

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 02/02/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GLOBAL DE miRNA
EM CARCINOMAS MAMÁRIOS E LINFONODOS
METASTÁTICOS DE CADELAS**

Rosana Lino Salvador Bernabé

Médica Veterinária

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GLOBAL DE miRNA
EM CARCINOMAS MAMÁRIOS E LINFONODOS
METASTÁTICOS DE CADELAS**

Rosana Lino Salvador Bernabé

Orientadora: Profa. Dra. Renée Laufer Amorim

Coorientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária: Clínica Médica Veterinária

2018

B455 Bernabé, Rosana Lino Salvador
Análise do perfil de expressão global de miRNA em carcinomas
mamários e linfonodos metastáticos de cadelas / Rosana Lino
Salvador Bernabé. – – Jaboticabal, 2018
xii, 56 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Renée Laufer Amorim
Coorientador: Mirela Tinucci Costa
Banca examinadora: Carlos Eduardo Fonseca Alves, Andriago
Barboza De Nardi, Georgia Modé Magalhães, Paola Castro Moraes
Bibliografia

1. Cão. 2. Mama. 3. Carcinoma. 4. Metástase. 5. miRNA. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GLOBAL DE miRNA EM CARCINOMAS MAMÁRIOS E LINFONODOS METASTÁTICOS DE CADELAS

AUTORA: ROSANA LINO SALVADOR BERNABÉ

ORIENTADORA: RENEE LAUFER AMORIM

COORIENTADORA: MIRELA TINUCCI COSTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. RENEE LAUFER AMORIM
Departamento de Clínica Veterinária / FMVZ/UNESP-Botucatu/SP



Pós-doutorando CARLOS EDUARDO FONSECA ALVES
Depto. de Clínica Veterinária / FMVZ/UNESP - Botucatu/SP



Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. GEORGIA MODÉ MAGALHÃES
Medicina Veterinária / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Muzambinho/MG



Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV/UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 02 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ROSANA DA CRUZ LINO SALVADOR – nascida em dez de setembro de 1984, na cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, filha de Manuel Bernardino Lino Salvador e Cândida Carneiro da Cruz Salvador. Iniciou sua graduação no curso de Medicina Veterinária em março de 2003 na Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, tendo finalizado a mesma em agosto de 2008. Desenvolveu um projeto de iniciação científica, com bolsa PIBIC, sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Alberto Tudury. Durante a graduação, participou de cursos e realizou estágios relacionados com a área de Clínica Médica de Pequenos Animais. Ingressou no programa de aprimoramento profissional na área de Clínica e Cirurgia de pequenos animais no Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP, sob a orientação da Profa. Msc. Carla Daniela Dan de Nardo, durante o período de fevereiro de 2009 a janeiro de 2011. Ainda no ano de 2009, iniciou o curso de especialização em Oncologia Veterinária no Instituto Bioethicus em Botucatu-SP. Neste período, publicou artigos em periódicos e resumos científicos em anais de congressos. No ano de 2012, ingressou no mestrado no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-UNESP), campus de Jaboticabal-SP, sob a orientação da Profa. Dra. Renée Laufer Amorim. Palestras e aulas foram ministradas neste período. Durante o Programa de Pós-Graduação realizou também treinamento no setor de Oncologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, sob a coorientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. De outubro de 2013 a agosto de 2016 foi docente de Clínica Médica de Pequenos Animais na UNIRP-SP. Em março de 2014 foi aprovada no curso de Doutorado pelo mesmo programa de Pós-Graduação, sob orientação da Profa. Dra. Renée Laufer Amorim e coorientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Ministrou aulas e palestras, participou de congressos nacionais e internacionais com apresentação de trabalhos e publicou artigos na área de Oncologia Veterinária com seu grupo de pesquisa em periódicos nacionais e internacionais.

Aos meus pais, Manuel (in memorian) e Cândida, dedico.

AGRADECIMENTOS

Algumas coisas mudaram na caminhada até aqui e agradeço à Deus, força maior, por auxiliar na minha evolução espiritual e permitir que eu perceba a cada dia o que realmente faz sentido dentro do meu coração e da minha vida.

Aos meus amados pais, Manuel (*in memoriam*) e Cândida, por todo amor, apoio e dedicação. Vocês são seres ímpares na minha vida e saber que vocês estão ali sempre (fisicamente ou não) me deixa surpreendentemente mais forte. Gratidão eterna! E esse amor se estende aos meus irmãos, Lilian e Renato, que apesar da distância geográfica, o laço que nos une é uma fortaleza. Amo vocês.

Ao meu marido Caio, por todo amor, carinho, respeito, bom humor e amizade nesses anos juntos. Tenho que agradecer também pela paciência e por você compreender a minha ausência nos últimos meses. Você sempre será meu melhor amor. Amo você.

À minha orientadora Prof^a Dr^a. Renée Laufer Amorim, por me orientar por esses anos e por ser mais que uma orientadora, uma amiga. Obrigada pelo auxílio técnico, competência profissional, conselhos e apoio nas minhas decisões. Algo “não técnico” e muito importante que aprendi (talvez você não imagine o quanto) é que a nossa família é o presente que mais importa nas nossas vidas. Gratidão.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa, pelo aceite em me coorientar, por sempre me acolher nesta instituição e apoiar no que fosse preciso durante esses anos.

À Dra. Sandra Drigo Linde pelos ensinamentos técnicos sempre com muita empolgação e vontade de ensinar, por toda ajuda tão importante na execução deste trabalho. Gratidão também pelas conversas informais regadas de histórias de força e saudade.

Ao amigo Márcio de Carvalho, pela paciência nos ensinamentos, pela ajuda essencial e muito importante no experimento e pela amizade que com certeza irá permanecer. À Equipe do Laboratório Neogene – Unesp – Botucatu por sempre nos receber com alegria e respeito.

Ao Tiago Henrique da FAMERP por toda ajuda na análise de bioinformática e colaboração essencial neste trabalho.

À Profa. Silvia Rogatto por ter disponibilizado seu laboratório e equipe para auxiliar na execução deste trabalho.

Aos meus sogros, D. Marilene e Sr. Pedro por me acolherem como uma filha nessa família que tanto amo e que é um presente para mim. Agradeço aos cunhados Daniel, Thiago e Nati pela amizade e carinho. Aos meus sobrinhos e pimpolhos, Miguel e Lucas por sempre alegrar as nossas vidas.

