

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/06/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Avaliação de potenciais miRNAs Circulantes como Marcadores
Prognósticos e Preditivos de Metástases em Cadelas com
Neoplasias Mamária**

LUIZ GUILHERME DERCORE BENEVENUTO

Botucatu – SP

Julho/2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Avaliação de potenciais miRNAs Circulantes como Marcadores
Prognósticos e Precoces de Metástases em Cadelas com
Neoplasias Mamária**

LUIZ GUILHERME DERCORE BENEVENUTO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista como pré-requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Profº.Drº. Carlos Eduardo
Fonseca Alves

Botucatu – SP

Julho/2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Benevenuto, Luiz Guilherme Dercore.

Avaliação de potenciais miRNAs circulantes como marcadores prognósticos e preditivos de metástases em cadelas com neoplasias mamária / Luiz Guilherme Dercore Benevenuto. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Capes: 50503022

1. Marcadores bioquímicos. 2. Mamas - Câncer. 3. MicroRNAs. 4. Neoplasias em animais.

Palavras-chave: Biomarcadores; Neoplasia mamária; microRNAs.

Nome do autor: Luíz Guilherme Dercore Benevenuto

Título: AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS miRNAs CIRCULANTES COMO MARCADORES PROGNÓSTICOS E PRECOSES DE METÁSTASES EM CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIA

BANCA EXAMINADORA

Profº. Drº. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Presidente e Orientador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu /SP.

Profº. Drº. Heidge Fukumasu

Membro

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP – Campus de Pirassununga/SP.

Profª. Drª. Sarah Santiloni Cury

Membro

Instituto de Biociências – UNESP – Campus de Botucatu/SP.

Data da defesa: 04 de julho de 2023.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº: 2021/11958-7) que possibilitou o desenvolvimento deste projeto, corroborando sempre com o desenvolvimento da pesquisa no país.

Agradeço aos meus pais, Renata Aparecida Dercore Benevenuto e Luiz Alberto Benevenuto (*in memorian*), que com seus esforços diários priorizaram minha educação em todas as etapas da minha formação, sempre buscando o melhor que poderiam oferecer dentre suas possibilidades. Obrigado por todo esforço e por todas as renúncias pessoais para que eu pudesse trilhar este caminho a qual estou hoje.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves, por todo apoio e diversos ensinamentos e direcionamentos passados em diversos momentos desde o início da execução deste projeto, de forma única e admirável. Espero poder contribuir à ciência e a academia científica com o mesmo entusiasmo e excelência, bem como um dia ter a oportunidade de transformar a vida de um aluno, do jeito que o senhor transformou a minha ao acreditar no meu potencial.

Deixo registrado meus agradecimentos as minhas amigas: Gabriele Silva Dias e Zara Alves Lacerda, que serão lembradas sempre com muito carinho, uma vez responsáveis por todo apoio, risadas e conversas durante esse percurso. Agradeço por se fazerem presente em todos os momentos em que eu mais precisei.

Ao setor de Patologia Animal e Reprodução Animal, do Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP – Botucatu que colaboraram para execução desse projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
CAPÍTULO 1.....	ix
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Câncer	3
2.2 Regulação da expressão gênica no câncer.....	5
2.3 miRNA	6
2.4 Biogênese dos miRNAs.....	6
2.5 Mecanismos de ação dos miRNAs.....	7
2.6 Neoplasia mamária.....	9
2.6.1 Epidemiologia e aspectos etiopatogênicos	9
2.6.2 Classificação histopatológica e graduação tumoral	10
2.6.3 Estadiamento clínico	13
2.6.4 Potencial metastático	14
2.6.5 Diagnóstico e biomarcadores	15
2.6.6 miRNA como biomarcador sérico em neoplasias mamárias.....	17
3. REFERÊNCIAS	20
HIPOTESE.....	30
OBJETIVOS.....	30
Gerais.....	30
Específicos	30
CAPÍTULO 2.....	31
ARTIGO I	32
ABSTRACT	32
1. INTRODUCTION	33
2. BIOMARKERS IN CANCER	34
3. microRNAs.....	34

