-caderina tendem a expressar mais ER α . Foi observada uma correlação negativa entre a expressão de e-caderina e a idade das pacientes, indicando uma menor expressão em idades mais elevadas (Teste de Spearman, $r = -0,53$, $p = 0,0063$).

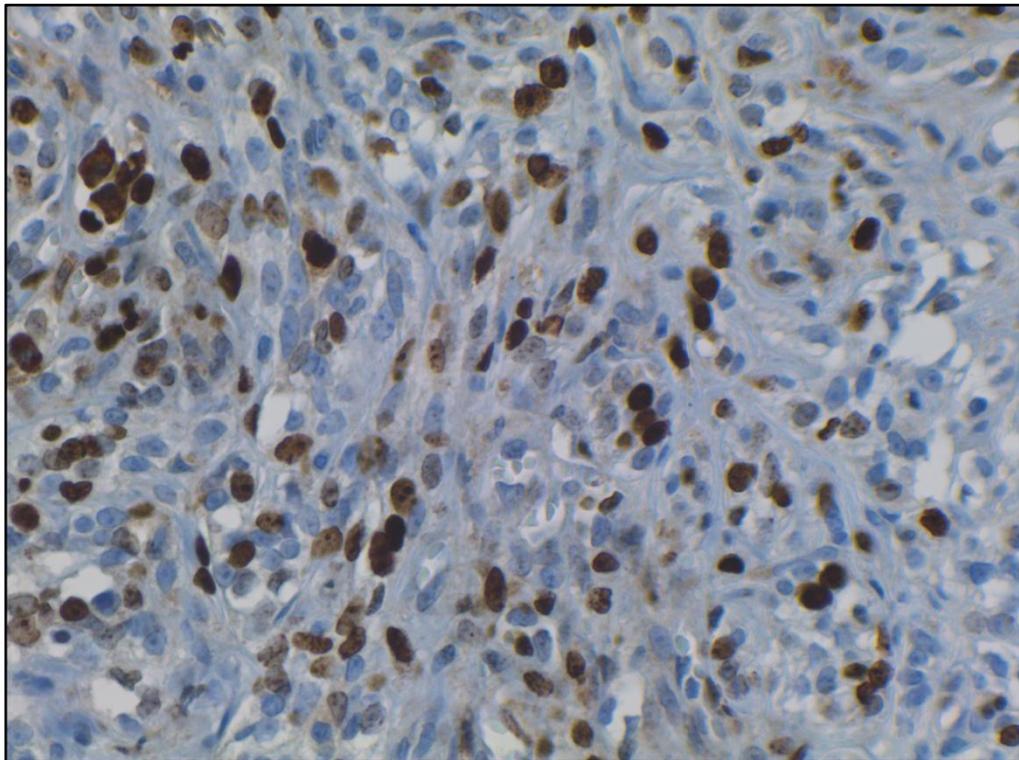
TABELA 16. Frequência da marcação imuno-histoquímica de e-caderina associada a marcação de ER α .

Marcação para e-caderina	ERα (+)	ERα (-)
Alta marcação	5	0
Moderada marcação	5	9
Baixa marcação	1	4
Ausente	0	1

6.6.5 Expressão de ki67

A observação da expressão do ki67 foi possível somente em 14 amostras. As outras 11 amostras não apresentaram qualquer marcação pelo anticorpo, provavelmente pela exigência da técnica. A mensuração foi realizada nos *hotspots* e o valor foi atribuído ao percentual de 1000 células contadas. Os resultados do ki67 são apresentados na TABELA 10. A figura 12 apresenta a neoplasia inclusa na pesquisa com o maior índice proliferativo observado do ki67: 40%.

Figura 12. Fotomicrografia de corte histológico de mama evidenciando imunomarcagem para ki67. DAB/Hematoxilina de Harris. Aumento de 400X.



A TABELA 17 apresenta a frequência observada do índice proliferativo do ki67, associado ao grau histológico. Não foi observada relevância estatística significativa entre o índice proliferativo com os graus de diferenciação dos carcinomas, realizado pelo teste exato de Fisher com valor de $p = 0,3584$.

TABELA 17. Frequência do índice proliferativo do ki67 associado aos graus de malignidade.

Grau de malignidade	Baixo	Médio	Alto
Bem diferenciado (I)	4	3	1
Moderadamente diferenciado (II)	1	2	1
Pouco diferenciado (III)	0	0	2

6.6.5 Expressão de p53

A observação a marcação do p53 em 25 amostras. Foi determinada marcação negativa em 12 amostras, fraca em 8 amostras, positiva em 3 amostras e superexpressa em 2 amostras. A TABELA 18 apresenta a intensidade da marcação do p53 em relação aos graus de malignidade. Não foi estabelecida nenhum tipo de correlação ou associação entre o p53 e as outras variáveis determinadas nessa pesquisa.

TABELA 18. Frequência da marcação do p53 associado aos graus de malignidade.

Grau de malignidade	Negativa	Fraca	Positiva	Superexpresso
Bem diferenciado (I)	5	3	2	1
Moderadamente diferenciado (II)	4	3	1	1
Pouco diferenciado (III)	3	2	0	0

6.7 Determinação da classificação fenotípica

Foi determinado o perfil fenotípico das neoplasias de acordo com os critérios determinados por Varallo e colaboradores (2019). A TABELA 19 apresenta as frequências obtidas em cada classificação. Das 25 neoplasias avaliadas, 6 delas apresentaram positividade para pelo menos um dos receptores hormonais e negatividade para o HER-2, sendo classificadas como luminal A. As outras 9 neoplasias tiveram positividade com pelo menos um dos receptores hormonais

positivos e positividade também para o HER-2, sendo classificadas como luminal B. A positividade somente do receptor HER-2 foi considerada como HER-2 superexpresso, sendo observado em 3 neoplasias. Por fim, 7 neoplasias apresentaram nenhuma marcação nos 3 receptores avaliados, sendo classificadas como triplo negativo. A TABELA 20 apresenta as neoplasias, seguida da positividade ou negatividade dos receptores utilizados na classificação fenotípica, seu fenótipo determinado e o grau histológico de malignidade.

TABELA 19. Frequência dos tipos fenotípicos das neoplasias mamárias caninas observadas.

Grau histológico	Frequência (n)	Porcentagem (%)
Luminal A	6	24
Luminal B	9	36
HER-2 superexpresso	3	12
Triplo negativo	7	28
Total	25	100

TABELA 20. Apresentação das neoplasias com os resultados da expressão imuno-histoquímica para os receptores RP, ER α e HER-2, com respectiva caracterização de fenótipo e o grau de malignidade da neoplasia.

ID	Classificação histológica	RP	ERα	HER-2	Fenótipo
1	Carcinoma cístico-papilífero	+	+	+	Luminal B
2	Carcinoma complexo	+	-	-	Luminal A
3	Carcinoma complexo	-	+	+	Luminal B
4	Carcinoma complexo	+	+	-	Luminal A
5	Carcinoma complexo	+	+	+	Luminal B
6	Carcinoma micropapilífero	-	-	-	Triplo Negativo
7	Carcinoma misto	+	+	+	Luminal B
8	Carcinoma misto	-	-	+	HER-2*
9	Carcinoma misto	-	+	-	Luminal A
10	Carcinoma misto	+	-	-	Luminal A
11	Carcinoma misto	+	+	+	Luminal B
12	Carcinoma papilífero	-	-	-	Triplo Negativo
13	Carcinoma papilífero	-	-	-	Triplo Negativo
14	Carcinoma papilífero	-	-	-	Triplo Negativo
15	Carcinoma papilífero	+	+	+	Luminal B
16	Carcinoma sólido	-	-	-	Triplo Negativo
17	Carcinoma tubular	-	-	+	HER-2*
18	Carcinoma tubular	-	-	+	HER-2*
19	Carcinoma tubular	-	-	-	Triplo Negativo
20	Carcinoma tubular	-	+	+	Luminal B
21	Carcinoma tubular	+	+	+	Luminal B
22	Carcinoma tubulopapilífero	-	-	-	Triplo Negativo
23	Carcinoma tubulopapilífero	+	-	+	Luminal B
24	Carcinoma tubulopapilífero	+	-	-	Luminal A
25	Carcinoma tubulopapilífero	-	+	-	Luminal A

Legenda: Grau H. grau histológico, (-) negativo, (+) positivo, HER-2* HER-2 superexpresso.

Os dados de contingência são apresentados na TABELA 21. As classificações Luminal A e B agregaram exclusivamente neoplasias de grau I e II de malignidade, enquanto as neoplasias determinadas como Triplo negativo agregaram exclusivamente as neoplasias de grau II e III. O grupo HER-2 superexpresso apresentou um integrante de todos os graus de malignidade. A contingência foi avaliada pelo teste exato de Fisher com valor de $p = 0,0182$, havendo diferença significativa entre os graus I e III com valor de $p = 0,0009$. Foi evidenciada forte correlação positiva (Teste de Spearman, $r = 0,64$, p aproximado de $0,0006$) entre as

neoplasias de maior grau histológico a fenótipos mais agressivos, como o triplo negativo.

TABELA 21. Frequência dos fenótipos das neoplasias associados aos graus de malignidade.

Classificação fenotípica	Grau I	Grau II	Grau III
Luminal A	4	2	0
Luminal B	6	3	0
HER-2 superexpresso	1	1	1
Triplo negativo	0	3	4

Foi observada uma tendência de correlação positiva entre a idade e os fenótipos mais agressivos, no qual as neoplasias triplo negativas tendem a prevalecer nas cadelas mais idosas (Teste de Spearman, $r = 0,46$, p aproximado de $0,0207$).

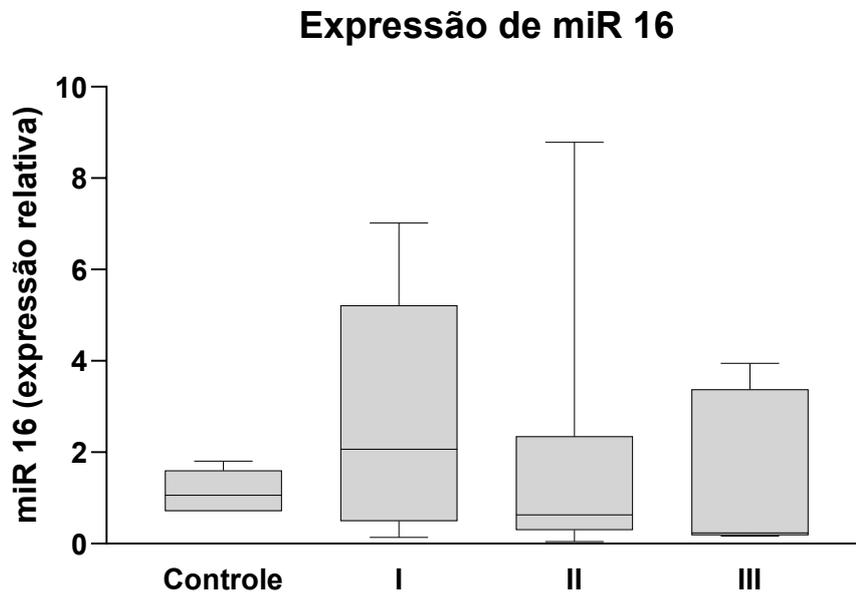
6.8 Avaliação epigenética

A expressão relativa dos miRs foi avaliada por rt-PCR. Os dados são expostos a seguir de acordo com as classificações de grau de malignidade e fenótipo. Alguns miRs também foram avaliados com relação a outros critérios, de acordo com suas características e funções.