Aos meus padrinhos Arlete, Marco e primo Rafael por todo apoio durante a minha caminhada e por me receberem sempre com muito carinho a cada volta à Aracaju. À minha amada família do Peru e do Rio de Janeiro que mesmo de longe enche de alegria as nossas vidas. Amo vocês.

Às minhas queridas amigas Erika, Marília e Cecília. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, por todas as risadas, momentos felizes (e tensos) juntas e pela amizade tão especial. As amigas que a UNIRP me deu: Carla, Karina e Talita pelo companheirismo, carinho, amizade e apoio diário. Esse carinho se estende à família de vocês. Amo vocês.

Aos meus queridos amigos de Rio Preto: Lucas, Araceli, Manuela, Juliana, Tonhão, Antônio Hamachi e Storti, pelos momentos de descontração, apoio e amizade tão especial. Vocês moram no meu coração.

Agradeço às minhas amadas “amigas de Aju”, Fernanda, Izadora, Mara, Priscila, Talita e Lekinha por tantos anos de amizade e companheirismo.

Aos amigos Cadu, Priscila, Luis Gabriel e Talita por me receberem sempre de braços abertos em Botucatu, pela parceria, ajuda e companheirismo.

Agradeço a toda equipe “oncológica” do SOV, em especial ao Prof. Andrigo Barboza de Nardi, Profa. Mirela Tinucci Costa e aos “oncolegas” da época em que participei da rotina: Erika, Letícia, Livia, Paulo, Giovanna, Talita, Rafael e Marília pela amizade e ajuda sempre.

Aos laboratórios VETPAT e Diagnovet pela disponibilidade em ceder as amostras utilizadas neste trabalho.

À Frida, minha filha salsicha de quatro patas pelo amor incondicional e por ser minha companheira diariamente. Obrigada por me ensinar a ser uma pessoa melhor.

À FAPESP pelo fornecimento do auxílio financeiro necessário para a **realização** deste trabalho (Processo 2013/25220-3).

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO CEUA.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
 CAPÍTULO 1– CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	 1
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	2
REVISÃO DA LITERATURA.....	3
REFERÊNCIAS.....	8
 CAPÍTULO 2- miRNA em tumor de mama de cadelas: revisão de literatura.....	 13
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS.....	22
 CAPÍTULO 3- Perfil de expressão global de miRNAs em carcinomas primários e na metástase em linfonodo em carcinomas mamários de cadelas.....	 26
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICE.....	53



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1.731/15 do trabalho de pesquisa intitulado "Estudo em larga escala de expressão gênica de linfonodos regionais metastáticos e não metastáticos de cadelas com carcinomas mamários", sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Renée Laufer Amorim está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de março de 2015.

Jaboticabal, 03 de março de 2015.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

Cfa: *canis familiaris*

CM: carcinoma mamário

CMM: carcinoma mamário metastático

CMM_met: metástase em linfonodo de carcinoma mamário

DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

DNA: Ácido desoxirribonucleico

FC: *Fold Change*

FDR: *False Discovery Rate*

FFEP: tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina

LS: Linfonodo sentinela

mRNA: RNA mensageiro

miRNA: microRNA

p value: Valor de p

PCA: *Principal Component Analysis*

PCR: reação em cadeia de polimerase

RMA: *Robust Multiarray Average*

RNA: Ácido Ribonucleico

RT-qPCR: reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real

SRD: sem raça definida

TAC: *Transcriptome Analysis Console*

TEM: Transição epitélio-mesenquimal

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados na validação dos miRNAs diferencialmente expressos por RT-qPCR.....	33
Tabela 2. Parâmetros clínicos e histopatológicos das cadelas com carcinoma mamário metastático e sua respectiva metástase nodal.....	34
Tabela 3. miRNAs identificados com expressão desregulada nas metástases linfonodais (CMM_met) em comparação com seus tumores primários mamários (CMM) pareados.....	38
Tabela 4 Principais vias canônicas relacionadas aos genes preditos diferencialmente expressos regulados pelo miRNA-205-5p.....	40
Tabela Suplementar 1 miRNAs identificados com expressão desregulada nas metástases linfonodais (CMM_met) em comparação com seus tumores primários mamários (CMM) pareados (arquivo de anotação cão).....	56

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 3

FIGURA 1. Expressão global de miRNAs em amostras de carcinoma primário (CMM) e suas metástases nodais (CMM_Met). **A.** Análise de componente principal (PCA) entre CMM (em vermelho) e CMM_Met (em azul). Imagem gerada no *software Expression Console 4.3 (Affymetrix)*. **B.** Análise da clusterização hierárquica. Dendograma demonstrando o agrupamento dos miRNAs diferencialmente expressos entre CMM e CMM_Met. As amostras do grupo CMM são representadas pela cor verde e o grupo CMM_Met pela cor laranja.....36

FIGURA 2. Gráfico de expressão relativa do miR-205-5p entre os grupos do carcinoma (CMM) e da metástase em linfonodo (CMM_met). Gráfico gerado pelo programa GraphPad Prism versão 6.01 utilizando teste t em dados não paramétricos (Mann-Whitney) com amostras pareadas.....39

FIGURA SUPLEMENTAR 1. Fotomicrografia representativa do carcinoma primário (CM) e sua respectiva metástase em linfonodo (CMM_Met) de cadelas. Carcinoma sólido, comedocarcinoma e carcinoma anaplásico corados com H&E (Hematoxilina e Eosina) (Aumento de 20x).....55