4. CIRCULATING microRNAs IN BREAST CANCER.....	37
5. CONCLUSION	39
REFERENCES.....	39
CAPÍTULO 3.....	46
ARTIGO II	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1 Comitê de ética no uso de animais.....	49
2.2 Metanálise e análise in silico para identificação de miRNAs.....	49
2.3 Seleção das amostras	50
2.4 Total RNA extraction.....	50
2.5 Análise de miRNA expresso diferencialmente em tecido por PCR em tempo real (RT-qPCR).....	51
2.1 Análise estatística.....	51
3. RESULTADOS.....	52
3.1 Dados clínicos e histopatológico	52
3.2 Identificação de alvos in silico	53
3.3 Perfil de expressão dos miRNAs em carcinoma e adenoma mamário	55
4. DISCUSSÃO.....	56
5. CONCLUSÃO	58
6. REFERENCIAS	59

RESUMO

As neoplasias mamárias em cães representam o grupo mais frequente de tumores encontrados na rotina médico veterinária. São neoplasias potencialmente malignas e comportamento biológico variável, com metástases ocorrendo em 25 a 50% dos casos. Devido ao seu comportamento agressivo, há atualmente uma busca por biomarcadores diagnósticos precoce de metástase e marcadores prognósticos que auxiliem na prática clínica de modo a corroborar para o aumento da sobrevida dos pacientes diagnosticados com a doença. Dentre as características desejadas em um marcador, buscam-se por moléculas com alta especificidade e que possam ser mensuradas através de técnicas que apresentem reprodutibilidade e baixo custo, de modo a ser utilizada em larga escala. Neste contexto, este estudo objetiva avaliar os diferentes níveis de expressão tecidual de miRNA em cadelas diagnosticadas com neoplasias mamárias e associá-los com diversos fatores clínico-patológicos. A expressão do perfil dos miRNAs miR-127-3p, miR-409-3p, miR-4270, miR-133a e miR-652 foi avaliada através da técnica de RT -qPCR, elegendo possíveis alvos a serem explorados de modo sistêmico em plasma. Nossos dados indicam que a regulação negativa de miR-4270 pode estar associada ao processo de carcinogênese, uma vez observada uma diminuição de sua expressão em carcinomas mamários, sendo potencial candidato a ser explorado em plasma. Além disso, a regulação negativa de miR-133a e miR-409 em neoplasias mamárias pode estar associado a progressão tumoral, uma vez que os dados apontam expressão reduzida desse alvo em relação ao grupo controle. Logo, estes resultados podem indicar dois potenciais alvos com expressão desregulada a serem explorados como ferramenta prognóstica em neoplasias mamária em cadelas.

Palavras-chave: neoplasia mamária, microRNAs, biomarcadores.

ABSTRACT

Mammary neoplasms in dogs represent the most frequent group of tumors in the veterinary medicine. They are potentially malignant neoplasms with variable biological behavior, with metastases occurring in 25 to 50% of cases. Due to its aggressive behavior, there is currently a search for early diagnostic biomarkers of metastasis and prognostic markers to corroborate the increase in survival of patients diagnosed with the disease. Among the desired characteristics in a biomarker, molecules with high specificity that can be measured using techniques that are reproducible and low cost are sought, in order to be used on a large scale. In this context, this study aims to evaluate the different levels of tissue expression of miRNA in female dogs diagnosed with mammary neoplasms and to associate them with several clinicopathological factors. The expression profile of the miRNAs miR-127-3p, miR-409-3p, miR-4270, miR-133a and miR-652 was evaluated using the RT -qPCR technique, electing possible targets to be explored in plasma. Our data indicate that the negative regulation of miR-4270 may be associated with the carcinogenesis process, since a decrease in its expression was observed in breast carcinomas, making it a potential candidate to be explored in plasma. Furthermore, the negative regulation of miR-133a and miR-409 in breast neoplasms may be associated with tumor progression, since the data indicate reduced expression of this target in relation to the control group. Therefore, these results may indicate two potential targets with deregulated expression to be explored as a prognostic tool in mammary neoplasms in dogs.