6.8.1 Expressão relativa do miR-16

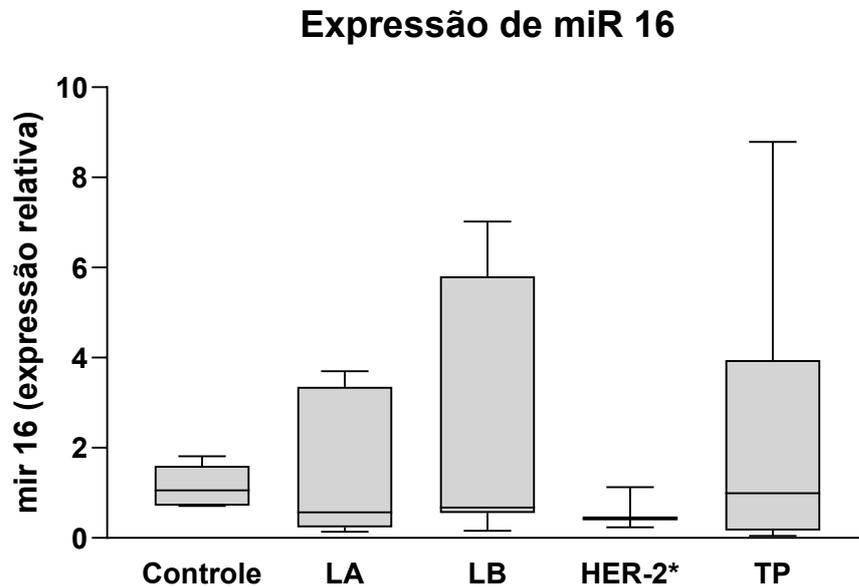
A Figura 13 apresenta a expressão do miR-16 em relação aos grupos de grau de malignidade. Não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados, segundo teste de Kruskal-Wallis com valor aproximado de $p = 0,05233$. Foi realizada a extração de 1 resultado *outlier* no grupo I de malignidade (método de ROUT, $q = 0,5\%$). A normalidade avaliada pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov.

Figura 13. Expressão relativa de miR-16 apresentada pelas neoplasias de acordo com o grau de diferenciação e grupo controle.



A Figura 14 apresenta a expressão do miR-16 em relação aos fenótipos da neoplasia. Não há diferença estatística entre os grupos observados, conforme teste de Kruskal-Wallis com valor aproximado de $p = 0,7588$. Foi feita a extração de 1 resultado *outlier* no grupo Luminal A (método de ROUT, $q = 0,5\%$). A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk.

Figura 14. Expressão relativa de miR-16 apresentada pelas neoplasias de acordo com o fenótipo neoplásico e grupo controle.

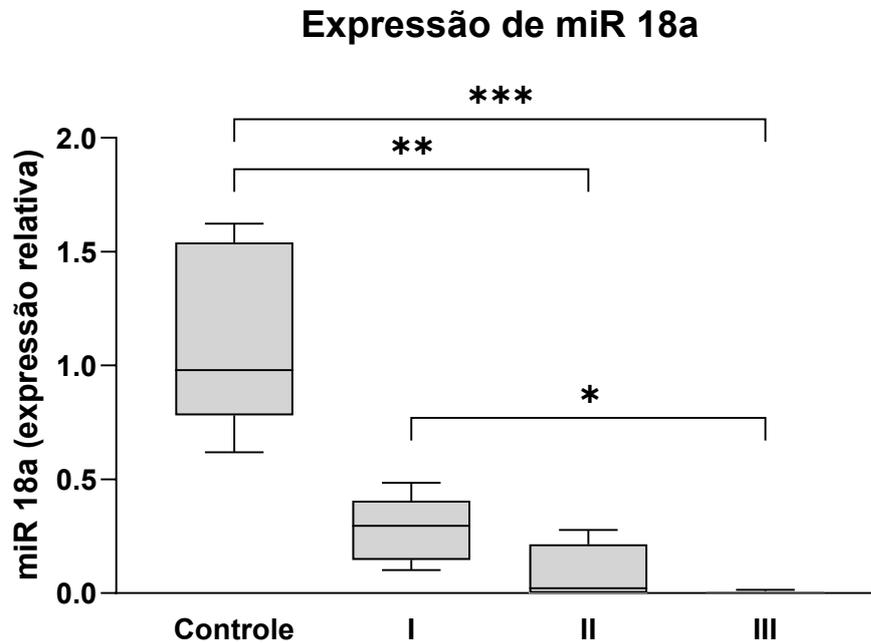


Legenda: LA Luminal A, LB Luminal B, HER-2* HER-2 superexpresso, TP triplo negativo.

6.8.2 Expressão relativa do miR-18a

A Figura 15 apresenta a expressão do miR-18a em relação aos grupos de grau de diferenciação. Há diferença estatística entre os grupos, determinada pelo teste de Kruskal-Wallis com valor aproximado de $p < 0,0001$, seguido por pós-teste de Dunn. Foi feita a extração de 1 resultado *outlier* no grupo I de malignidade (método de ROUT, $q = 0,5\%$). A normalidade foi avaliada pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov.

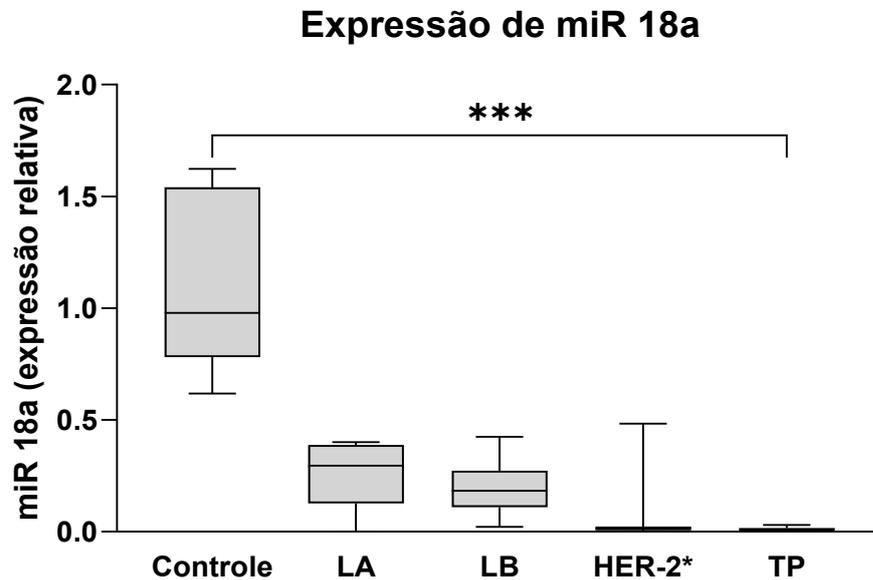
Figura 15. Expressão relativa de miR-18a apresentada pelas neoplasias de acordo com o grau de diferenciação e grupo controle.



Valores de p: Controle x II $p = 0,0025$. Controle x III $p = 0,0003$. I x III $p = 0,0261$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

A figura 16 apresenta a expressão do miR-18a em relação aos fenótipos da neoplasia. Há diferença estatística entre os grupos, conforme teste de Kruskal-Wallis com valor aproximado de $p < 0,0011$, seguido por pós-teste de Dunn. Foi feita a extração de 1 resultado *outlier* no grupo Luminal B (método de ROUT, $q = 0,5\%$). A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi observada correlação negativa do grau de malignidade a expressão do miR-18a, no qual, quanto maior o grau de malignidade, menor a expressão do miR-18a (Teste de Spearman, $r = -0,77$, p aproximado de 0,0001).

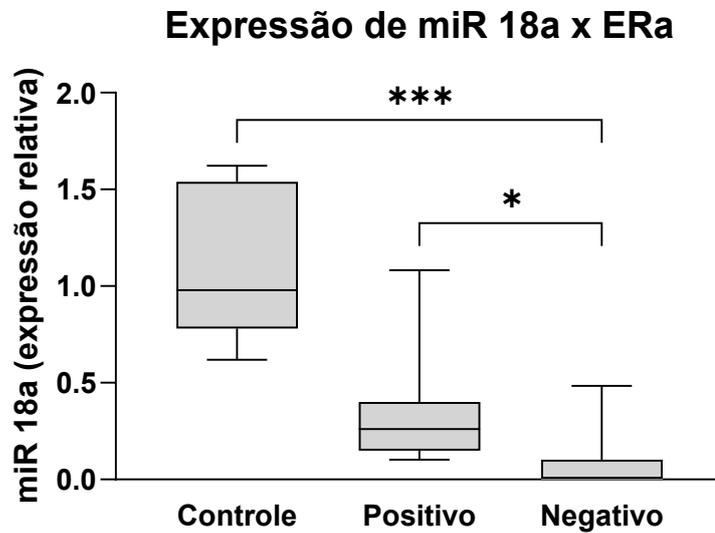
Figura 16. Expressão relativa de miR-18a apresentada pelas neoplasias de acordo com o fenótipo neoplásico e grupo controle.



Legenda: LA Luminal A, LB Luminal B, HER-2* HER-2 superexpresso, TP triplo negativo. Valores de p: Controle x TP $p = 0,0003$. *** $p < 0,001$.

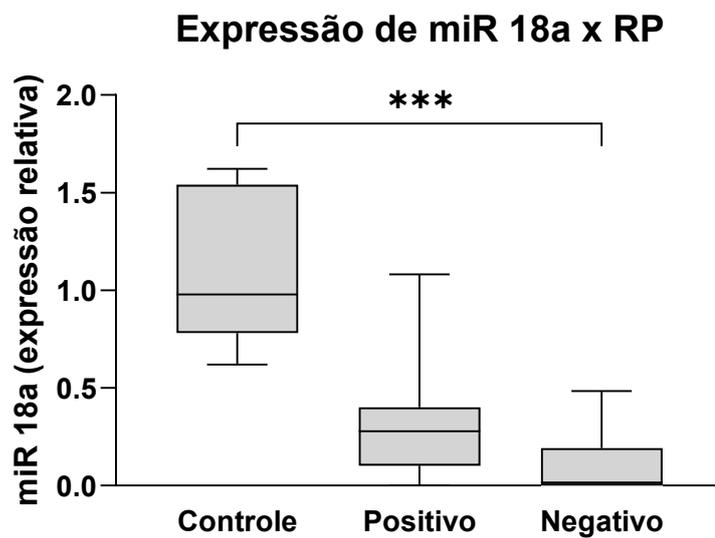
Foi avaliada a expressão relativa do miR 18a em relação à presença dos receptores hormonais. Avaliando os receptores de ER α (Figura 17), há diferença estatística entre os grupos, conforme teste de Kruskal-Wallis, com valor aproximado de $p = 0,0002$, seguido por pós-teste de Dunn. A normalidade avaliada pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. A expressão do miR 18a com a marcação do receptor de progesterona (Figura 18) foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis com valor aproximado de $p = 0,0006$, seguido por pós-teste de Dunn.

Figura 17. Expressão relativa de miR-18a apresentada de acordo com a marcação do receptor de ER α .



Valores de p: Controle x negativo p = 0,0003. Positivo x negativo p = 0,0477. * p < 0,05. *** p < 0,001.

Figura 18. Expressão relativa de miR-18a apresentada de acordo com a marcação do receptor de RP.

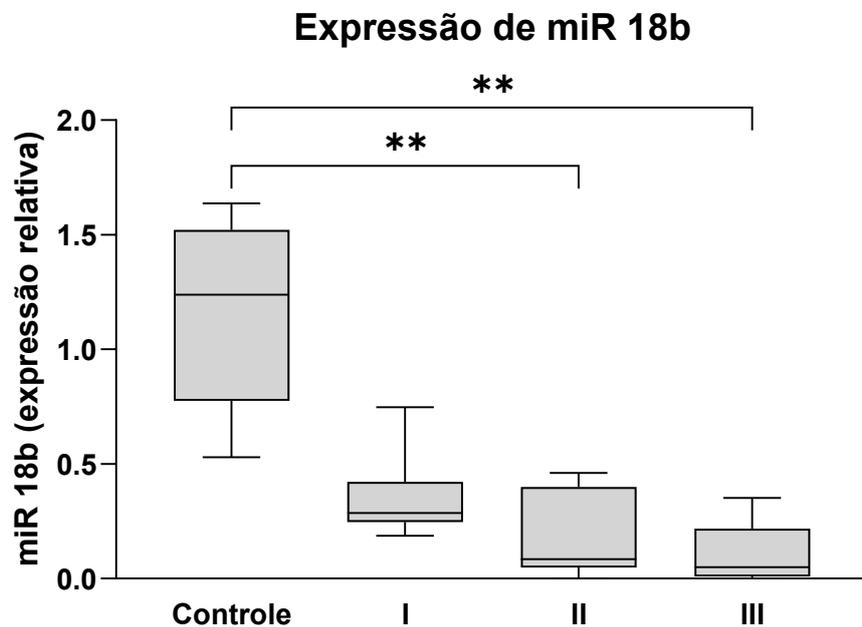


*** p < 0,001.

6.8.3 Expressão relativa do miR-18b

Foi observada diferença estatística na expressão do miR-18b entre os graus de malignidade em comparação ao grupo controle (Figura 19). O resultado foi obtido pelo teste de Kruskal-Wallis, com valor aproximado de $p < 0,0009$, seguido por pós-teste de Dunn. Nenhum *outlier* foi extraído da avaliação (método de ROUT, $q = 0,5\%$). A normalidade foi avaliada pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov.