RESUMO

Os tumores mamários caninos são os tumores mais comuns em cadelas e são de grande relevância na oncologia veterinária. A metástase para o linfonodo regional é fator prognóstico que afeta negativamente o tempo de sobrevida dessas pacientes. Nos tumores mamários caninos existem poucos estudos que avaliam miRNA. Assim, este estudo teve como objetivo identificar miRNAs desregulados na metástase de carcinoma de mama em linfonodos, em comparação com amostras pareadas de tumores primários mamários caninos. Neste estudo pioneiro, o perfil de expressão global de miRNAs em amostras de carcinoma mamário canino e seus respectivos linfonodos metastáticos foram avaliados usando a plataforma de microarray de alta densidade da Affymetrix. Vinte e seis amostras de carcinomas mamários metastáticos (CMM) e 26 amostras de suas metástases de linfonodos regionais (CMM_met) foram analisadas. Dez miRNAs (miR-199a-3p, miR-199b-3p, miR-205-5p, miR-199a-5p, miR-195-5p, miR-152-3p, miR-497-5p, miR-27a-3p, miR-99a-5p e miR-27b-3p) foram detectados como diferencialmente expressos (todos com expressão diminuída) no grupo CMM_met em comparação com seus tumores primários. O miR-205-5p apresentou o menor valor de fold change (FC = -27,03, P = 0,001), confirmado posteriormente por RT-qPCR. A análise *in silico* identificou 120 genes alvos regulados pelo miRNA-205-5p. A análise de enriquecimento de vias revelou que esses genes participam de diferentes vias canônicas, como adesão celular, ciclo celular, miRNA no câncer, via de sinalização PI3K-AKT, p53 e adesão focal. Nossos dados indicam que assim como nos humanos, a regulação negativa de miR-205-5p está associada com a progressão metastática nos tumores mamários caninos. Além disso, a regulação negativa do miRNA-205-5p em lesões metastáticas pode modular genes envolvidos em diversas vias relacionadas ao câncer. Estes resultados podem orientar futuros estudos clínicos que avaliem este miRNA como uma ferramenta prognóstica em neoplasias mamárias metastáticas em cadelas.

Palavras-chave: cão, carcinoma, mama, metástase, miRNA

ABSTRACT

Canine mammary tumors are the most common tumor in female dogs and shows great relevance in Veterinary Oncology. Metastasis to the regional lymph node is a prognostic factor that negatively impacts the survival time of these patients. In canine mammary tumors there are few studies evaluating miRNAs expression. Thus, this study aimed to identify deregulated miRNAs in lymph node metastasis in comparison with paired canine mammary primary tumors. In this pioneering study, global miRNAs expression profile in paired canine mammary carcinoma samples and their metastatic lymph nodes were evaluated using the Affymetrix high-density microarray platform. Twenty-six samples of metastatic mammary carcinomas (MMC) and 26 samples of their respective regional lymph node metastasis (MMC_met) were analyzed. Ten miRNAs (miR-199a-3p, miR-199b-3p, miR-205-5p, miR-199a-5p, miR-195-5p, miR-152-3p, miR-497-5p, miR-27a-3p, miR-99a-5p and miR-27b-3p) were detected as differentially expressed (all down-regulated) in MMC_met compared with their primary tumors. The miR-205-5p, presenting the lowest fold change (FC=-27.03, P=0.001), was further confirmed by RT-qPCR. In silico analysis identified 120 target genes regulated by miRNA-205-5p. Enrichment analysis revealed that these genes participate in different pathways, such as cell adhesion, cell cycle, miRNA in cancer, PI3K-AKT signaling pathway, p53 and focal adhesion. Thus, our data indicate that like in humans, down-regulation of miRNA-205 can be associated with metastatic progression of canine mammary tumors. In addition, downregulation of miRNA-205-5p in metastatic lesions can modulate genes involved in cancer-related pathways. These results may guide future clinical studies evaluating this miRNA as a prognostic tool in metastatic mammary gland tumors in dogs.

Key-words: dog, carcinoma, mammary, metastasis, miRNA

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

INTRODUÇÃO

A prevalência do câncer em animais de companhia está aumentando (WITHROW; VAIL; PAGE, 2013), estimando-se que um em cada quatro cães e gatos virão a óbito devido à doença. Este aumento pode estar associado à melhoria da saúde e bem-estar, avanços na medicina veterinária com aumento na expectativa de vida e também no diagnóstico das neoplasias (DOBSON, 2011). Além desses fatores, é possível que a população de cães idosos também tenha aumentado, e junto a isso, a frequência na rotina clínica de doenças inerentes à idade, como o câncer.

Os tumores mamários caninos são os mais comuns em cadelas e de grande relevância na oncologia veterinária. No Brasil, já foi descrito que a incidência de tumores malignos seja superior a 50% (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; TORIBIO et al., 2012). Porém, dados da literatura americana descreveram que a incidência de tumores mamários malignos em cadelas é maior que 50% (SORENMO, 2003; SORENMO et al., 2013). É possível que a variação da incidência dessa neoplasia esteja associada à prática de castração nos diferentes países, já que a relação entre castração precoce e tumor de mama é relatada desde 1969, quando foi descrito que cadelas castradas até o segundo cio tem menor risco de desenvolver tumores de mama, com incidência variando de 0,5 a 8% de chance (SCHNEIDER et al., 1969).

Na prática clínica, em cadelas com tumores mamários malignos, um dos fatores prognósticos mais importantes é a detecção da metástase no linfonodo regional (axilares ou inguinais), que pode conferir risco maior para a disseminação metastática à distância, afetando negativamente o tempo de sobrevida dessas pacientes (SZCZUBIAŁ et al., 2011; SANTOS et al., 2013; DE ARAÚJO et al., 2015; CARVALHO et al., 2016). Baseado no estadiamento clínico, na presença da metástase em linfonodo, a paciente já é classificada no estadio clínico IV de V, sendo este de suma importância como indicador de prognóstico e na definição sequencial do tratamento (SORENMO et al., 2013).

A avaliação de marcadores moleculares também foi aplicada no estudo de metástases de linfonodos de tumores mamários caninos (DE MATOS et al., 2007;

BEHA et al., 2012). Porém, apesar da vasta literatura abordando os eventos moleculares em carcinoma mamário humano e suas metástases linfonodais, em carcinoma mamário canino há escassez de estudos, principalmente avaliando o perfil global de miRNAs em tumores primários caninos e suas metástases.

Pesquisas já constatarem a expressão diferencial dos miRNAs ao comparar células tumorais e células normais. Em alguns tipos de câncer, miRNAs específicos apresentam níveis de expressão diferenciados desde a carcinogênese até invasão e metástase. Os miRNAs podem agir tanto em oncogenes quanto genes supressores de tumor colaborando com a formação tumoral em ambos os casos (DI LEVA et al., 2014; REDDY, 2015).