Keywords: breast cancer, microRNAs, biomarker.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer de mama em mulheres é um importante problema de saúde pública em todo o mundo, sendo a principal causa de mortalidade relacionada ao câncer (SUNG et al., 2021). A incidência anual é estimada em 1 a 2 milhões de casos, afetando aproximadamente 10 a 12% da população feminina globalmente e resultando em aproximadamente 500.000 mortes anualmente (SUNG et al., 2021). Vários estudos destacaram a semelhança entre o câncer de mama canino e o humano (ABADIE et al., 2018). Estima-se que cerca de 50% dos tumores diagnosticados em cadelas sejam neoplasias mamárias e a maioria é maligno (SORENMO et al., 2011). Além disso, a disseminação de metástases para linfonodos e órgãos distantes, como pulmão e ossos, é uma ocorrência frequente em cadelas com tumores mamários malignos (BROOK et al., 2018)

A prevenção e o diagnóstico precoce desempenham um papel crucial tanto para mulheres quanto para cadelas. Estudos ressaltam a importância do rastreamento regular em mulheres para detectar tumores mamários precocemente e melhorar o prognóstico (DUFFY et al., 2020). Da mesma forma, em cadelas, o diagnóstico precoce de lesões mamárias por meio de exames clínicos pode aumentar as chances de tratamento bem-sucedido (BURRAI et al., 2020).

No câncer de mama em mulheres e cadelas, há uma constante busca de biomarcadores para melhorar a detecção precoce, estratificar o risco, orientar o tratamento e monitorar a resposta terapêutica. Define-se biomarcadores como biomoléculas mensuráveis que podem ser utilizadas para indicar a presença, progressão ou resposta ao tratamento de uma determinada condição fisiológica ou patológica (CALIFF, 2018).

Diversos biomarcadores de impacto clínico foram descritos no câncer de mama em humanos, como os receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (SPURDLE et al., 2014). A presença ou ausência desses biomarcadores tem implicações importantes para o prognóstico e para a escolha do tratamento adequado. Similar busca por marcadores tem sido realizada para o câncer de mama de cadelas, incluindo os receptores de estrogênio e progesterona, além do HER2,

(TERRY et al., 2019). Além disso, outros biomarcadores, como Ki-67, p53 e Bcl-2, têm sido estudados para avaliar a atividade proliferativa, e a apoptose das células tumorais de mama em cadelas (WANG et al., 2017)

A identificação e o uso de biomarcadores no câncer de mama têm o potencial de melhorar a individualização do tratamento, permitindo uma abordagem mais personalizada e direcionada para cada paciente. No entanto, é importante ressaltar que a validação e o uso clínico desses biomarcadores atualmente explorados requerem estudos adicionais e a consideração de fatores específicos de cada espécie.

Neste âmbito, a utilização de biomarcadores de diagnóstico precoce tem potencial para definir um prognóstico mais acurado, além de serem úteis no monitoramento do curso da doença. A utilização de microRNAs no câncer de mama tem sido extensivamente investigada, e estudos têm explorado o papel dessas pequenas moléculas de RNA na patogênese, diagnóstico, prognóstico e terapia da doença (FARINA et al., 2017; TARIGHATI; KEIVAN; MAHANI, 2022; VIEIRA et al., 2018).

Pesquisas recentes identificaram alterações no perfil de expressão de microRNAs em amostras de câncer de mama, indicando seu potencial como biomarcadores. Em 2010, Heneghan et al. já haviam demonstrado que a expressão elevada do microRNA-21 estava associada a um prognóstico desfavorável em pacientes com câncer de mama (HENECHAN et al., 2010). Estudos posteriores baseados na análise de múltiplos microRNAs, como o estudo de Pichiorri et al. (2013), revelaram padrões específicos de expressão associados a diferentes subtipos de câncer de mama, contribuindo para a classificação e estratificação dos pacientes (PICHIORRI et al., 2013)

Estudos pré-clínicos demonstraram resultados promissores na utilização de microRNAs como estratégia terapêutica, a exemplo do trabalho de Wang et al. (2020), que investigaram a inibição do microRNA-10b em modelos de câncer de mama in vitro e in vivo, revelando uma redução significativa na proliferação e migração das células tumorais (WANG et al., 2020). A administração de miméticos de microRNAs, como observado no estudo de Chen et al. (2018), mostrou efeitos inibitórios no crescimento tumoral em modelos experimentais (CHEN et al., 2018).