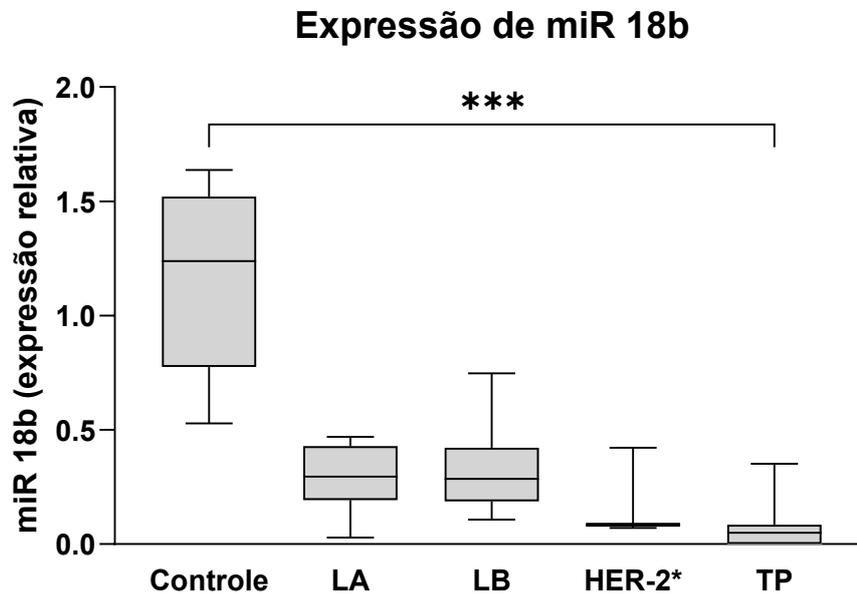
Figura 19. Expressão relativa de miR-18b apresentada pelas neoplasias de acordo com o grau de diferenciação e grupo controle.



Valores de p: Controle x II $p = 0,0048$. Controle x III $p = 0,0013$. ** $p > 0,01$.

A Figura 20 apresenta a expressão do miR-18b em relação aos fenótipos da neoplasia. Há diferença estatística entre os grupos, obtida pelo teste de Kruskal-Wallis, com valor aproximado de $p < 0,0014$, seguido por pós-teste de Dunn. Diferença estatística evidenciada apenas entre o grupo controle e o fenótipo triplo negativo. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk.

Figura 20. Expressão relativa de miR-18b apresentada pelas neoplasias de acordo com o fenótipo neoplásico e grupo controle.



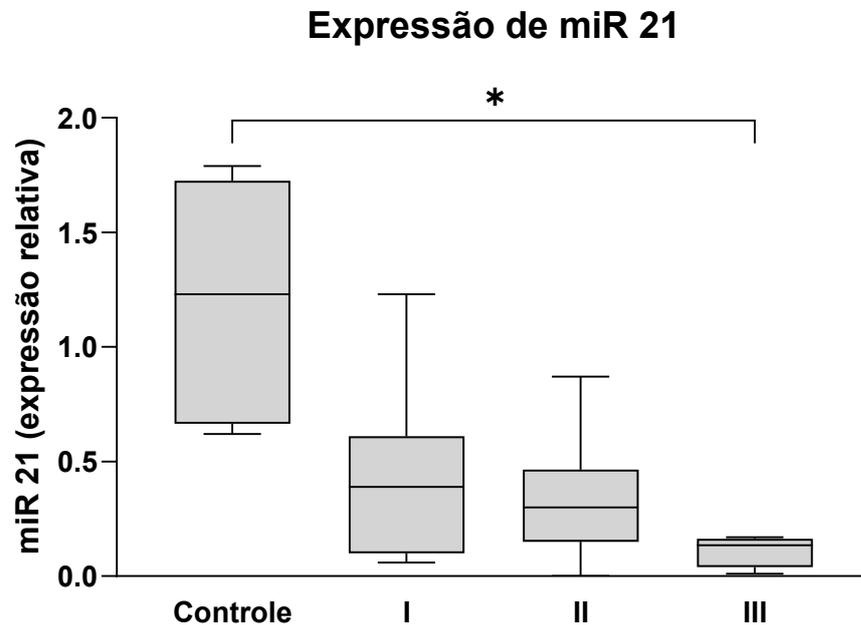
Legenda: LA Luminal A, LB Luminal B, HER-2* HER-2 superexpresso, TP triplo negativo. Valores de p: Controle x TP $p = 0,0003$. *** $p > 0,001$.

Foi observada correlação positiva entre o miR-18a e o miR-18b (Teste de Spearman, $r = 0,82$, p aproximado de $0,0001$).

6.8.4 Expressão relativa do miR-21

Houve diminuição da expressão relativa do miR-21 nas neoplasias em comparação ao grupo controle (Figura 21). Para verificação, foi realizado teste de Brown-Forsythe (ANOVA) com valor de $p = 0,0041$. Foi verificada diferença estatística entre o controle e o grupo III de malignidade. Houve exclusão de 1 *outlier* do grau III (teste de ROUT, $q = 0,5\%$). A normalidade de todos os grupos foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk.

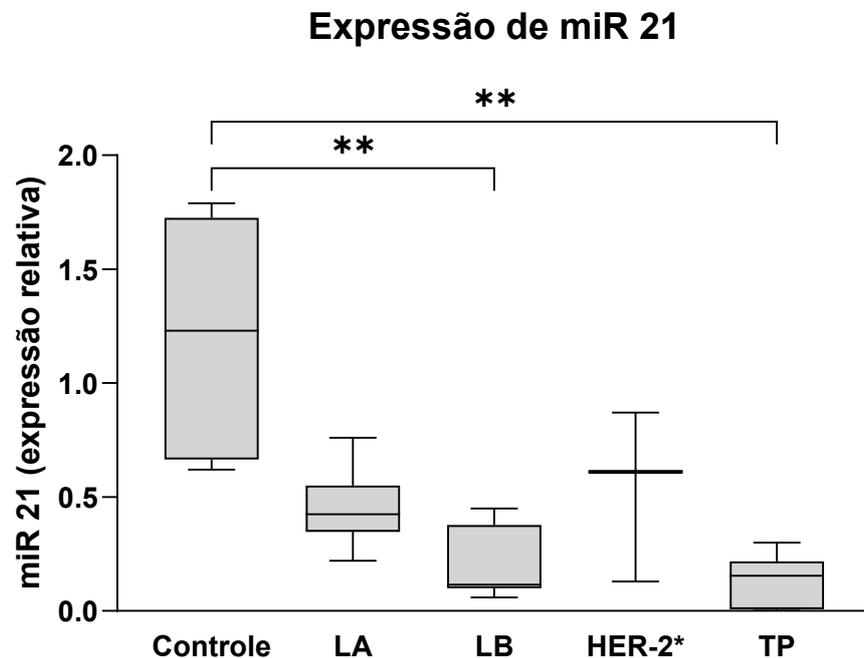
Figura 21. Expressão relativa de miR-21 apresentada pelas neoplasias de acordo com o grau de diferenciação e grupo controle.



Valores de p: Controle x III $p = 0,0446$. * $p < 0,05$.

Quando avaliamos a expressão relativa do miR-21 em relação aos fenótipos (Figura 22), observamos que há diferença significativa na expressão segundo teste de Kruskal-Wallis, com valor de aproximado de $p = 0,0016$. A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. A diferença foi significativa entre os grupos controle versus luminal B e controle versus triplo negativo.

Figura 22. Expressão relativa de miR-21 apresentada pelas neoplasias de acordo com o fenótipo neoplásico e grupo controle.

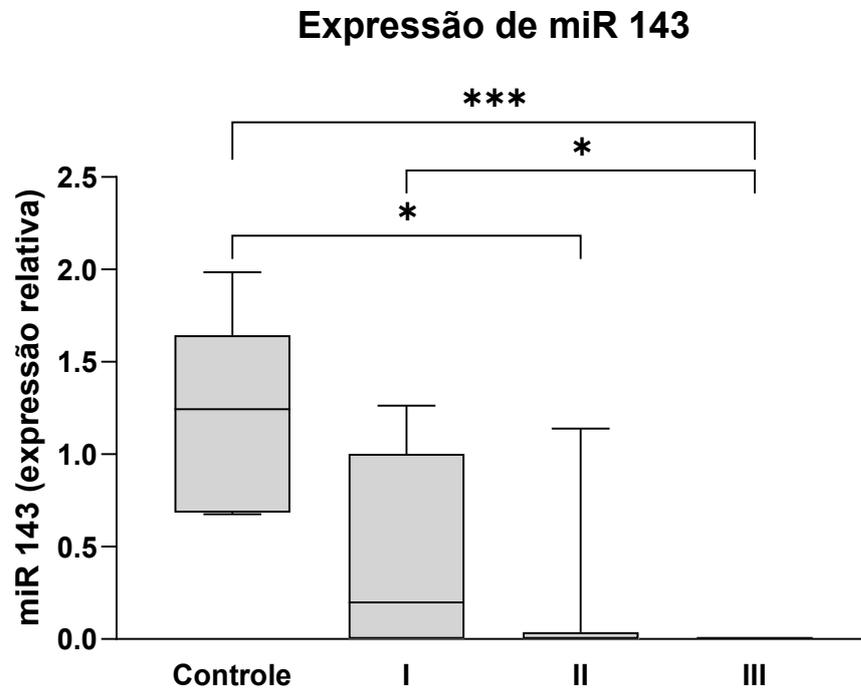


Legenda: LA Luminal A, LB Luminal B, HER-2* HER-2 superexpresso, TP triplo negativo. Controle x LB $p = 0,0064$. Controle x TP $p = 0,0043$. ** $p < 0,01$.

6.8.5 Expressão relativa do miR-143

A expressão do miR-143 foi significativamente diminuída nos graus de malignidade II e III, quando comparados ao grupo controle. Foi observada também diferença entre os graus I e III (Figura 23). A diferença entre os grupos foi verificada estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis, com p aproximado de 0,0008, seguido de pelo teste de Dunn. Resultados *outliers* foram mantidos devido a diminuição do n amostral. A normalidade foi verificada pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov ($\alpha = 0,05$). Foi observada correlação negativa entre o grau de malignidade e a expressão do miR-143, no qual, quanto maior o grau de malignidade II e III, menor a expressão do miR-143 (Teste de Spearman, $r = -0,67$, $p = 0,0002$).