Alguns estudos já foram desenvolvidos em cães avaliando os níveis de expressão de miRNAs em hemangiossarcomas (GRIMES et al., 2016), leucemia linfocítica crônica (GIOIA et al., 2011), melanomas (NOGUCHI et al., 2011; STARKEY et al., 2017), carcinomas prostáticos (KOBAYASHI et al., 2017) e neoplasias mamárias (BOGGS et al., 2008; VON DEETZEN et al., 2014; KRÓL et al., 2014; LUTFUL et al., 2015; OSAKI et al., 2016; BULKOWSKA et al., 2017), porém a avaliação do perfil global de miRNA em carcinomas primários e sua respectiva metástase nodal ainda não foi relatada.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil global de miRNAs em carcinomas mamários de cadelas e suas metástases buscando identificar perfis de miRNAs associados à metástase.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar o que a literatura atual relata sobre os miRNAs em cadelas com neoplasias mamárias;
- Analisar o perfil de expressão de miRNAs e identificar os miRNAs diferencialmente expressos em carcinomas mamários metastáticos de cadelas e em seus respectivos linfonodos metastáticos;
- Selecionar os miRNAs candidatos envolvidos no processo metastático e confirmar os resultados pelo método de RT-qPCR.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; DAMASCENO, K. A.; GAMBA, C. O.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. **Res Vet Sci.**, v.106, p.121–130, 2016.

BEHA, G., BRUNETTI, B.; ASPRONI, P.; MUSCATELLO, L.V.; MILLANTA, F.; POLI, A.; SARLI, G.; BENAZZI, C. Molecular portrait-based correlation between primary canine mammary tumor and its lymph node metastasis: possible prognostic-predictive models and/or stronghold for specific treatments? **BMC Veterinary Research**, v.8, p.1-9, 2012.

BESERRA, H. E. O.; GRANDI, F.; IBANEZ, F. J.; ROCHA, N. S.; PINHEIRO L. G. P. Sentinel lymph node identification: the importance of new methodologies and preclinical studies in dogs. **Braz. J. Vet. Pathol.** v. 6, n. 1, p. 5, 2013.

BOGGS, R. M.; WRIGHT, Z. M.; STICKNEY, M. J.; PORTER, W. W.; MURPHY, K. E. MicroRNA expression in canine mammary cancer. **Mamm Genome**, v. 19, p. 561-569, 2008.

BULKOWSKA, M. et al. MicroRNA expression patterns in canine mammary cancer show significant differences between metastatic and non-metastatic tumours. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 728, 2017.

BORGE, K. S.; BORRESEN-DALE, A. L.; LINGAAS, F. Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 241–250, 2011.

CARVALHO, M. I.; PIRES I.; PRADA J; LOBO L; QUEIROGA FL. Ki-67 and PCNA Expression in Canine Mammary Tumors and Adjacent Nonneoplastic Mammary Glands: Prognostic Impact by a Multivariate Survival Analysis. **Vet Pathol.** v.53, p.1–9, 2016.

CASSALI, G. D; LAVALLE G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. **Braz J Vet Pathol**, v. 7, n. 2, p.38-69, 2014.

CHANG, S. C.; CHANG, C. C.; CHANG, T. J.; WONG, M. L. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 227, n. 10, p. 1625–1629, 2005.

DE ARAÚJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; FERREIRA, E; CASSALI, G. D. Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. **J Vet Intern Med.** v. 29, p.1360–1367, 2015.

DE MATOS, A. J. F.; LOPES, C. C. C.; FAUSTINO, A. M. R.; CARVALHEIRA, J. G. V.; RUTTEMAN, G. R.; GÄRTNER, M. F. R. M. E-cadherin, β -catenin, invasion and

lymph node metastases in canine malignant mammary tumours. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. v. 115, p.327-334, 2007.

DE NARDI, A. B. et al. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2016. cap. 40, p. 499-516.

DI LEVA, G.; GAROFALO M.; CROCE, C. M. MicroRNAs in cancer. **Annu Rev Pathol**.v. 9, p.87-314, 2014.

DOBSON, J. M. Introduction: Cancer in cats and dogs. In: DOBSON, J. M.; LASCELLES, B. D. X. (Eds.). **BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology**. 3. ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2011. p. 1–5.

EGENVALL, A.; BONNETT, B. N.; OHAGEN, P.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, A; VON EULER, H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in sweden from 1995 to 2002. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 69, n. 1-2, p. 109–127, 2005.

GIOIA, G.; MORTARINO, M.; GELAIN, M.E.; ALBONICO, F.; CIUSANI, E.; FORNO, I.; MARCONATO, L.; MARTINIA, V.; COMAZZIA, S. Immunophenotype-related microRNA expression in canine chronic lymphocytic leukemia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 142, p.228– 235, 2011.

GRIMES, J. A.; Nripesh Prasad, Shawn Levy, Russell Cattley, Stephanie Lindley¹, Harry W. Boothe¹, Ralph A. Henderson¹ and Bruce F. Smith. A comparison of microRNA expression profiles from splenic hemangiosarcoma, splenic nodular hyperplasia, and normal spleens of dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 12, p. 272, 2016.

HELLMÉN, E.; BERGSTRÖM, R.; HOLMBERG, L.; SPÅNGBERG, I.B.; HANSSON, K.; LINDGREN, A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. **Veterinary Pathology**, v. 30, p.20-27, 1993.

KARLSSON, M. C.; GONZALEZ, S. F.; WELIN, J.; FUXE, J. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis through the lymphatic system. **Mol Oncol**. v.11, p.781–791, 2017.

KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. **Veterinary Pathology**, New York, v. 46, p. 416–422, 2009.

KOBAYASHI, M.; SAITO, A.; TANAKA, Y.; MICHISHITA, M.; KOBAYASHI, M.; IRIMAJIRI, M.; KANEDA, T.; OCHIAI, K.; BONKOBARA, M.; TAKAHASHI K.; HORI T.; KAWAKAMI, E. **MicroRNA expression profiling in canine prostate cancer**. J Vet Med Sci., v. 79, n. 4, p.719-725, 2017.

KRÓL, M.; MUCHA, J.; MAJCHRZAK, K.; HOMA, A.; BULKOWSKA, M.; MAJEWSKA, A.; GAJEWSKA, M.; PIETRZAK, M.; PERSZKO, M.; ROMANOWSKA, K.; PAWŁOWSKI, K.; MANUALI, E.; HELLMEN, E.; MOTYL T. Macrophages mediate a switch between canonical and non-canonical Wnt pathways in canine mammary tumors. *PLoS One*, v. 9, n. 1, e83995, 2014.