Os perfis de expressão de microRNAs em cadelas com câncer de mama têm também sido investigados. Utthawong et al. (2016) e Sánchez-Céspedes et al. (2019) identificaram microRNAs diferencialmente expressos em tumores de mama caninos, destacando seu potencial como biomarcadores para diagnóstico e prognóstico da doença em cadelas. Ho et al. (2017) demonstraram que a inibição de certos microRNAs conhecidos como oncomirs pode suprimir o crescimento e a progressão do câncer de mama em cadelas. A inibição do cfa-miR-21 resultou na redução da proliferação celular e na indução da apoptose em células de câncer de mama canino (HO et al., 2017).

Embora esses estudos forneçam evidências preliminares promissoras, é importante destacar que a utilização de microRNAs como terapia no câncer de mama em cadelas ainda está em estágios iniciais. São necessários estudos que permitam a identificação de microRNAs para serem utilizados como biomarcadores e alvos terapêuticos e para avaliar sua aplicabilidade clínica. Estes estudos podem permitir o estabelecimento de abordagens terapêuticas eficazes e seguras para o tratamento do câncer de mama em cadelas.

5. CONCLUSÃO

Identificamos diminuição da expressão do miRNA cfa-miR-4270, cfa-miR-133a e cfa-miR-409 em pacientes diagnosticados com neoplasia mamária, o que indica seu possível papel como gene supressor tumoral no processo de carcinogênese, além de uma tendência no aumento da expressão de cfa-miR-127-3p em adenomas mamários. Logo, estes microRNAs representam potenciais biomarcadores a serem investigados de modo sérico, configurando dentre os alvos escolhidos neste estudo, potenciais miRNAs a serem explorados de modo sistêmico.

7. REFERÊNCIAS

- ABDELMEGEED, S. M.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). **Oncology Letters**, v. 15, n. 6, p. 8195–8205, 2018.
- ACHKAR, N. P.; CAMBIAGNO, D. A.; MANAVELLA, P. A. miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 12, p. 1034–1044, 2016.
- ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 415–421, 2013.
- ALVAREZ-GARCIA, I.; MISKA, E. A. MicroRNA functions in animal development and human disease. **Development**, v. 132, n. 21, p. 4653–4662, 2005.
- ALVAREZ, C. E. Naturally occurring cancers in dogs: Insights for translational genetics and medicine. **ILAR Journal**, v. 55, n. 1, p. 16–45, 2014.
- AXTELL, M. J.; WESTHOLM, J. O.; LAI, E. C. Art_10.1186_Gb-2011-12-4-221. p. 1–13, 2011.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.
- BERNSTEIN, E. et al. Dicer is essential for mouse development. **Nature Genetics**, v. 35, n. 3, p. 215–217, 2003.
- BOGGS, R. M. et al. MicroRNA expression in canine mammary cancer. **Mammalian Genome**, v. 19, n. 7–8, p. 561–569, 2008.
- BONNETT, B. N. et al. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 46, n.

3, p. 105–120, 2005.

BRAY, F. et al. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. **Cancer**, v. 127, n. 16, p. 3029–3030, 2021.

BRIGGS, J. A. et al. The dynamics of gene expression in vertebrate embryogenesis at single-cell resolution. **Science**, v. 360, n. 6392, 2018.

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. 1–17, 2017.

CALIFF, R. M. Biomarker definitions and their applications. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 3, p. 213–221, 2018.

CAO, G. H. et al. Low expression of miR-409-3p is a prognostic marker for breast cancer. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 20, n. 18, p. 3825–3829, 2016.

CASSALI, G. D. et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine and feline mammary tumors-2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 13, n. 3, p. 555–574, 2020.