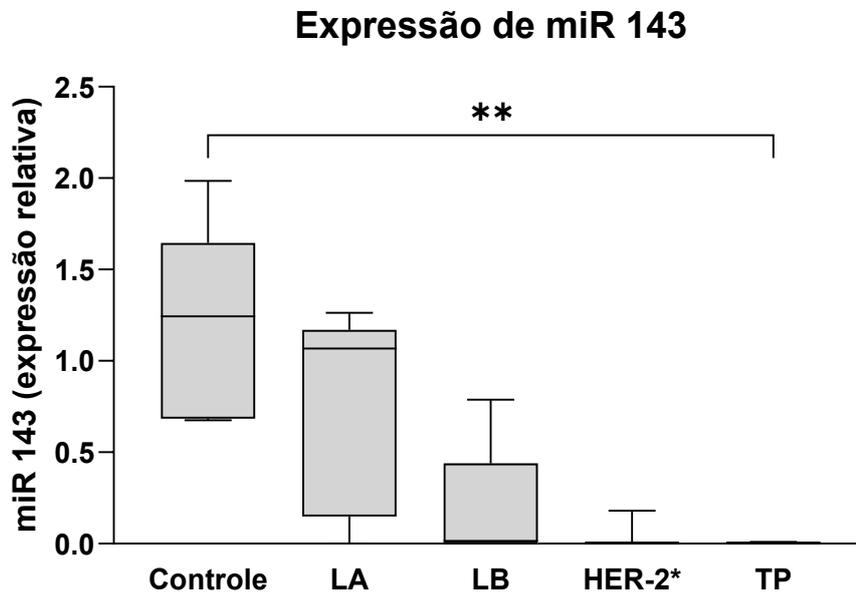
Figura 23. Expressão relativa de miR-143 apresentada pelas neoplasias de acordo com o grau de diferenciação e grupo controle.



Valores de p: Controle x II $p = 0,0467$. Controle x III $p = 0,0010$. I x III $p = 0,0163$. * $p < 0,05$. *** $p < 0,001$.

Quando verificamos a expressão do miR-143 com relação aos fenótipos (Figura 24), observamos diferença entre os grupos determina pelo teste de Kruskal-Wallis, com valor aproximado de $p = 0,0034$, seguido do pós-teste de Dunn. Foi observada correlação negativa do fenótipo com a expressão do miR-143, no qual, a expressão do miR-143 foi diminuída nos fenótipos mais agressivos como o HER-2 superexpresso e o triplo negativo (Teste de Spearman, $r = -0,62$, $p = 0,001$). Foi observada ainda uma correlação negativa entre o miR-143 e o ki67 (Teste de Spearman, $r = -0,5$, $p = 0,0111$).

Figura 24. Expressão relativa de miR-143 apresentada pelas neoplasias de acordo com o fenótipo neoplásico e grupo controle.



Legenda: LA Luminal A, LB Luminal B, HER-2* HER-2 superexpresso, TP triplo negativo. Valores de o: Controle x TP = 0,0049. ** p < 0,01.

6.9 Correlações entre variáveis

As correlações entre as variáveis realizadas neste estudo são apresentadas na figura 25. Com base na correlação de Spearman, observou-se associação estatisticamente significativa entre algumas variáveis. Além das correlações já descritas durante os resultados apresentados, observou-se que o fenótipo tumoral apresentou correlação positiva com o grau histológico ($r = 0,64$, $p = 0,0006$), assim como correlação negativa importante com ER α ($r = -0,52$, $p = 0,0078$) e RP ($r = -0,61$, $p = 0,0013$), indicando que perfis fenotípicos mais agressivos se relacionam à perda de receptores hormonais e maior grau histológico.

7. DISCUSSÃO

A população das cadelas incluídas nesse estudo apresentou perfil semelhante ao descrito na literatura, representado predominantemente por cadelas adultas e idosas (SOARES *et al.*, 2023; SRISAWAT *et al.*, 2024). O risco para o desenvolvimento da neoplasia aumenta conforme a idade, principalmente nas cadelas que não foram submetidas à esterilização, o que reforça que a maturidade reprodutiva é um fator de risco significativo (RAMOS, 2011; CARVALHO, 2016). Em concordância com dados epidemiológicos brasileiros obtidos por Barreira e colaboradores (2019) e Soares e colaboradores (2023), que observaram percentuais de 69,1% e 85,38%, respectivamente, de cadelas inteiras com carcinoma, o presente estudo incluiu uma população de 76% de cadelas não esterilizadas. Isso reforça a hipótese da alta prevalência da neoplasia mamária em cadelas ser associada a baixos índices de esterilização da população, portanto, maior exposição do tecido mamário ao estímulo hormonal contínuo, fator esse comprovadamente associado à carcinogênese primária (CARVALHO, 2016).

O porte dos animais e a raça da população incluída nessa pesquisa seguiram os dados epidemiológicos brasileiros descritos em estudos anteriores, nos quais se reforça a presença da doença em animais de pequeno porte (RAMOS, 2011; BARREIRA *et al.*, 2019; SRISAWAT *et al.*, 2024). Essa apresentação é reflexo da população canina do país, que apresenta variabilidade na prevalência de raças de acordo com tendências da sociedade para cada período. A maior apresentação foi das cadelas SRD, sendo comum a quase todos os estudos epidemiológicos (BARREIRA *et al.*, 2019), seguida de raças de pequeno porte, como Poodle e Shih Tzu, podendo significar uma predisposição genética dessas raças ao desenvolvimento da doença. A população atendida nesse estudo inclui ainda moderada prevalência das raças Lhasa Apso e Yorkshire Terrier, pontuando não só a possibilidade de predisposição genética, como também o aumento significativo da prevalência dessas raças na população da cidade de Santo André durante a realização da pesquisa (RAMOS, 2011; DOLKA *et al.*, 2024). As mamas mais acometidas foram as mamas abdominais caudais e mamas inguinais, correspondendo juntas a 80% da prevalência. A maior prevalência da doença nessas mamas é justificada pela maior quantidade de tecido glandular e maior estímulo hormonal (RAMOS, 2011; RODRÍGUEZ *et al.*, 2019).

O tamanho da neoplasia é apresentado na literatura como um fator indicativo de malignidade, permitindo inclusive a classificação da doença em diferentes estágios clínicos, como proposto por Owen em 1980 ao câncer de mama em mulheres. Essa classificação pode ser considerada subjetiva em cães devido à heterogeneidade do tamanho das cadelas. Por exemplo, neste estudo estão incluídas cadelas de pequeno porte e porte médio. Em estudos epidemiológicos conduzidos por Ramos (2011) e por Alves e colaboradores (2018), observa-se a associação de maior agressividade ao tamanho da neoplasia. Essa condição não foi observada nesse estudo, levando em conta outras variáveis, além do porte dos animais. Nesse estudo, a população incluída na pesquisa contempla principalmente uma população de baixa renda, fator esse que influencia diretamente no acesso à informação acerca da esterilização das cadelas e do desenvolvimento de doenças. A oferta de atendimento público gratuito dá acesso ao tratamento para algumas cadelas da população, porém, a alta variabilidade do tempo de evolução da doença nessa população contribui para fatores de malignidade. Além disso, nesse estudo foram excluídas as cadelas com múltiplas formações e com neoplasias diagnosticadas como de outros tipos histológicos, com exceção do carcinoma, não podendo, assim, serem estabelecidos parâmetros comparativos específicos com outros estudos pela diferença da amostragem.

Dos carcinomas incluídos na amostragem, foi observada uma alta prevalência do carcinoma misto, seguido do tubular, complexo e papilífero. Essa tendência histopatológica se aproxima de estudos epidemiológicos realizados na Espanha por Rodríguez e colaboradores (2022), no Brasil por Soares e colaboradores (2023) e na Tailândia por Srisawat e colaboradores (2024), que observaram os carcinomas mistos e complexos como os carcinomas mais presentes dentre todas as neoplasias. Em diversas populações caninas, estas neoplasias representam juntas mais de 80% das neoplasias malignas diagnosticadas, refletindo a alta frequência dos carcinomas e a participação concomitante de células mioepiteliais no processo (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011; TAVASOLY *et al.*, 2013; CASSALI *et al.*, 2024). Contudo, os estudos de Rodríguez e colaboradores (2022) e Srisawat e colaboradores (2024) apresentam ainda notável prevalência do carcinoma sólido, que, em contraste, representa a menor população observada no presente estudo. É de se salientar que estes estudos, como a maioria dos estudos epidemiológicos, contemplam todas as possíveis neoplasias mamárias, diferentemente desta pesquisa que incluiu apenas carcinomas.

A classificação histológica proposta por Goldschmidt e colaboradores (2011) trouxe avanços importantes ao descrever os possíveis arranjos arquiteturais do tecido neoplásico e o envolvimento das células mioepiteliais. Essa abordagem já validada por diversos ensaios, permite distinguir subtipos com um comportamento distinto, especialmente entre os carcinomas mistos e complexos, que, como observado neste estudo, tendem a apresentar uma menor agressividade e melhor prognóstico, em detrimento dos carcinomas simples, que tendem a apresentar menor diferenciação e pior prognóstico, como os carcinomas tubulares, sólidos e micropapilíferos (RASOTTO *et al.*, 2017; CAÑADAS *et al.*, 2018; CASSALI *et al.*, 2024).

A análise conjunta do tipo histológico com o grau de malignidade permitiu associar as neoplasias com um valor prognóstico (PEÑA *et al.*, 2013; PECILE *et al.*, 2021). Foi evidenciada a distribuição predominante nos graus I e II, indicando um conjunto de neoplasias bem diferenciadas. Esse achado vai ao encontro dos resultados descritos por Peña e colaboradores (2013), no estudo que adaptou o método de Nottingham de classificação de grau histológico do câncer na mulher, verificando-se uma alta prevalência das neoplasias moderadamente diferenciadas (grau II). Além disso, no presente estudo a associação significativa entre o tipo histológico e o grau de malignidade sugeriu coerência entre a diferenciação histológica e o comportamento tumoral. Os carcinomas mistos e complexos quase que predominam no grau I, tendo somente um representante classificado como grau II, indicando o comportamento menos agressivo e maior diferenciação celular e tecidual dessas neoplasias. Em contrapartida, foi observada que alguns carcinomas simples e o carcinoma sólido, sabidamente já associados a pior desfecho na literatura, apresentaram maior pontuação no sistema de graduação de malignidade, ou seja, grau III (RASOTTO *et al.*, 2017; CAÑADAS *et al.*, 2018).

O pleomorfismo nuclear, um dos critérios observados no escore de grau de malignidade, é reconhecido isoladamente como um marcador de agressividade tumoral. O aumento do volume e as alterações na disposição nuclear são correlacionados com pior prognóstico e maior agressividade tumoral, embora alguma subjetividade no método ainda limite a reprodutibilidade entre os observadores. A presença de núcleos hipercromáticos e múltiplos, nucléolos evidentes e alta variabilidade entre os núcleos celulares observado nas neoplasias de grau III, refletem a alta atividade proliferativa e a perda da diferenciação celular (SANTOS *et al.*, 2014).

Conforme destacado pelo Consenso Latino-americano de 2024, a utilização de critérios padronizados para a classificação dos carcinomas em cadelas e gatas é essencial para uniformização do diagnóstico da doença. O consenso reforça o uso, em conjunto com a determinação do tipo histológico (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011) e o sistema de graduação de malignidade (PEÑA *et al.*, 2013), como pilares fundamentais no estabelecimento do prognóstico para as neoplasias mamárias (CASSALI *et al.*, 2024).

A expressão da marcação de ER α foi encontrada de maneira variável entre os tipos histológicos, porém foi verificada uma tendência de redução da expressão com o aumento da malignidade, observação essa semelhante a estudos que encontraram uma relação inversa entre a expressão do ER α e o grau histológico, com tumores de baixo grau histológico apresentando maior imunopositividade e maior sobrevida global (BRUNETTI *et al.*, 2020). O papel do ER α na tumorigênese primária é amplamente conhecido, sendo o receptor nuclear mais relevante na regularização proliferativa mediada pelo estrógeno. A perda da expressão está associada a maior taxa de mitoses, comportamento invasivo e pior prognóstico, reforçando seu valor como marcador de diferenciação celular (KOMATSU *et al.*, 2012).