KURZMAN, I. D.; GILBERTSON, S.R. Prognostic factors in canine mammary tumors. **Semin Vet Med Surg (Small Animal)**, v. 1, p.25–32, 1986.

LUTFUL, K. F. M.; DEINNOCENTES, P.; BIRD, R. C. Altered microRNA Expression Profiles and Regulation of INK4A/CDKN2A Tumor Suppressor Genes in Canine Breast Cancer Models. **J Cell Biochem**, v. 116, n. 12, p. 2956-69, 2015.

MISDORP, W. **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat**. 2. ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999, 59p.

NIETO, A.; PEÑA, L.; PÉREZ-ALENZA, M. D. et al. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: Clinical and pathologic associations and prognostic significance. **Vet Pathol**, v.37, p.239–247, 2000.

NOGUCHI, S.; MORI, T.; HOSHINO, Y.; YAMADA, N.; MARUO, K.; AKAO, Y. MicroRNAs as tumour suppressors in canine and human melanoma cells and as a prognostic factor in canine melanomas. *Vet Comp Oncol*. v. 11, n. 2, p. 113-23, 2013.

OLIVEIRA, L.; OLIVEIRA, R.; LORETTI, A.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, n. 2, p. 105–110, 2003.

OLIVEIRA-FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, M. F. P. P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 30, n. 2, p. 177–185, 2010.

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. **J Vet Sci**, v. 17, n. 3, p.385-390, 2016.

PATEL, S. A.; VANHARANTA, S. Epigenetic determinants of metastasis. **Mol Oncol**. v. 11, n.1, p. 79–96, 2016.

PÉREZ-ALENZA, M. D.; PEÑA, L.; NIETO A. I.; CASTAÑO M. Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. **Ann Ist Super Sanita**, v. 33, p. 581–585, 1997.

PHILIBERT, J. C.; SNYDER, P. W.; GLICKMAN, N.; GLICKMAN, L. T.; KNAPP, D. W.; WATERS, D. J. Influence of Host Factors on Survival in Dogs with Malignant

Mammary Gland Tumors. **Journal of veterinary internal medicine**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 102–106, 2003.

PINHEIRO, L. G. P.; MORAES, M. O.; SOARES, A. H.; LOPES, A. J. T.; NAGUÉRE, M. A. S. P.; GONDIM, F. A. L.; BRANDÃO, C. B.; NASCIMENTO, D. C. H.; SOARES, J. P. H.; MENESES E SILVA, J. M. Estudo Experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e tecnécio Tc99. **Acta Cir. Bras.** v.18,p.545-552, 2003.

PINHEIRO, L.G. P.; OLIVEIRA FILHO, R. S.; VASQUES, P. H.; FILGUEIRA, P. H.; ARAGÃO, D. H.; BARBOSA, P. M.; BESERRA, H. E.; CAVALCANTE, R. V. Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. **Acta Cir. Bras.**, v.24, p.432-436, 2009.

REDDY, K. B. MicroRNA (miRNA) in cancer. **Cancer Cell Int.** 15: 38, 2015.

SANTOS, A. A.; LOPES, C. C.; RIBEIRO, J. R.; MARTINS, L. R.; SANTOS, J. C.; AMORIM, I. F. et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Vet Res**, v. 9, p. 1746–61, 2013.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of National Cancer Institute**, Bethesda, v. 43, n. 6, p. 1249–1261, 1969.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice**, Philadelphia, v. 33, n. 3, p. 573–596, 2003.

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

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the mammary gland. In: **Small Animal Clinical Oncology**. 5th. ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2013. p. 538–547.

SOUZA, F. W.; BRUN, M. V.; NARDI, A. B.; HUPPES, R. R.; RAPOSO, T. M. M.; KASPER, P. N.; OLIVEIRA, M. T.; GUEDES, R. L. Linfadenectomia laparoscópica em cadela com neoplasia mamária. **Ciênc. Rural**. v. 43, p. 750-753, 2013.

STARKEY, M. P.; COMPSTON-GARNETT, L.; MALHO, P.; DUNN, K.; DUBIELZIG, R. Metastasis-associated microRNA expression in canine uveal melanoma. **Vet Comp Oncol**, p. 1-9, 2017.

SZCZUBIAŁ, M.; ŁOPUSZYNSKI W. Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. **Vet Comp Oncol**. v. 9, p.296–303, 2011.

TORÍBIO, J.M.M.L.; ESTRELA-LIMA, A.; MARTINS FILHO, E.F.; RIBEIRO, L.G.R.; D'ASSIS, M.J.M.H.; TEXEIRA, R.G.; DAMASCENO, K. A.; CASSALI, G.D.; COSTA NETO, J.M. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição

geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, BA. **Revista Ceres (Online)**, v. 59, p. 427-432, 2012.

VASCELLARI, M.; CAPELLO, K.; CARMINATO, A.; ZANARDELLO, C.; BAIONI, E.; MUTINELLI, F. Incidence of Mammary Tumors in the canine population living in the veneto region (Northeastern Italy): risk factors and similarities to human breast cancer. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 126, p. 183–189, 2016.

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 Vet Sci**, Article ID 148597, p.1-5, 2014

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. Why worry about cancer in companion animals? In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. (Eds.). **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 5. ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2013. p. xv–xvi.

YAMAGAMI T.; KOBAYASHI T.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. **J Vet Med Sci**. v. 58, 1079–1083, 1996.

Conclusão

Considerando a alta casuística de neoplasias mamárias de cadelas na rotina clínica veterinária e a importância dos miRNAs nos processos associados à tumorigênese, revisamos o papel dos miRNAs no câncer com foco especial nas neoplasias mamárias de cadelas, descrevendo resultados de estudos nesta espécie.