CHEN, J. et al. miR-127 regulates cell proliferation and senescence by targeting BCL6. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–9, 2013.

CORTEZ, M. A. et al. MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, n. 8, p. 467–477, 2011.

CUK, K. et al. Plasma MicroRNA Panel for Minimally Invasive Detection of Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013a.

CUK, K. et al. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 7, p. 1602–1612, 2013b.

DEL VESCOVO, V. et al. MicroRNAs as lung cancer biomarkers. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 4, p. 604–620, 2014.

DI LEVA, G.; GAROFALO, M.; CROCE, C. M. MicroRNAs in cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, n. September 2013, p. 287–314, 2014.

DIAZ-MORALLI, S. et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology**

and Therapeutics, v. 138, n. 2, p. 255–271, 2013.

DOENCH, J. G.; SHARP, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. **Genes and Development**, v. 18, n. 5, p. 504–511, 2004.

FABBRI, M. et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 40, p. 15805–15810, 2007.

FEINBAUM, R.; AMBROS, V.; LEE, R. The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to lin-14. **Cell**, v. 116, n. 116, p. 843–854, 1993.

FILHO, J. D. E. M.; LINO, R.; BERNABÉ, S. **Análise do perfil de expressão global de miRNA em carcinomas mamários e linfonodos metastáticos de cadelas**. [s.l: s.n.].

FRIEDMAN, J. M. et al. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. **Cancer Research**, v. 69, n. 6, p. 2623–2629, 2009.

GAO, C. et al. Bone biomaterials and interactions with stem cells. **Bone Research**, v. 5, n. May, p. 1–33, 2017.

GODFREY, A. C. et al. Serum microRNA expression as an early marker for breast cancer risk in prospectively collected samples from the Sister Study cohort. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 3, 2013a.

GODFREY, A. C. et al. Serum microRNA expression as an early marker for breast cancer risk in prospectively collected samples from the Sister Study cohort. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 3, p. R42, 2013b.

GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011.

GONZALEZ-VILLASANA, V. et al. Presence of Circulating miR-145 , miR-155 , and miR-382 in Exosomes Isolated from Serum of Breast Cancer Patients and Healthy Donors. v. 2019, 2019.

GRAY, M. et al. Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. April, p. 1–17, 2020.

GUILHARDUCCI, R. L. et al. Expression of LIN28A/B and Let-7 miRNAs in canine

mammary carcinomas. **Ciência Rural**, v. 52, n. 10, 2022.

HALKOVA, T. et al. MicroRNAs in pancreatic cancer: Involvement in carcinogenesis and potential use for diagnosis and prognosis. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2015, 2015.

HAMAM, R. et al. microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–8, 2016.

HAMPE, J. F.; MISDORP, W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 50, n. 1–2, p. 111–133, 1974.

HAN, J. et al. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. **Cell**, v. 125, n. 5, p. 887–901, 2006.

HANAHAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.

HARATI, R. et al. Combinatorial targeting of microRNA-26b and microRNA-101 exerts a synergistic inhibition on cyclooxygenase-2 in brain metastatic triple-negative breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 187, n. 3, p. 695–713, 2021.

HENEGHAN, H. M. et al. Circulating micrnas as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. **Annals of Surgery**, v. 251, n. 3, p. 499–505, 2010.

HUANG, Q. et al. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. v. 10, n. 2, 2008.

IGAZ, P. et al. MicroRNAs in adrenal tumors: Relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 3, p. 417–428, 2015.

JORDAN-ALEJANDRE, E. et al. Potential miRNA Use as a Biomarker: From Breast Cancer Diagnosis to Metastasis. **Cells**, v. 12, n. 4, p. 1–18, 2023.

KASZAK, I. et al. Current biomarkers of canine mammary tumors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 60, n. 1, p. 1–13, 2018.

KIM, M. Y. Breast Cancer Metastasis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1187, p. 183–204, 2021.

KLOPFLEISCH, R. et al. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: News from

an old disease. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 98–116, 2011.

KLOPFLEISCH, R.; WEISS, A. T. A.; GRUBER, A. D. Excavation of a buried treasure - DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. **Histology and Histopathology**, v. 26, n. 6, p. 797–810, 2011.