Um estudo realizado por Sorenmo e colaboradores (2019) associou a atividade dupla do estrógeno (avaliando ER α por imuno-histoquímica, a dosagem sérica de estrógeno e a esterilização do animal) com desfechos clínicos e histológicos em 159 cadelas com neoplasia mamária. Em animais com ER α positivos, o estrógeno atuou como agente proliferativo, promovendo o crescimento e a progressão tumoral, e em animais ER α negativos, o estrógeno pode ter exercido efeitos protetores por vias não dependentes de receptor, devido ao fato de os autores terem observado maior tempo até o aparecimento de metástase e maior taxa de sobrevida. Esses achados complementam outro estudo realizado por Kristiansen e colaboradores (2016), que mostrou que a esterilização, ao alterar o ambiente estrogênico, modifica o prognóstico das neoplasias com marcação de ER α . Cadelas castradas com neoplasia ER α positiva foram beneficiadas com melhor taxa de sobrevida e menor taxa de recidiva, em contraste com cadelas castradas com ER α negativo, nas quais a esterilização não foi benéfica e, em alguns casos, até prejudicou a evolução do animal.

Diferentemente do que ocorre no câncer de mama em mulheres, a perda da expressão de ER α não parece estar associada à metilação do gene ESR1. Estudo dirigido por Brandão e colaboradores (2018), com 21 animais, demonstrou que o gene ESR1 possui uma ilha CpG intragênica, sem papel promotor na regulação epigenética e que a ausência da expressão do receptor, não se correlaciona com o grau de metilação. Esse resultado, sugere que a regulação da expressão do receptor depende de mecanismos pós-transcricionais ou mutacionais, como variações genéticas do próprio gene receptor. Em outro estudo, foram identificados polimorfismos associados a menor agressividade tumoral e menor tamanho da neoplasia, indicando que o perfil genético individual do receptor de estrógeno pode modular a susceptibilidade e a progressão dos tumores mamários caninos (CAÑADAS-SOUSA *et al.*, 2019).

A expressão de RP demonstrou padrão semelhante à do ER α , sendo mais intensa nas neoplasias mais diferenciadas e negativa em todas as neoplasias pouco diferenciadas ou indiferenciadas (grau III). Nessa pesquisa, a maioria das neoplasias de comportamento clínico menos agressivo apresentaram pelo menos um dos receptores hormonais positivos, quando não apresentaram os dois conjuntamente. Essa tendência está amplamente descrita na literatura e reforça que o RP é um bom marcador de diferenciação e de bom prognóstico nas neoplasias mamárias caninas (MAINETI *et al.*, 2014; PEÑA *et al.*, 2014). Por outro lado, a perda da expressão do receptor de progesterona esteve associada às neoplasias de pior prognóstico. Essa relação inversa entre RP e malignidade também foi observada por ensaios celulares e teciduais, que mostraram baixa expressão de ER α e RP em tumores invasivos e com aumento concomitante para marcadores da EMT (KOMATSU *et al.*, 2012; KABIR *et al.*, 2017).

De maneira complementar, a expressão de RP pode ser mais estável que a expressão de ER α nas neoplasias mamárias, sendo um marcador menos suscetível a variações hormonais do ciclo estral, portanto, mais confiável para a avaliação prognóstica. Além disso, foi observada que a ausência isolada de RP, mesmo em tumores ER α negativos, está associado a pior prognóstico e menor tempo de sobrevida. Esse padrão sugere uma dissociação funcional entre os dois receptores. Em condições fisiológicas, o estrógeno estimula a transcrição do gene do RP, logo, espera-se que tumores ER α positivos também expressem RP. O rompimento dessa relação pode significar que a neoplasia tenha adquirido autonomia proliferativa,

passando a utilizar vias não hormonais, como as mediadas por fatores de crescimento (MAINENTI *et al.*, 2014).

Em contrapartida dos receptores hormonais, o HER-2 neste estudo não apresentou correlação significativa com os tipos histológicos e com os graus de malignidade. Essa ausência de correlação direta reforça a heterogeneidade biológica do HER-2 nas neoplasias mamárias caninas, conforme relatado por diversos estudos que demonstram variação na frequência e no impacto prognóstico desse marcador, quando avaliado isoladamente, sugerindo que a influência desse marcador pode depender de outros fatores biológicos ou moleculares concomitantes (KOMATSU *et al.*, 2012).

De maneira semelhante a resultados encontrados por Varallo e colaboradores (2019), as neoplasias exclusivamente positivas somente para HER-2 compreenderam a minoria das amostras processadas (12% nesse estudo e 9,1% no estudo de Varallo). Em ambos os casos, a superexpressão de HER-2 está distribuída em diferentes graus de malignidade e distintos tipos histológicos, sem um padrão consistente, reforçando que o valor prognóstico de HER-2 depende da análise integrada com outros marcadores. Resultados semelhantes foram relatados por Kabir e colaboradores (2017), que avaliaram a expressão gênica de HER-2 em linhagens celulares mamárias caninas e verificaram que o aumento da expressão não foi suficiente para prever de forma isolada o comportamento maligno.

A avaliação conjunta dos três receptores permitiu determinar o fenótipo das neoplasias em 4 grupos. Os fenótipos mais frequentes na amostra foram luminal B e triplo negativo, seguidos do grupo luminal A e, em menor prevalência, o HER-2 superexpresso. Ao correlacionar o fenótipo com o grau histológico, observamos que as neoplasias dos fenótipos luminal A e B concentram-se nos graus I e II de malignidade, enquanto o grupo triplo negativo permanece nos graus de malignidade II e III. Esses achados refletem a tendência da correlação entre perda da expressão de receptores e a agressividade neoplásica descrita em diferentes estudos (KOMATSU *et al.*, 2012; VARALLO *et al.*, 2019; PASTOR *et al.*, 2020).

Os fenótipos luminal A e B estão tradicionalmente associados a tumores bem diferenciados, menor índice proliferativo e melhor prognóstico, em função da dependência parcial de hormônios para os estímulos proliferativos (PASTOR *et al.*,

2020). Além disso, esses fenótipos também incluem a possibilidade de terapia-alvo com o bloqueio da sinalização hormonal dependente de estrógeno e/ou progesterona, seja diretamente pelo bloqueio do receptor ou reduzindo a síntese hormonal para interromper o estímulo proliferativo. A castração do animal também pode exercer um efeito positivo nessas neoplasias (KOMATSU *et al.*, 2012; MAINENTI *et al.*, 2014; PENÃ *et al.*, 2014).

A única neoplasia com metástase em linfonodo regional foi classificada como triplo negativo, embora no sistema TNM o fenótipo albergou representantes de todos os outros estágios. Com relação ao grau de malignidade, o fenótipo caracterizou-se por maior pleomorfismo nuclear, indiferenciação tubular e alto índice mitótico. Esses resultados confirmam o comportamento agressivo do fenótipo, com maior probabilidade de metástases e menor tempo de sobrevida. Outro agravante para o fenótipo é a impossibilidade da realização de terapias-alvo, justamente pela ausência da expressão dos três receptores (KOMATSU *et al.*, 2012; VARALLO *et al.*, 2019; CASSALI *et al.*, 2024).

O fenótipo HER-2 superexpresso apresentou uma neoplasia em cada grau, sugerindo a heterogeneidade do seu comportamento como apontam diversos estudos revisados, porém esta pesquisa obteve baixa representatividade amostral do fenótipo, não sendo possível confirmar tal afirmação. Em estudos anteriores, essa variação sugere que, isoladamente, o HER-2 não representa marcador prognóstico consistente, sendo mais relevante quando avaliado em conjunto com ER α e RP, dentro do contexto fenotípico global (KABIR *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2022). A superexpressão do HER-2 ocorre em aproximadamente 17 a 35% dos carcinomas mamários, enquanto, em tumores benignos, sua expressão geralmente está ausente ou é discreta. No entanto, mesmo entre os tumores positivos, não há consenso sobre seu real valor prognóstico (KOMATSU *et al.*, 2012).

A e-caderina é uma glicoproteína transmembrana essencial para a adesão celular e manutenção da polaridade tecidual. Nos resultados encontrados, embora a análise de contingência não tenha alcançado diferença significativa, foi observada uma tendência de alta e moderada expressão nos fenótipos Luminal A e B e redução da expressão, portanto, perda de adesão celular nos fenótipos HER-2 superexpresso e triplo negativo, confirmada pela correlação negativa observada. Essa tendência

repete padrões descritos em outros ensaios, nos quais a perda da expressão de e-caderina é frequentemente associada a neoplasias de pior desfecho clínico e em perfis moleculares mais agressivos (VARALLO *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2022). A diminuição da expressão da e-caderina está relacionada a necrose, infiltração tecidual e metástase linfonodal, mas não necessariamente ligada ao grau de malignidade (MATOS *et al.*, 2006). A redução da E-caderina em animais idosos é compatível com o maior risco de tumores agressivos nessa idade (PEÑA *et al.*, 2013), e com a perda de adesão celular típica de carcinomas de maior grau (MAINENTI *et al.*, 2014).

Foi observado que a e-caderina é mais elevada em neoplasias ER α positiva em relação às neoplasias ER α negativas. A ativação do ER α parece modular a expressão do gene CDH1, que codifica a e-caderina, contribuindo para a estabilidade das junções celulares e o menor potencial invasivo (SANMARCO *et al.*, 2023). Esse achado sugere que a adesão epitelial mediada pela e-caderina pode ser em parte dependente da via estrógeno-nuclear, o que reforça a hipótese de que a perda de estímulo estrogênico contribui para a transição epitélio-mesenquimal e para o aumento do potencial invasivo. Tal essa correlação foi descrita por Cañada-Sousa e colaboradores (2019) e Sammarco e colaboradores (2023) que destacam a relação direta entre a positividade do receptor hormonal e a preservação da adesão celular epitelial, com diminuição progressiva nos fenótipos triplo negativo e neoplasias de maior grau de malignidade.

O ki67 é um marcador amplamente conhecido na medicina humana e veterinária, sendo um dos principais indicadores de atividade proliferativa tumoral. Sua expressão está associada à proporção de células em divisão ativa, refletindo o potencial de crescimento da neoplasia (CARVALHO *et al.*, 2016; BRUNETTI *et al.*, 2020). Nos carcinomas mamários avaliados, observou-se uma expressão variável do ki67, com redução do número de amostras analisáveis devido à ausência de coloração imuno-histoquímica em parte das lâminas, o que pode estar relacionado a fatores técnicos de fixação e conservação do tecido. O tempo prolongado entre a coleta e a fixação do tecido pode levar à degradação antigênica (KASZAK *et al.*, 2018).

Em ensaios realizados, é encontrada maior expressão do ki67 nos carcinomas mamários de maior grau de malignidade, demonstrando uma correlação positiva entre o índice proliferativo e a agressividade tumoral. É observado que neoplasias mamárias

de alto grau apresentam índices de ki67 acima de 30-40%, enquanto neoplasias bem diferenciadas apresentam índices inferiores a 15% (CARVALHO *et al.*, 2016, BRUNETTI *et al.*, 2020). Estudos comparativos com o câncer de mama em mulheres reforçam o papel do ki67 como um marcador de comportamento biológico similar, sendo mais expresso em tumores invasivos e metastáticos. É validado como um dos marcadores mais confiáveis e amplamente utilizados na rotina de oncológica veterinária, em geral para avaliar prognóstico e resposta terapêutica (KASZAK *et al.*, 2018).

Todos esses achados imuno-histoquímicos reforçam que a incorporação da fenotipagem molecular ao diagnóstico histológico permite estimar o potencial biológico da neoplasia de forma mais abrangente, aproximando a oncologia veterinária dos modelos preditivos utilizados na medicina humana.