REFERENCIAS

- ALMA D., C.-P. *et al.* Micro-RNAs as Potential Predictors of Response to Breast Cancer Systemic Therapy: Future Clinical Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, 2 jun. 2017. v. 18, n. 6, p. 1182. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1182>>.
- ASIAF, A.; AHMAD, S. T.; ARJUMAND, W. **MicroRNA and Cancer**. New York, NY: Springer New York, 2018. V. 1699.
- BLENKIRON, C. *et al.* MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. **Genome biology**, 2007. v. 8, n. 10, p. R214. Disponível em: <<http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2007-8-10-r214>>.
- BOCKHORN, J. *et al.* MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11. **Nature Communications**, 22 jan. 2013. v. 4, p. 1393. Disponível em: <[doi:10.1038/ncomms2393](https://doi.org/10.1038/ncomms2393)>.
- BOGGS, R. M. *et al.* MicroRNA expression in canine mammary cancer. **Mammalian Genome**, 30 ago. 2008. v. 19, n. 7–8, p. 561–569. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00335-008-9128-7>>.
- BULKOWSKA, M. *et al.* MicroRNA expression patterns in canine mammary cancer show significant differences between metastatic and non-metastatic tumours. **BMC Cancer**, 7 dez. 2017. v. 17, n. 1, p. 728. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3751-1>>.
- CALIN, G. A. *et al.* A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, 27 out. 2005. v. 353, n. 17, p. 1793–1801. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa050995#t=articleTop>>.
- CALIN, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2 mar. 2004. v. 101, n. 9, p. 2999–3004. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0307323101>>.
- CHEN, J. *et al.* Down-regulation of microRNA-200c is associated with drug resistance in human breast cancer. **Medical Oncology**, 19 dez. 2012. v. 29, n. 4, p. 2527–2534. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12032-011-0117-4>>.
- DEETZEN, M.-C.VON *et al.* Malignancy Associated MicroRNA Expression Changes

in Canine Mammary Cancer of Different Malignancies. **ISRN Veterinary Science**, 2014. v. 2014, p. 1–5. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4060554&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GARZON, R.; CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNAs in Cancer. **Annual Review of Medicine**, fev. 2009. v. 60, n. 1, p. 167–179. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.med.59.053006.104707>>.

GRIMES, J. A. *et al.* A comparison of microRNA expression profiles from splenic hemangiosarcoma, splenic nodular hyperplasia, and normal spleens of dogs. **BMC Veterinary Research**, 3 dez. 2016. v. 12, n. 1, p. 272. Disponível em: <<http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-016-0903-5>>.

HU, Z.; CHEN, X.; ZHAO, Y.; TIAN, T.; JIN, G.; SHU Y, *et al.* Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 10, p.1721-1726, 2010.

IORIO, M. V. *et al.* MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. **Cancer Research**, 15 ago. 2005. v. 65, n. 16, p. 7065–7070. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783>>.

IORIO, M. V.; CROCE, C. M. microRNA involvement in human cancer. **Carcinogenesis**, 1 jun. 2012. v. 33, n. 6, p. 1126–1133. Disponível em: <<https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgs140>>.

KASINSKI, A. L.; SLACK, F. J. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, 24 nov. 2011. v. 11, n. 12, p. 849–864. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3166>>.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 1 fev. 2009. v. 10, n. 2, p. 126–139. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm2632>>.

KOBAYASHI, M. *et al.* MicroRNA expression profiling in canine prostate cancer. **Journal of Veterinary Medical Science**, 2017. v. 79, n. 4, p. 719–725. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/79/4/79_16-0279/_article>.

KRÓL, M. *et al.* Macrophages Mediate a Switch between Canonical and Non-Canonical Wnt Pathways in Canine Mammary Tumors. **PLoS ONE**, 3 jan. 2014. v. 9,

n. 1, p. e83995. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0083995>>.

LEVA, G. DI; GAROFALO, M.; CROCE, C. M. MicroRNAs in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 24 jan. 2014. v. 9, n. 1, p. 287–314. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24079833>>.

LI, L. *et al.* Regulation of breast cancer tumorigenesis and metastasis by miRNAs. **Expert review of proteomics**, 9 dez. 2012. v. 9, n. 6, p. 615–25. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23256672>>.

LUTFUL KABIR, F. M.; DEINNOCENTES, P.; BIRD, R. C. Altered microRNA Expression Profiles and Regulation of INK4A/CDKN2A Tumor Suppressor Genes in Canine Breast Cancer Models. **Journal of Cellular Biochemistry**, dez. 2015. v. 116, n. 12, p. 2956–2969. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.25243>>.

MA, L.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WEINBERG, R. A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. **Nature**, 11 out. 2007. v. 449, n. 7163, p. 682–688. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature06174>>.

MA, L. *et al.* Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. **Nature Biotechnology**, 28 abr. 2010. v. 28, n. 4, p. 341–347. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351690>>.

NOGUCHI, S. *et al.* MicroRNAs as tumour suppressors in canine and human melanoma cells and as a prognostic factor in canine melanomas. **Veterinary and Comparative Oncology**, jun. 2013. v. 11, n. 2, p. 113–123. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/vco.306>>.

OSAKI, T. *et al.* Establishment of a canine mammary gland tumor cell line and characterization of its miRNA expression. **Journal of Veterinary Science**, 30 set. 2016. v. 17, n. 3, p. 385. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26726024>>.

REDDY, K. B. MicroRNA (miRNA) in cancer. **Cancer cell international**, 2 dez. 2015. v. 15, n. 1, p. 38. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25960691>>.

RYBICKA A.; MUCHA, J.; MAJCHRZAK, K.; TACIAK, B.; HELLMEN, E.; MOTYI, T.; KROL, M. Analysis of microRNA expression in canine mammary cancer stem-like cells indicates epigenetic regulation of transforming growth factor-beta signaling. **J Physiol Pharmacol**, v. 66, n. 1, p.29-37, 2015.

- 392 STARKEY, M. P. *et al.* Metastasis-associated microRNA expression in canine uveal
393 melanoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, 17 maio. 2017. n. March, p. 1–
394 9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28512868>>.
- 395 WAGNER, S. *et al.* Comparison of non-coding RNAs in human and canine cancer.
396 **Frontiers in Genetics**, 2013. v. 4, n. April, p. 1–9. Disponível em:
397 <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2013.00046/abstract>>.
- 398 XUE, J. *et al.* MiRNA-621 sensitizes breast cancer to chemotherapy by suppressing
399 FBXO11 and enhancing p53 activity. **Oncogene**, 28 jan. 2016. v. 35, n. 4, p. 448–
400 458. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/onc.2015.96>>.