LAGOS-QUINTANA, M. et al. New microRNAs from mouse and human. **Rna**, v. 9, n. 2, p. 175–179, 2003.

LEE, H. M.; NGUYEN, D. T.; LU, L. F. Progress and challenge of microRNA research in immunity. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. JUN, p. 1–8, 2014.

LEE, H. Y. et al. Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 13, p. 6568–6576, 2013.

LI, X. X. et al. Reduced expression levels of let-7c in human breast cancer patients. **Oncology Letters**, v. 9, n. 3, p. 1207–1212, 2015.

LIU, C. The role of microRNAs in tumors. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 10, p. 1169–1177, 2013.

LIU, X. et al. miR-155 promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition of MCF-7 cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 21, n. 3, p. 1–7, 2021.

LU, M. et al. Combined detection of plasma MIR-127-3p and HE4 improves the diagnostic efficacy of breast cancer. **Cancer Biomarkers**, v. 18, n. 2, p. 143–148, 2017.

LÜNINGSSCHRÖR, P. et al. MicroRNAs in pluripotency, reprogramming and cell fate induction. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 8, p. 1894–1903, 2013.

LUO, J. et al. A novel panel of microRNAs provides a sensitive and specific tool for the diagnosis of breast cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 2, p. 785–791, 2014.

MA, E. et al. Coordinated activities of human dicer domains in regulatory RNA processing. **Journal of Molecular Biology**, v. 422, n. 4, p. 466–476, 2012.

MA, L.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WEINBERG, R. A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. v. 449, n. October, 2007.

MALUMBRES, M. MiRNAs and cancer: An epigenetics view. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 4, p. 863–874, 2013.

MATHONNET, G. et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. **Science**, v. 317, n. 5845, p. 1764–1767, 2007.

MIRANDA, G. M. D. et al. O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 19, n. 3, p. 507–519, 2016.

NG, E. K. O. et al. Circulating microRNAs as Specific Biomarkers for Breast Cancer Detection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 4–13, 2013.

OBR, A. E.; EDWARDS, D. P. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 357, n. 1–2, p. 4–17, 2012.

ORANG, A. V.; SAFARALIZADEH, R.; KAZEMZADEH-BAVILI, M. Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. **International Journal of Genomics**, v. 2014, n. June 2013, 2014.

OSAKI, T. et al. Establishment of a canine mammary gland tumor cell line and characterization of its miRNA expression. **Journal of veterinary science**, v. 17, n. 3, p. 385–390, 2016.

PEROU, C. M.; BORRESEN-DALE, A. L. Systems biology and genomics of breast cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 2, p. 1–17, 2011.

PHAM, J. W. et al. A Dicer-2-Dependent 80S Complex Cleaves Targeted mRNAs during RNAi in Drosophila. v. 117, p. 83–94, 2004.

PINELLO, K. C. et al. The Global Initiative for Veterinary Cancer Surveillance (GIVCS): Report of the first meeting and future perspectives. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, n. 2, p. 141–142, 2020.

PRATT, A. J.; MACRAE, I. J. The RNA-induced silencing complex: A versatile gene-silencing machine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 27, p. 17897–17901, 2009.

PRITCHARD, C. C.; CHENG, H. H.; TEWARI, M. MicroRNA profiling: Approaches and considerations. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 5, p. 358–369, 2012.

RIVERA, P. et al. Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. v. 2, n. 30, p. 8770–8774, 2009.

ROBERTSON, K. D. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. In: **DNA Methylation**

and Cancer Therapy. [s.l: s.n.]. p. 13–30.

ROTH, C. et al. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 6, p. 6–13, 2010.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival. v. 25, 1969.

SEHOVIC, E. et al. Meta-analysis of diagnostic cell-free circulating microRNAs for breast cancer detection. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 1–23, 2022.

SEN, G. L.; BLAU, H. M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 6, p. 633–636, 2005.

SHAKER, O. et al. Role of microRNAs -29b-2, -155, -197 and -205 as diagnostic biomarkers in serum of breast cancer females. **Gene**, v. 560, n. 1, p. 77–82, 2015.