Em humanos, o miR-16 é amplamente descrito como um miR de função supressora, frequentemente reduzido em neoplasias e com impacto em vias do ciclo celular, além de aparecer em modelos hormonais como alvo de regulamentação por progestágenos (GHAFOURI-FARD *et al.*, 2022). É importante notar que o melhor desempenho do miR-16 como biomarcador é para biópsia líquida e para neoplasias de fenótipo triplo negativo, nos quais o miR pode ser associado a recorrência e tempo de sobrevida (KUJALA *et al.*, 2024). Esses dados em humanos, embora robustos, não são observados em cadelas (BOGGS *et al.*, 2008; RAPOSO *et al.*, 2016). A expressão relativa do miR-16 não diferiu significativamente entre as amostras controle e as amostras com tecido neoplásico neste estudo. Não houve qualquer tipo correlação quanto diferença estatística relacionada ao grau de malignidade e fenótipo. Esse resultado é congruente com parte da literatura veterinária que já observou a ausência de diferença do miR-16 ao comparar tumores mamários caninos em diferentes desfechos (por exemplo, presença ou ausência de metástase) ou entre tipos histológicos, ressaltando a heterogeneidade da doença (BULKOWSKA *et al.*, 2017; VON DETZEN *et al.*, 2024).

A ausência de diferença significativa também pode estar associada a fatores técnicos e metodológicos da análise. Variações na recuperação antigênica, tempo de fixação e de congelamento das amostras podem comprometer a detecção dos miRs, especialmente daqueles com baixa abundância relativa. Além disso, alterações na via

de biogênese, como a redução da atividade da enzima DICER1, a presença de heterogeneidade intratumoral ou processos de EMT podem reduzir a sensibilidade do ensaio, levando à subestimação da expressão real no tecido (MADADI *et al.*, 2019). Salvador-Bernabé e colaboradores (2018) desencorajam o uso do miR-16 como controle endógeno único, pois esse miR não apresenta estabilidade universal entre os diferentes tipos de amostras. Embora nosso estudo tenha utilizado o miR-16 como alvo de interesse e não como normalizador, evidências reforçam a necessidade de interpretação cautelosa dos resultados negativos a fim de minimizar o impacto de variações técnicas sobre a detecção diferencial.

Os miRs 18a e 18b pertencem ao cluster miR-17-92 e miR-106a-363, reconhecidos na oncobiologia por atuarem como oncomiRs clássicos, modulando vias proliferativas, escape de apoptose e aumento da agressividade fenotípica. Observamos uma forte correlação positiva entre os miR-18a e miR-18b, sendo essa coexpressão típica do cluster miR-17-92, geralmente se comportando de maneira paralela (ABBATE *et al.*, 2023). Em modelos humanos e caninos, ambos já foram relacionados à supressão de genes reguladores do ciclo celular (como ERS1, TSP-1, CTGF, p21) e à aquisição de fenótipos de agressividade, portanto, a sua superexpressão costuma refletir perda de diferenciação, maior taxa proliferativa e microambiente tumoral mais agressivo. A divergência dos resultados encontrados neste estudo pode ser explicada por aspectos metodológicos, amostrais e biológicos do microambiente tumoral (SALVADOR-BERNABÉ *et al.*, 2018; EGELAND *et al.*, 2020; ABBATE *et al.*, 2023 FERREIRA *et al.*, 2024).

Os miR-18a e 18b não são exclusivamente epiteliais. Eles são altamente expressos em células inflamatórias, especialmente em macrófagos e linfócitos ativados. Sendo assim, amostras de tumores ricas em estroma tendem a apresentar elevação desses miRs e, em contrapartida, amostras pobres em estroma ou com dissecação exclusivamente epitelial podem exibir valores mais baixos, mesmo sendo mais agressivos (EGELAND *et al.*, 2020). No estudo realizado por Abbate e colaboradores (2023), a superexpressão de miR-18a e miR-18b foi demonstrada de forma consistente em carcinomas, com correlação negativa com a expressão do gene ESR1, indicando um eixo epigenético no qual esses miRs levam à diminuição da expressão de ER α . Neoplasias ER α negativas e com maior índice proliferativo (determinado pelo ki67) apresentaram expressão significativamente mais alta desses

miRs, reforçando sua atuação como biomarcadores de agressividade e epigenética hormonal. Em nosso estudo, o miR-18a apresentou uma subexpressão, o qual, à primeira vista, parece sugerir ausência de relação com o receptor ER α . Contudo a literatura aponta que neoplasias de alto grau ou com características EMT (biologicamente agressivas) podem apresentar queda global dos miRs, inclusive dos oncomiRs, sem que isso comprometa a suas atuações. Estudos anteriores sugerem que, mesmo com uma expressão absoluta mais baixa do miR-18a, a expressão pode ainda ser alta o suficiente para silenciar ESR1 em tumores epiteliais pobres em miRs (FERREIRA *et al.*, 2024). Nesse aspecto, nossos resultados são sugestivos, uma vez que diversas neoplasias apresentam a marcação do ER α reduzida ou ausente, assim como resultado observado por Abbate e colaboradores (2023), que notaram que os tumores com pouca marcação de ER α foram exatamente os que apresentam algum nível de miR-18a ativo, mesmo quando a expressão do miR detectada não foi considerada alta.

A metodologia empregada para a determinação da expressão dos miRs pode ocasionar variações nos resultados obtidos. Além da inclusão da fração epitelial da amostra, alguns trabalhos fazem a inclusão de um estroma robusto e de necrose tumoral. Essa adição de necrose e estroma, ambos ricos em células inflamatórias, tendem a determinar uma maior expressão desses miRs (ABBATE *et al.*, 2022; ABBATE *et al.*, 2023). Em um estudo realizado por Egeland e colaboradores (2020), no qual foram avaliadas a expressão e a localização dos miRs 18a e 18b em linfonodos de neoplasias mamárias de mulheres, determinou-se por hibridização cromogênica *in situ* a relevância da localização estromal dos miRs e não epitelial. Os tempos de processamentos e de fixação das amostras também são variáveis que podem influenciar diretamente a detecção de microRNAs (FERREIRA *et al.*, 2024).

A expressão dos miRs oncogênicos, como o miR-18a, miR-18b e miR-21, foi significativamente menor no grupo III de malignidade e nas neoplasias de fenótipo triplo negativo. Essa observação pode ser explicada pelo processo de indiferenciação celular, no qual tais tumores podem perder parte da maquinaria de processamento dos miRs (DICER1 e Drosha). Esse fenômeno é descrito em vias de EMT e tumores de alto grau em cães e humanos, assim esses tumores podem apresentar queda global dos miRs, incluindo os oncomiRs (FERREIRA *et al.*, 2024).

O miR-21 é um oncomiR muito estudado nas neoplasias mamárias caninas e desempenha um papel central na regulação de processos que levam à carcinogênese, como a proliferação celular, a inibição da apoptose, a invasão e a metástase. Ele atua como regulador negativo de genes supressores tumorais, como PTEN, PDCD4 e TPM1, promovendo um microambiente tumoral favorável à progressão tumoral (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011; VARALLO *et al.*, 2019). Nas neoplasias mamárias caninas, o miR-21 geralmente encontra-se superexpresso, tanto em níveis teciduais quando em níveis circulantes, sendo frequentemente associado ao grau histológico, à invasividade e a fenótipos mais agressivos (como Luminal B, HER-2 superexpresso e triplo negativo). Essa expressão elevada sugere que o miR-21 contribui para a perda de diferenciação epitelial e para a ativação de vias de sinalização pró-oncológicas (RIBEIRO *et al.*, 2018; SAMMARCO *et al.*, 2023).

De maneira contrária ao descrito na literatura, neste estudo o miR-21 foi encontrado subexpresso nas neoplasias, em comparação ao tecido mamário controle, ainda que tenha sido encontrada diferença estatística significativa entre o grupo controle e todos o grau III de malignidade e entre o grupo controle e os fenótipos Luminal B e triplo negativo. Tais achados podem estar relacionados com a interação do miR-21 com os receptores ER α e os receptores androgênicos. Há evidências, ainda experimentais, de que a transcrição do miR-21 pode ser suprimida pelo estradiol ou pelos andrógenos, com desrepressão de alvos supressores (PTEN e PDCD4) e com efeito antiproliferativo (WICKRAMASINGHE *et al.*, 2009; CASABURI *et al.*, 2016). Ainda, pode acontecer a interação com RNAs não codificantes de cadeia longa, como o SNHG9, que reduz a expressão, promovendo a metilação do *locus* do miR-21 (XIA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020).

Alternativamente, o miR-21 costuma ser alto no estroma tumoral. Rask e colaboradores (2014) avaliaram a expressão do miR-21 em carcinomas mamários e observaram que a distribuição do miR-21 é heterogênea, com sinal elevado no estroma tumoral de muitos casos. É sugerido que a proporção de estroma nas amostras pode influenciar a detecção global do miR-21, ou seja, amostras com dissecação mais epitelial ou com estroma escasso podem exibir miR-21 tumoral mais baixo que estudos que analisam bloco integral. Outro estudo avaliou a presença de miR-21, miR-16, miR-143 e outros em tecido mamário neoplásico, em metástases e em tecido mamário saudável. Foi verificado que o miR-21 foi significativamente

aumentado em pelo menos um dos grupos de tumor mamário avaliado em comparação à glândula mamária normal. Contudo, as metástases (que foram microdissecadas a laser) mostraram um padrão menor de expressão dos miRs, quando comparadas com amostras macrodissecadas. Os autores elencam a possibilidade de as amostras microdissecadas conterem pouquíssimo material estromal, diferentemente das amostras da própria neoplasia, que foram macrodissecadas, contribuindo, assim, para as diferenças na expressão global (VON DETZEN *et al.*, 2024). Essas hipóteses são plausíveis para os critérios realizados na amostragem, nos quais, para a realização do exame epigenético, foram coletados pequenos fragmentos exclusivamente dos tumores, pobres em estroma. Na detecção dos miRs em geral também pode haver interferência de aspectos pré-analíticos como normalizadores e eficiência de ensaio.

O miR-143 é conhecido como um microRNA supressor tumoral, envolvido em vias cruciais para a homeostase epitelial e para o controle da proliferação celular, da diferenciação e do metabolismo energético. A expressão aumentada desse microRNA é observada em linhagens celulares menos agressivas, reforçando a sua ação como regulador negativo de malignidade (OSAKI *et al.*, 2016). É sugerido que sua redução de expressão esteja associada com aumento do potencial metastático e perda da diferenciação celular (VON DEETZEN *et al.*, 2014). O miR-143 também é descrito como um biomarcador de prognóstico promissor, uma vez que sua subexpressão é consistente em carcinomas mamários caninos de graus maiores e no fenótipo triplo negativo, comportamento semelhante ao observado no câncer de mama em mulheres (FERREIRA *et al.*, 2024). O miR-143 apresentou correlação negativa com o ki67, sugerindo um papel relevante do miR-143 no controle da proliferação tumoral (ABBATE *et al.*, 2022).

Os resultados obtidos neste estudo estão em plena concordância com esse panorama, demonstrando uma redução significativa da expressão do miR-143 nas neoplasias mamárias mais agressivas da pesquisa, especialmente nos graus II e III de malignidade e no fenótipo triplo negativo. Esse achado reforça o caráter supressor tumoral e prognóstico do miR-143, sugerindo que sua perda pode estar implicada na progressão histológica e fenotípica dos carcinomas (OSAKI *et al.*, 2016; SALVADOR-BERNABÉ *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2024).

O conjunto dos achados epigenéticos do nosso estudo demonstram um cenário molecular complexo das neoplasias. A subexpressão dos oncomiRs, embora distinta da maioria dos relatos, pode ser explicada por diferenças metodológicas, de amostragem (epitélio versus estroma) e pelo comprometimento da biogênese dos miRs em neoplasias indiferenciadas. Por outro lado, a subexpressão significativa do miR-143 reforça o seu papel supressor e se alinha aos graus e fenótipos observados na literatura. Assim, foi demonstrado que esses miRs agem de maneira integrada à biologia tumoral complexa, refletindo particularidades das neoplasias e a heterogeneidade intrínseca dos carcinomas mamários caninos.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma mamário canino é um grupo de neoplasias caracterizado por sua heterogeneidade, evidenciada pelas variações clínicas, histológicas e imunofenotípica observadas entre as formações analisadas. Essa diversidade estrutural e funcional demonstra que tumores com aparência semelhante podem apresentar comportamentos biológicos distintos, o que torna indispensável a utilização de diferentes ferramentas para a adequada caracterização da doença. A associação consistente entre os graus histológicos de malignidade elevados, fenótipos moleculares agressivos (especialmente o triplo negativo) e alterações importantes nos biomarcadores teciduais (como perda progressiva de e-caderina e redução dos receptores hormonais) reforça a necessidade de avaliações multidimensionais para compreender o real potencial agressivo das neoplasias.