CONCLUSÃO

Identificamos a diminuição da expressão do miRNA-205-5p na metástase de carcinoma de mama em linfonodo quando comparado ao carcinoma primário de cadelas, resultado semelhante ao carcinoma mamário de mulheres no qual já houve descrição do envolvimento deste miRNA na doença metastática. Considerando que o tumor de mama é o mais frequente nas cadelas, este achado pode contribuir para futuras pesquisas avaliando a progressão metastática em cadelas com tumores de mama buscando fatores prognósticos e preditivos.

REFERÊNCIAS

1. Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J, et al. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*. 2009;10: 135. doi:10.1186/1471-2164-10-135.
2. Klopffleisch R, Lenze D, Hummel M, Gruber AD. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC Cancer*. 2010;10: 618. doi:10.1186/1471-2407-10-618.
3. Rivera P, von Euler H. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Vet Pathol*. 2011;48: 132–146. doi:10.1177/0300985810387939.
4. Matos AJF, Baptista CS, Gärtner MF, Rutteman GR. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. *Vet J*. Elsevier Ltd; 2012;193: 24–31. doi:10.1016/j.tvjl.2011.12.019.
5. Karlsson MC, Gonzalez SF, Welin J, Fuxe J. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis through the lymphatic system. *Mol Oncol*. 2017;11: 781–791. doi:10.1002/1878-0261.12092.
6. Szczubiał M, Łopuszynski W. Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet Comp Oncol*. 2011;9: 296–303. doi:10.1111/j.1476-5829.2011.00268.x.
7. Santos A a, Lopes CC, Ribeiro JR, Martins LR, Santos JC, Amorim IF, et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Vet Res*. 2013;9: 1746–61. doi:10.1186/1746-6148-9-1.
8. De Araújo MR, Campos LC, Ferreira E, Cassali GD. Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. *J Vet Intern Med*. 2015;29: 1360–1367. doi:10.1111/jvim.13576.
9. Carvalho MI, Pires I, Prada J, Lobo L, Queiroga FL. Ki-67 and PCNA Expression in Canine Mammary Tumors and Adjacent Nonneoplastic Mammary

- Glands: Prognostic Impact by a Multivariate Survival Analysis. *Vet Pathol.* 2016;53: 1–9. doi:10.1177/0300985816646429.
10. Patel SA, Vanharanta S. Epigenetic determinants of metastasis. *Mol Oncol.* 2016;11: 79–96. doi:10.1016/j.molonc.2016.09.008.
11. Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell Int.* 2015;15: 38. doi:10.1186/s12935-015-0185-1.
12. Leva G Di, Garofalo M, Croce CM. microRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2014;9: 287–314. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104715.microRNAs.
13. Król M, Mucha J, Majchrzak K, Homa A, Bulkowska M, Majewska A, et al. Macrophages mediate a switch between canonical and non-canonical wnt pathways in canine mammary tumors. *PLoS One.* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0083995.
14. Lutful Kabir FM, DeInnocentes P, Bird RC. Altered microRNA Expression Profiles and Regulation of INK4A/CDKN2A Tumor Suppressor Genes in Canine Breast Cancer Models. *J Cell Biochem.* 2015;116: 2956–2969. doi:10.1002/jcb.25243.
15. Osaki T, Sunden Y, Sugiyama A, Azuma K, Murahata Y, Tsuka T, et al. Establishment of a canine mammary gland tumor cell line and characterization of its miRNA expression. *J Vet Sci.* 2016;17: 385–390. doi:10.4142/jvs.2016.17.3.385.
16. Boggs RM, Wright ZM, Stickney MJ, Porter WW, Murphy KE. MicroRNA expression in canine mammary cancer. *Mamm Genome.* 2008;19: 561–569. doi:10.1007/s00335-008-9128-7.
17. von Deetzen M-C, Schmeck BT, Gruber AD, Klopffleisch R. Malignancy Associated MicroRNA Expression Changes in Canine Mammary Cancer of Different Malignancies. *ISRN Vet Sci. Hindawi Publishing Corporation;* 2014;2014: 148597. doi:10.1155/2014/148597.

18. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011;48: 117–131. doi:10.1177/0300985810393258.
19. Pena L, De Andres PJ, Clemente M, Cuesta P, Perez-Alenza MD. 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. *Vet Pathol.* 2012;50: 94–105. doi:10.1177/0300985812447830.
20. Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods.* 2007;3: 12. doi:10.1186/1746-4811-3-12.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods.* 2001;25: 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
22. Chou CH, Chang NW, Shrestha S, Hsu S Da, Lin YL, Lee WH, et al. miRTarBase 2016: Updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res.* 2016;44: D239–D247. doi:10.1093/nar/gkv1258.
23. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2008;4: 44–57. doi:10.1038/nprot.2008.211.
24. Weigelt B, Wessels LF a, Bosma a J, Glas a M, Nuyten DS a, He YD, et al. No common denominator for breast cancer lymph node metastasis. *Br J Cancer.* 2005;93: 924–932. doi:10.1038/sj.bjc.6602794.
25. Weigelt B, Glas AM, Wessels LFA, Witteveen AT, Peterse JL, van't Veer LJ. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100: 15901–15905. doi:10.1073/pnas.2634067100.

26. Sleeman JP. The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res.* 2000;157: 55–81. doi:10.1007/978-3-642-57151-0_6.
27. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol.* 2012 Dec;6(6):590-610.
28. Berber U, Yilmaz I, Narli G, Haholu A, Kucukodaci Z, Demirel D. MiR-205 and miR-200c: Predictive micro RNAs for lymph node metastasis in triple negative breast cancer. *J Breast Cancer.* 2014;17: 143–148. doi:10.4048/jbc.2014.17.2.143.
29. Stankevicius L, Barat A, Dessen P, Vassetzky Y, De Moura Gallo C V. The microRNA-205-5p is correlated to metastatic potential of 21T series: A breast cancer progression model. *PLoS One.* 2017;12: 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0173756.
30. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008;10: 593–601. doi:10.1038/ncb1722
31. Chao CH, Chang CC, Wu MJ, Ko HW, Wang D, Hung MC, et al. MicroRNA-205 signaling regulates mammary stem cell fate and tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2014;124: 3093–3106. doi:10.1172/JCI73351.
32. Wu H, Zhu S, Mo YY. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res.* 2009;19: 439-448. doi: 10.1038/cr.2009.18.
33. Savad S, Mehdipour P, Miryounesi M, Shirkoohi R, Fereidooni F, Mansouri F, et al. Expression analysis of miR-21, miR-205, and miR-342 in breast cancer in Iran. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2012;13: 873–877. doi:10.7314/APJCP.2012.13.3.873.
34. Radojicic J, Zaravinos A, Vrekoussis T, Kafousi M, Spandidos DA, Stathopoulos EN. MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer. *Cell Cycle.* 2011;10: 507–517. doi:10.4161/cc.10.3.14754.