SHEN, J. et al. Circulating miR-148b and miR-133a as biomarkers for breast cancer detection. **Oncotarget**, v. 5, n. 14, p. 5284–5294, 2014.

SHENOUDA, S. K.; ALAHARI, S. K. MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor? **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 3–4, p. 369–378, 2009.

SILVA., J. A. G. DA. **Estimate/2020 – Cancer Incidence in Brazil**. [s.l: s.n.].

SLEECKX, N. et al. Canine mammary tumours, an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1112–1131, 2011.

SONG, X.; WEI, C.; LI, X. The Signaling Pathways Associated With Breast Cancer Bone Metastasis. **Frontiers in Oncology**, v. 12, n. March, p. 1–11, 2022.

SUI, Y. et al. MicroRNA-133a acts as a tumour suppressor in breast cancer through targeting LASP1. p. 473–482, 2018.

SUN, Y. et al. Serum MicroRNA-155 as a Potential Biomarker to Track Disease in Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–8, 2012.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TARIGHATI, E.; KEIVAN, H.; MAHANI, H. A review of prognostic and predictive biomarkers in breast cancer. **Clinical and Experimental Medicine**, n. 0123456789, 2022.

TAYLOR, M. A. et al. TGF- β upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 150–163, 2013.

TORRES, C. G.; ITURRIAGA, M. P.; CRUZ, P. Hormonal carcinogenesis in canine mammary cancer: Molecular mechanisms of estradiol involved in malignant progression. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 1–12, 2021.

TURAJLIC, S.; SWANTON, C. Metastasis as an evolutionary process. **Science**, v. 352, n. 6282, p. 169–175, 2016.

VARALLO, G. R. et al. Prognostic phenotypic classification for canine mammary tumors. **Oncology Letters**, v. 18, n. 6, p. 6545–6553, 2019.

VASCELLARI, M. et al. 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**, v. 126, p. 183–189, 2016.

VON DEETZEN, M.-C. et al. Malignancy Associated MicroRNA Expression Changes in Canine Mammary Cancer of Different Malignancies. **ISRN Veterinary Science**, v. 2014, p. 1–5, 2014.

WANG, L.; WANG, J. MicroRNA-mediated breast cancer metastasis: From primary site to distant organs. **Oncogene**, v. 31, n. 20, p. 2499–2511, 2012.

WANG, P. Y. et al. Higher expression of circulating miR-182 as a novel biomarker for breast cancer. **Oncology Letters**, v. 6, n. 6, p. 1681–1686, 2013.

WANG, W.; LUO, Y. PING. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 16, n. 1, p. 18–31, 2015.

WELLNER, U. et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 12, p. 1487–1495, 2009.

WEN, X.; DENG, F.-M.; WANG, J. MicroRNAs as predictive biomarkers and therapeutic targets in prostate cancer. **American journal of clinical and experimental urology**, v. 2, n. 3, p. 219–30, 2014.

WU, Z. SHENG et al. Loss of miR-133a expression associated with poor survival of breast cancer and restoration of miR-133a expression inhibited breast cancer cell growth and invasion. **BMC Cancer**, v. 12, p. 1–10, 2012.

ZENG, R. C. et al. Down-regulation of miRNA-30a in human plasma is a novel marker for breast cancer. **Medical Oncology**, v. 30, n. 1, 2013.

ZHANG, G. et al. MIR-409-3p suppresses breast cancer cell growth and invasion by targeting Akt1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 2, p. 189–195, 2016.

ZHANG, X. et al. Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1–29, 2019.

ZHAOA, F. L. et al. Serum overexpression of microRNA-10b in patients with bone metastatic primary breast cancer. **Journal of International Medical Research**, v. 40, n. 3, p. 859–866, 2012.

ZHU, W. et al. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. v. 5, p. 1–5, 2009.

ZOGRAFOS, E. et al. Prognostic role of microRNAs in breast cancer: A systematic review. **Oncotarget**, v. 10, n. 67, p. 7156–7178, 2019.

ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 207–215, 2008.