Entre os microRNAs investigados, o miR-143 se destacou como o marcador epigenético alinhado às características de agressividade tumoral. Sua subexpressão foi observada nos tumores de maior malignidade, especialmente nos fenótipos HER-2 superexpresso e triplo negativo, além de apresentar correlação negativa com o ki67, indicando participação ativa em vias relacionadas à diferenciação e ao controle da proliferação celular. Esses achados demonstram que o miR-143 pode atuar como uma ferramenta complementar relevante na avaliação prognóstica, contribuindo para o reconhecimento de tumores com comportamento mais agressivo.

REFEFÊNCIAS

ABBATE, J. M.; GIANNETTO, A.; ARFUSO, F.; BRUNETTI, B.; LANTERI, G. RT-qPCR Expression profiles of selected oncogenic and oncosuppressor miRNAs in formalin-fixed, paraffin-embedded canine mammary tumors. **Animals: an open access journal from MDPI**, 12(21), 2898, 2022.

ABBATE, J. M.; ARFUSO, F.; RIOLO, K.; CAPPARUCCI, F.; BRUNETTI, B.; LANTERI, G. Epigenetics in canine mammary tumors: upregulation of miR-18a and miR-18b oncogenes is associated with decreased *ERS1* target mRNA expression and ER α immunoexpression in highly proliferating carcinomas. **Animals: an open access journal from MDPI**, 13(6), 1086, 2023.

AL-MANSOUR, M. A.; KUBBA, M. A. G.; AL-AZREG, S. A.; DRIBIKA, S. A. Comparative histopathology and immunohistochemistry of human and canine mammary tumors. **Open Veterinary Journal**, 8(3), 243–249, 2018.

ALLRED, D. C.; HARVEY, J. M.; BERARDO, M.; CLARK, G. M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, 11(2), 155–168, 1998.

ALVES, R.O.D.; DA SILVA, V.F.; RODRIGUES, L.A.; XAVIER, D.C.R.; DA SILVA, P.L.N.; MURTA, D.V.F. Caracterização clínica e histopatológica de tumores mamários em cadelas atendidas em Viçosa, MG. **Journal of Health and Biological Science**, 6(1), 17-22, 2018.

BARREIRA, A.P.A.; ANDRADE, L.O.; OLIVEIRA, D.; ROCHA, I.; CARVALHO, C.F.; THOMÉ, S. Avaliação da predisposição de cadelas e gatas para a neoplasia mamária em municípios do Rio de Janeiro. **Archives of Veterinary Science**, 26(3), 88-99, 2021.

BOGGS, R. M.; WRIGHT, Z. M.; STICKNEY, M. J.; PORTER, W. W.; MURPHY, K. E. MicroRNA expression in canine mammary cancer. **Mammalian Genome**, 19(7-8), 561–569, 2008.

BORGES B. D. N. Epigenetic alterations in canine mammary cancer. **Genetics and Molecular Biology**, 45(3 Suppl 1), e20220131, 2022.

BRANDÃO, Y. O.; TOLEDO, M. B.; CHEQUIN, A.; CRISTO, T. G.; SOUSA, R. S.; RAMOS, E. A. S.; KLASSEN, G. DNA methylation status of the estrogen receptor α gene in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, 55(4), 510–516, 2018.

BRUNETTI, B.; BACCI, B.; ANGELI, C.; BENAZZI, C.; MUSCATELLO, L. V. p53, ER, and Ki67 expression in canine mammary carcinomas and correlation with pathological variables and prognosis. **Veterinary Pathology**, 58(2), 325–331, 2021.

BULKOWSKA, M.; RYBICKA, A.; SENSES, K. M.; ULEWICZ, K.; WITT, K.; SZYMANSKA, J.; TACIAK, B.; KLOPFLEISCH, R.; HELLMÉN, E.; DOLKA, I.; GURE, A. O.; MUCHA, J.; MIKOW, M.; GIZINSKI, S.; KROL, M. MicroRNA expression patterns in canine mammary cancer show significant differences between metastatic and non-metastatic tumours. **BMC Cancer**, 17(1), 728, 2017.

CANADAS, A.; FRANÇA, M.; PEREIRA, C.; VILAÇA, R.; VILHENA, H.; TINOCO, F.; SILVA, M. J.; RIBEIRO, J.; MEDEIROS, R.; OLIVEIRA, P.; DIAS-PEREIRA, P.; SANTOS, M. Canine mammary tumors: comparison of classification and grading methods in a survival study. **Veterinary Pathology**, 56(2), 208–219, 2019.

CANADAS, A.; SANTOS, M.; MEDEIROS, R.; DIAS-PEREIRA, P. Influence of E-cadherin genetic variation in canine mammary tumour risk, clinicopathological features and prognosis. **Veterinary and Comparative Oncology**, 17(4), 489–496, 2019.

CANADAS-SOUSA, A.; SANTOS, M.; LEAL, B.; MEDEIROS, R.; DIAS-PEREIRA, P. Estrogen receptors genotypes and canine mammary neoplasia. **BMC Veterinary Research**, 15(1), 325, 2019.

CARVALHO, M.I.; PIRES, I.; PRADA, J. Ki67 and PCNA expression in canine mammary tumors and adjacent nonneoplastic mammary glands: prognostic impact by a multivariate survival analysis. **Veterinary Pathology**, 53, 1138–46, 2016.

CARVALHO, C.J.S. **Tumor de mama em cadelas: epidemiologia, características clínicas e morfológicas**. Programa de pós-graduação em ciência animal – Universidade Federal do Piauí, 2016. <http://hdl.handle.net/123456789/454>.

CASABURI, I.; CESARIO, M. G.; DONÀ, A.; RIZZA, P.; AQUILA, S.; AVENA, P.; LANZINO, M.; PELLEGRINO, M.; VIVACQUA, A.; TUCCI, P.; MORELLI, C.; ANDÒ, S.; SISCO, D. Androgens downregulate miR-21 expression in breast cancer cells

underlining the protective role of androgen receptor. **Oncotarget**, 7(11), 12651–12661, 2016.

CASSALI, G.D.; JARK, P. C.; GAMBA, C.; DAMASCENO, K. A.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; HORTA, R. S.; FIRMO, B. .F; SUEIRO, F. A. R.; RODRIGUES, L. C. S.; NAKAGAKI, K. Y. R. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine and feline mammary tumors - 2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, 13(3), 555 – 574, 2020.

CASSALI G.D.; NAKAGAKI K.Y.R.; JARK P.C.; HORTA R.S.; ARIAS A.C.; TELLADO M.N.; ESTRELA-LIMA A.; SUEIRO F.A.R.; DOS REYS M.P.; WRONSKI J.G.; SIERRA O.R.; KRISTANCIC E.A.; DECUADRO A.; GÓMEZ J.L.Á. Consensus on the diagnosis, prognosis, and treatment of canine and feline mammary tumors: solid arrangement – 2023. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, 17(3), 152-163, 2024.

DA SILVA, E. M. G.; DOS SANTOS, T. R.; SILVA, M. J. B. Identifying the risk factors for malignant mammary tumors in dogs: a retrospective study. **Veterinary Sciences**, 10(10), 607, 2023.

DOLKA, I.; CZOPOWICZ, M.; STOPKA, D.; WOJTKOWSKA, A.; KASZAK, I.; & SAPIERZYŃSKI, R. Risk factor analysis and clinicopathological characteristics of female dogs with mammary tumours from a single-center retrospective study in Poland. **Scientific Reports**, 14(1), 5569, 2024.

DUPONT, C.; ARMANT, D.R.; BRENNER, C.A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. **Seminars in Reproductive Medicine**, 27(5), 351-357, 2009.

EGELAND, N. G.; JONSDOTTIR, K.; AURE, M. R.; SAHLBERG, K.; KRISTENSEN, V. N.; CRONIN-FENTON, D.; SKALAND, I.; GUDLAUGSSON, E.; BAAK, J. P. A.; JANSSEN, E. A. MiR-18a and miR-18b are expressed in the stroma of oestrogen receptor alpha negative breast cancers. **BMC Cancer**, 20(1), 377, 2020.

FERREIRA, T.; DA COSTA, R. M. G.; DIAS, F.; GAMA, A.; GASPAR, V. M.; MANO, J. F.; OLIVEIRA, P. A.; MEDEIROS, R. Exploring the role of microRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in canine mammary tumors. **GeroScience**, 46(6), 6641–6657, 2024.

GHAFOURI-FARD, S.; KHOSHBAKHT, T.; HUSSEN, B. M.; ABDULLAH, S. T.; TAHERI, M.; SAMADIAN, M. A review on the role of mir-16-5p in the carcinogenesis. **Cancer Cell International**, 22(1), 342, 2022.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, 48(1), 117–131, 2011.

JAIN, M.; INGOLE, S. D.; DESHMUKH, R. S.; BHARUCHA, S. V.; NAGVEKAR, A. S.; GAIKWAD, R. V.; KHARDE, S. D. CEA, CA 15-3, and miRNA expression as potential biomarkers in canine mammary tumors. **Chromosome Research**, 29(2), 175–188, 2021.

JEONG, S. J.; LEE, K. H.; CHO, J. Y. Comparative epigenomics to clinical trials in human breast cancer and canine mammary tumor. **Animal Cells and Systems**, 29(1), 12–30, 2025.

KABIR, F. M. L.; ALVAREZ, C. E.; BIRD, R. C. Canine mammary carcinomas: a comparative analysis of altered gene expression. **Veterinary Sciences**, 3(1), 1, 2015.

KABIR, F. M. L.; DEINNOCENTES, P.; AGARWAL, P.; MILL, C. P.; RIESE ND, D. J.; BIRD, R. C. Estrogen receptor- α , progesterone receptor, and *c-erbB*/HER-family receptor mRNA detection and phenotype analysis in spontaneous canine models of breast cancer. **Journal of Veterinary Science**, 18(2), 149–158, 2017.

KASZAK, I.; RUSZCZAK, A.; KANAFKA, S.; KACPRZAK, K.; KRÓL, M.; JURKA, P. (2018). Current biomarkers of canine mammary tumors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 60(1), 66, 2018.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, 10(2), 126–139, 2009.

KOEPPEN, H. K.; WRIGHT, B. D. BURT, A. D.; QUIRKE, P.; MCNICOL, A. M.; DYBDAL, N. O.; SLIWKOWSKI, M. X.; HILLAN, K. J. Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. **Histopathology**, 38(2), 96–104, 2001.

KOMATSU, T., IWANO, H., EBISAWA, M., WATABE, A., ENDO, Y., HIRAYAMA, K., TANIYAMA, H., KADOSAWA, T. Pathological classification of canine mammary tumor

based on quantifying mRNA levels of hormonal receptors, SATB1, and Snail in tissue and fine needle biopsy samples. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 74(6), 719–726, 2012.

KRISTIANSEN, V. M.; NØDTVEDT, A.; BREEN, A. M.; LANGELAND, M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M.; JONASDOTTIR, T. J.; GROTMOL, T.; SØRENMO, K. Effect of ovariectomy at the time of tumor removal in dogs with benign mammary tumors and hyperplastic lesions: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 27(4), 935–942, 2013.

KUJALA, J.; TENGSTROM, M.; HEIKKINEN, S.; TAIPALE, M.; KOSMA, V. M.; HARTIKAINEN, J. M.; MANNERMAA, A. Circulating microRNAs predict the risk of recurrence in triple-negative breast cancer. **Cells**, 13(22), 1884, 2024.

LEE, C. H.; KWEON, O. K. Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**, 3(4), 321–325, 2002.