35. Kim SY, Kawaguchi T, Yan L, Young J, Qi Q, Takabe K. Clinical Relevance of microRNA Expressions in Breast Cancer Validated Using the Cancer Genome Atlas (TCGA). *Ann Surg Oncol*. Springer International Publishing; 2017; doi:10.1245/s10434-017-5984-2.
36. Luo D, Wilson JM, Harvel N, Liu J, Pei L, Huang S, et al. A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells. *J Transl Med. Journal of Translational Medicine*; 2013;11: 57. doi:10.1186/1479-5876-11-57.
37. Wang Z. ErbB Receptor Signaling [Internet]. Wang Z, editor. New York, NY: Springer New York; 2017. doi:10.1007/978-1-4939-7219-7.
38. Adachi R, Horiuchi S, Sakurazawa Y, Hasegawa T, Sato K, Sakamaki T. ErbB2 down-regulates microRNA-205 in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. Elsevier Inc.; 2011;411: 804–808. doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.033.
39. Araújo MR, Campos LC, Damasceno KA, Gamba CO, Ferreira E, Cassali GD. HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. *Res Vet Sci*. Elsevier B.V.; 2016;106: 121–130. doi:10.1016/j.rvsc.2016.03.020.
40. Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, et al. UKPMC Funders Group dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. 2010;26: 6979–6988. doi:10.1038/sj.onc.1210508.
41. Karihtala P, Auvinen P, Kauppila S, Haapasaari KM, Jukkola-Vuorinen A, Soini Y. Vimentin, ZEB1 and SIP1 are up-regulated in triple-negative and basal-like breast cancers: Association with an aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138: 81–90. doi:10.1007/s10549-013-2442-0.
42. Gamba CO, Campos LC, Negreiros-Lima GL, Maciel-Lima K, Sousa LP, Estrela-Lima A, et al. ZEB2 and ZEB1 expression in a spontaneous canine model of invasive micropapillary carcinoma of the mammary gland. *Res Vet Sci*. Elsevier Ltd; 2014;97: 554–559. doi:10.1016/j.rvsc.2014.09.016.

43. Al-Harris ES, Al-Janabi AAA, Al-Toriahi KM, Yasseen AA. Over expression of vascular endothelial growth factor in correlation to Ki-67, grade, and stage of breast cancer. *Saudi Med J.*; 2008;29:1099-104.
44. Mohammed RAA, Green A, Paish EC, Ellis IO, Martin SG. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. 2007; 1092–1100. doi:10.1038/sj.bjc.6603678.
45. Mylona E, Alexandrou P, Mpakali A, Giannopoulou I, Liapis G, Markaki S, et al. Clinicopathological and prognostic significance of vascular endothelial growth factors (VEGF)-C and -D and VEGF receptor 3 in invasive breast carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33: 294–300. doi:10.1016/j.ejso.2006.10.015.
46. Santos A, Lopes C, Gärtner F, Matos AJF. VEGFR-2 expression in malignant tumours of the canine mammary gland: A prospective survival study. *Vet Comp Oncol.* 2014; 1–10. doi:10.1111/vco.12107.
47. Raposo-Ferreira TMM, Salvador RCL, Terra EM, Ferreira JH, Vechetti-Junior IJ, Tinucci-Costa M, et al. Evaluation of vascular endothelial growth factor gene and protein expression in canine metastatic mammary carcinomas. *Microsc Res Tech.* 2016;79: 1097–1104. doi:10.1002/jemt.22763.
48. Qiu CW, Lin DG, Wang JQ, Li CY, Deng GZ. Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. *Vet Res Commun.* 2008;32: 463–472. doi:10.1007/s11259-008-9049-7.
49. Ghaffari A, Hoskin V, Szeto A, Hum M, Liaghati N, Nakatsu K, et al. Erratum to : “ A novel role for ezrin in breast cancer angio / lymphangiogenesis .” 2015; 13058. doi:10.1186/s13058-014-0511-x.
50. Bartova M, Hlavaty J, Tan Y, Singer C, Pohlodek K, Luha J, et al. Expression of ezrin and moesin in primary breast carcinoma and matched lymph node metastases. *Clin Exp Metastasis.* Springer Netherlands; 2017;34: 333–344. doi:10.1007/s10585-017-9853-y.

51. Piovani C, Palmieri D, Di Leva G, Braccioli L, Casalini P, Nuovo G, et al. Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer. *Mol Oncol*. 2012;6: 458–472. doi:10.1016/j.molonc.2012.03.003.
52. Grossoni VC, Todaro LB, Kazanietz MG, De Kier Joffé EDB, Urtreger AJ. Opposite effects of protein kinase C beta1 (PKC β 1) and PKCepsilon in the metastatic potential of a breast cancer murine model. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;118: 469–480. doi:10.1007/s10549-008-0299-4.
53. Spring K, Fournier P, Lapointe L, Chabot C, Roussy J, Pommey S, et al. The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ promotes breast cancer cell invasion and metastasis. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2015;34: 5536–5547. doi:10.1038/onc.2015.9.
54. Takeda T, Yamamoto H, Kanzaki H, Suzawa K, Yoshioka T, Tomida S, et al. Yes1 signaling mediates the resistance to Trastuzumab/Lapatinib in breast cancer. *PLoS One*. 2017;12: 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0171356.
55. Kasinski AL, Slack FJ. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2011;11: 849–864. doi:10.1038/nrc3166
56. Asiaf A, Ahmad ST, Arjumand W. MicroRNA and Cancer [Internet]. Wu W, editor. New York, NY: Springer New York; 2018. doi:10.1007/978-1-4939-7435-1