MADADI, S.; SOLEIMANI, M. Evaluation of miR-16 as an internal control in the patients with breast cancer. **Human Pathology**, 85, 329, 2019.

MAIENTI, M.; RASOTTO, R.; CARNIER, P.; ZAPPULLI, V. Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, 202(1), 62–68, 2014.

MANUALI, E.; DE GIUSEPPE, A.; FELIZIANI, F.; FORTI, K.; CASCIARI, C.; MARCHESI, M. C.; PACIFICO, E.; PAWŁOWSKI, K. M.; MAJCHRZAK, K.; KRÓL, M. CA 15-3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. **BMC Veterinary Research**, 8, 86, 2012.

MATOS, A. J.; LOPES, C.; CARVALHEIRA, J.; SANTOS, M.; RUTTEMAN, G. R.; GÄRTNER, F. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. **Journal of Comparative Pathology**, 134(2-3), 182–189, 2006.

NOSALOVA, N.; HUNIADI, M.; HORŇÁKOVÁ, L.; VALENČÁKOVÁ, A.; HORŇÁK, S.; NAGOOS, K.; VOZAR, J.; CIZKOVA, D. Canine mammary tumors: classification,

biomarkers, traditional and personalized therapies. **International journal of molecular sciences**, 25(5), 2891, 2024.

MEI, C.; LIU, Y.; LIU, Z.; ZHI, Y.; JIANG, Z.; LYU, X.; WANG, H. Dysregulated signaling pathways in canine mammary tumor and human triple negative breast cancer: advances and potential therapeutic targets. **International Journal of Molecular Sciences**, 26(1), 145, 2024.

MOORE, L.D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, 38(1), 23-38, 2013.

NUNES, F.C.; CAMPOS, C.B.; TEIXEIRA, S.V.; BERGTANOLLI, A.C.; LAVALLE, G.E.; CASSALI, G.D. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 70(6), 1714-1722, 2018.

OLIVEIRA, T. F.; MAUÉS, T.; RAMUNDO, M. S.; FIGUEIREDO, A. M. S.; DE MELLO, M. F. V.; EL-JAICK, K. B.; FERREIRA, M. L. G.; FERREIRA, A. M. R. TP53 gene expression levels and tumor aggressiveness in canine mammary carcinomas. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of The American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, 29(6), 865–868, 2017.

OSAKI, T.; SUNDEN, Y.; SUGIYAMA, A.; AZUMA, K.; MURAHATA, Y.; TSUKA, T.; ITO, N.; IMAGAWA, T.; OKAMOTO, Y. Establishment of a canine mammary gland tumor cell line and characterization of its miRNA expression. **Journal of Veterinary Science**, 17(3), 385–390, 2016.

OWEN L.N. TNM classification of tumours in domestic animals. **Geneve: World Health Organization**, 16-20, 1980.

PASTOR, N.; EZQUERRA, L. J.; SANTELLA, M.; CABALLÉ, N. C.; TARAZONA, R.; DURÁN, M. E. Prognostic significance of immunohistochemical markers and histological classification in malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, 18(4), 753–762, 2020.

PECILE, A.; GROPPETTI, D.; FERRARI, R.; GRIECO, V.; GIUDICE, C.; SPEDIACCI, C.; STEFANELLO, D. & BORACCHI, P. Solitary and multiple simultaneous malignant

epithelial mammary tumours in dogs: An explorative retrospective study. **Research in Veterinary Science**, 135, 153–161, 2021.

PEÑA, L.; DE ANDRÉS, P. J.; CLEMENTE, M.; CUESTA, P.; PÉREZ-ALENZA, M. D. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. **Veterinary Pathology**, 50(1), 94–105, 2013.

PEÑA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ABADIE, J.; BENAZZI, C.; CASTAGNARO, M.; DÍEZ, L.; GÄRTNER, F.; HELLMÉN, E.; KIUPEL, M.; MILLÁN, Y.; MILLER, M. A.; NGUYEN, F.; POLI, A.; SARLI, G.; ZAPPULLI, V.; DE LAS MULAS, J. M. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, 51(1), 127–145, 2014.

RAMADAN, E. S.; SALEM, N. Y.; EMAM, I. A.; ABDELKADER, N. A.; FARGHALI, H. A.; KHATTAB, M. S. MicroRNA-21 expression, serum tumor markers, and immunohistochemistry in canine mammary tumors. **Veterinary Research Communications**, 46(2), 377–388, 2022.

RAMOS, C.S. **Associação entre fatores epidemiológicos e neoplasias mamárias em cadelas**. 48 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

RAPOSO, L. R.; ROMA-RODRIGUES, C.; FAÍSCA, P.; ALVES, M.; HENRIQUES, J.; CARVALHEIRO, M. C.; CORVO, M. L.; BAPTISTA, P. V.; POMBEIRO, A. J.; FERNANDES, A. R. Immortalization and characterization of a new canine mammary tumour cell line FR37-CMT. **Veterinary and Comparative Oncology**, 15(3), 952–967, 2017.

RASK, L.; BALSLEV, E.; SØKILDE, R.; HØGDALL, E.; FLYGER, H.; ERIKSEN, J.; LITMAN, T. Differential expression of miR-139, miR-486 and miR-21 in breast cancer patients sub-classified according to lymph node status. **Cellular Oncology (Dordrecht, Netherlands)**, 37(3), 215–227, 2014.

RASOTTO, R.; BERLATO, D.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ZAPPULLI, V. Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: An observational cohort study of 229 cases. **Veterinary Pathology**, 54(4), 571–578, 2017.

RIVAS, M. A.; VENTURUTTI, L.; HUANG, Y. W.; SCHILLACI, R.; HUANG, T. H.; ELIZALDE, P. V. Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progesterin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development. **Breast Cancer Research: BCR**, 14(3), R77, 2012.

RODRÍGUEZ, J.; SANTANA, Á. HERRÁEZ, P. KILLICK, D. R.; DE LOS MONTEROS, A. E. Epidemiology of canine mammary tumours on the Canary Archipelago in Spain. **BMC Veterinary Research**, 18(1), 268, 2022.

SALVADOR-BERNABÉ, R. L.; TINUCCI-COSTA, M.; AMORIM, R. L. MicroRNA and cancer: a focus on mammary tumors in female dogs. **Ciência Rural**, 48(11), 2018.

SAMMARCO, A.; GOMIERO, C.; BEFFAGNA, G.; CAVICCHIOLI, L.; FERRO, S.; MICHIELETTO, S.; ORVIETO, E.; PATRUNO, M.; ZAPPULLI, V. Epithelial-to-mesenchymal transition and phenotypic marker evaluation in human, canine, and feline mammary gland tumors. **Animals: an open access journal from MDPI**, 13(5), 878, 2023.

SANTOS, M.; CORREIA-GOMES, C.; SANTOS, A.; DE MATOS, A.; ROCHA, E.; LOPES, C.; PEREIRA, P. D. Nuclear pleomorphism: role in grading and prognosis of canine mammary carcinomas. **Veterinary Journal**, 200(3), 426–433, 2014.

SAWAN, C.; VAISSIERE, T.; MURR, R.; HERCEG, Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutation Research**, 642(1-2), 1-13, 2008.

SENHORELLO, I. L. S.; TERRA, E. M.; SUEIRO, F. A. R.; FIRMO, B. F.; ANAI, L. A.; GOLONI, C.; CANAVARI, I. C.; AMPUERO, R. A. N.; PEREIRA, R. S.; TINUCCI-COSTA, M. Clinical value of carcinoembryonic antigen in mammary neoplasms of bitches. **Veterinary and Comparative Oncology**, 18(3), 315–323, 2020.

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

SOARES, E. D. S.; VALENTE, F. L.; ROCHA, C. C.; REAL PEREIRA, C. E.; SARANDY, T. B.; DE OLIVEIRA, F. L. D.; DE MORAIS CALADO, S. L.; BORGES, A. P. B. Prognostic factors for cancer-specific survival and disease-free interval of dogs with mammary carcinomas. **Veterinary Medicine International**, 4, 2023.

SORENMO, K. U.; DURHAM, A. C.; RADAELLI, E.; KRISTIANSEN, V.; PEÑA, L.; GOLDSCHMIDT, M. H.; STEFANOVSKI, D. The estrogen effect; clinical and histopathological evidence of dichotomous influences in dogs with spontaneous mammary carcinomas. **PloS one**, 14(10), e0224504, 2019.

SRISAWAT, W.; PRINGPROA, K.; PRACHASILCHAI, W.; THONGTHARB, A.; STHITMATEE, N. Epidemiology and classification for canine and feline mammary gland tumors: a histopathological survey of 437 mammary gland tumor biopsies performed in a secondary care hospital in Chiang Mai, Thailand from 2012 to 2019. **PeerJ**, 12, 2024.

STÜCKRATH, I.; RACK, B.; JANNI, W.; JÄGER, B.; PANTEL, K. & SCHWARZENBACH, H. Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients. **Oncotarget**, 6(15), 13387–13401, 2015.

TAVASOLY, A.; GOLSHAHI, H.; REZAIE, A.; FARHADI, M. Classification and grading of canine malignant mammary tumors. **Veterinary Research Forum**, 4(1), 25–30, 2013.

TERZAGHI, L.; BANCO, B.; GROPPETTI, D.; DALL'ACQUA, P. C.; GIUDICE, C.; PECILE, A.; GRIECO, V.; LODDE, V.; LUCIANO, A. M. Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) expression in canine mammary tumors: A preliminary study. **Research in Veterinary Science**, 132, 101–107, 2020.

VARALLO, G. R.; GELALETI, G. B.; MASCHIO-SIGNORINI, L. B.; MOSCHETTA, M. G.; LOPES, J. R.; DE NARDI, A. B.; TINUCCI-COSTA, M.; ROCHA, R. M.; DE

CAMPOS ZUCCARI, D. A. P. Prognostic phenotypic classification for canine mammary tumors. **Oncology Letters**, 18(6), 6545–6553, 2019.

VON DEETZEN, M. C.; SCHMECK, B. T.; GRUBER, A. D.; KLOPFLEISCH, R. Malignancy associated microRNA expression changes in canine mammary cancer of different malignancies. **ISRN Veterinary Science**, 2014, 148597, 2014.

WADDINGTON, C.H. The epigenotype. 1942. **International Journal of Epidemiology**, 41(1), 10-13, 2012.

WANG, D.; CAO, X.; HAN, Y.; YU, D. LncRNA SNHG9 is downregulated in non-small cell lung cancer and suppressed miR-21 through methylation to promote cell proliferation. **Cancer Management and Research**, 12, 7941–7948, 2020.

WEINHOLD B. Epigenetics: the science of change. **Environmental Health Perspectives**, 114(3), 160–167, 2006.

WICKRAMASINGHE, N. S.; MANAVALAN, T. T.; DOUGHERTY, S. M.; RIGGS, K. A., LI, Y.; KLINGE, C. M. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. **Nucleic Acids Research**, 37(8), 2584–2595, 2009.

XIA, H.; XIU, M.; GAO, J.; JING, H. LncRNA PLAC 2 downregulated miR-21 in non-small cell lung cancer and predicted survival. **BMC Pulmonary Medicine**, 19(1), 172, 2019.

XINYI, L.; JINLONG, L.; BIN, Z. Low-invasive biomarkers of canine mammary tumours. **Veterinary medicine and science**, 11(2), e70280, 2025.

YU, C.; ZHENG, H.; LIU, X.; XIE, G. The analysis of e-cadherin, n-cadherin, vimentin, HER-2, CEA, CA 15-3 and SF expression in the diagnosis of canine mammary tumors. **Animals: an open access journal from MDPI**, 12(21), 3050, 2022.

ZHANG, N.; WANG, X.; HUO, Q.; LI, X.; WANG, H.; SCHNEIDER, P.; HU, G. & YANG, Q. The oncogene metadherin modulates the apoptotic pathway based on the tumor necrosis factor superfamily member TRAIL (Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-

inducing Ligand) in breast cancer. **The Journal of Biological Chemistry**, 288(13), 9396–9407, 2013.