

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**Avaliação de biomarcadores como indicador de malignidade e de progressão tumoral em neoplasias mamárias caninas**

Jéssica Lelis de Miranda  
*Doctor Scientiae*

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**  
**2024**

**JÉSSICA LELIS DE MIRANDA**

**Avaliação de biomarcadores como indicador de malignidade e de progressão tumoral em neoplasias mamárias caninas**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Fabricio Luciani Valente

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Miranda, Jéssica Lelis de, 1991-  
M672a Avaliação de biomarcadores como indicador de  
2024 malignidade e de progressão tumoral em neoplasias mamárias  
caninas / Jéssica Lelis de Miranda. – Viçosa, MG, 2024.  
1 tese eletrônica (39 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Fabrício Luciani Valente.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Veterinária, 2024.

Referências bibliográficas: f. 32-39.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.085>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cães - Doenças. 2. Câncer em animais. 3. Mamas -  
Câncer. 4. Neoplasias - Veterinária. 5. Marcadores genéticos.  
I. Valente, Fabrício Luciani, 1980-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.70896994

**JÉSSICA LELIS DE MIRANDA**

**Avaliação de biomarcadores como indicador de malignidade e de progressão tumoral em neoplasias mamárias caninas**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 24 de julho de 2024.

Assentimento:

---

Jéssica Lelis de Miranda  
Autora

---

Fabricio Luciani Valente  
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 24/02/2025 às 19:52:34 e pelo orientador em 25/02/2025 às 09:09:54. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **6T47.PADT.3OKM** e clique no botão 'Validar documento'.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa por todo o aprendizado, desde a graduação, e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade concedida. Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de financiamento para execução do projeto.

Aos meus pais, Ricardo e Cleunice, e meu irmão, Walter. Aos amigos que estiveram presentes durante toda a jornada, que me escutaram e me deram o apoio que, por muitas vezes, foi necessário. Ao Victor, que sempre me incentivou e me faz acreditar no meu potencial.

Ao professor e orientador Fabrício, por todo o conhecimento, apoio, incentivo e paciência.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Veterinária, por toda a ajuda e convivência.

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

## RESUMO

MIRANDA, Jéssica Lelis de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024. **Avaliação de biomarcadores como indicador de malignidade e de progressão tumoral em neoplasias mamárias caninas.** Orientador: Fabricio Luciani Valente.

As neoplasias mamárias são os tumores mais comuns em cadelas e, de acordo com a Veterinary Society of Surgical Oncology (VSSO), representam, atualmente, aproximadamente 42% das neoplasias diagnosticadas na medicina veterinária. Por mais que a avaliação histológica dos nódulos seja o padrão ouro para diagnóstico, inúmeros grupos de pesquisa visam o aprimoramento e desenvolvimento de novas técnicas. Além da análise morfológica, a patologia molecular vem ganhando espaço na oncologia, adicionando informações ao diagnóstico histopatológico e aos fatores preditivos e prognósticos já estabelecidos. Na oncologia, a expressão aumentada de CRYAB, CD9 e CD63 é relacionada a um comportamento agressivo tumoral, associada à progressão, transição epitelial-mesenquimal, infiltração inflamatória, menor sobrevida e recidivas mais prováveis em diversos tumores. Esta tese é dividida em dois capítulos, sendo o primeiro uma revisão sistemática sobre biomarcadores prognósticos de neoplasias mamárias caninas. No segundo capítulo, a avaliação imuno-histoquímica da expressão de CRYAB, CD63 e CD69 em neoplasias mamárias caninas foi realizada, coletando fragmentos de nódulos dos animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa entre 2021 e 2022. Observou-se que CRYAB e CD63 apresenta variações significativas em relação à graduação histológica e ao tamanho do tumor. Por outro lado, CD9 não apresentou diferenças significativas na expressão ou intensidade entre as graduações histológicas, mas sua intensidade mostrou uma correlação positiva significativa com o tamanho do tumor, sugerindo que o CD9 pode estar envolvido na progressão tumoral e no crescimento, apesar de não ser um marcador específico para a graduação histológica. Mais estudos são necessários para determinação do real valor dessas proteínas como biomarcadores em pacientes com neoplasias mamárias.

Palavras-chave: Oncologia veterinária; biomarcador; alfa B-cristalina, CD63, CD9.

## ABSTRACT

MIRANDA, Jéssica Lelis de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2024. **Evaluation of biomarkers as indicator of malignancy and progression in canine mammary tumors.** Adviser: Fabricio Luciani Valente.

Mammary neoplasms are the most common tumors in female dogs and, according to the Veterinary Society of Surgical Oncology (VSSO), currently account for approximately 42% of neoplasms diagnosed in veterinary medicine. Although histological evaluation of nodules remains the gold standard for diagnosis, numerous research groups are focused on improving and developing new diagnostic techniques. In addition to morphological analysis, molecular pathology has been gaining prominence in oncology, providing complementary information to histopathological diagnosis and established predictive and prognostic factors. In oncology, increased expression of CRYAB, CD9, and CD63 has been associated with aggressive tumor behavior, including progression, epithelial-mesenchymal transition, inflammatory infiltration, shorter survival, and higher recurrence rates in various tumors. This dissertation is divided into two chapters: the first presents a systematic review of prognostic biomarkers in canine mammary neoplasms. The second chapter involves the immunohistochemical evaluation of CRYAB, CD63, and CD9 expression in canine mammary neoplasms, analyzing tissue samples from nodules collected from animals treated at the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa between 2021 and 2022. The results revealed that CRYAB and CD63 exhibit significant variations concerning histological grade and tumor size. Conversely, CD9 did not show significant differences in expression or intensity across histological grades; however, its intensity demonstrated a significant positive correlation with tumor size, suggesting that CD9 may be involved in tumor progression and growth, despite not being a specific marker for histological grading. Further studies are necessary to determine the true value of these proteins as biomarkers in patients with mammary neoplasms.

Keywords: Veterinary oncology; biomarker; alpha B-crystallin, CD63, CD9.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	7
<b>CAPÍTULO 1: ANÁLISE DE BIOMARCADORES PROGNÓSTICOS PARA NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.....</b>	<b>9</b>
1 INTRODUÇÃO .....	9
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	11
4 CONCLUSÃO .....	17
<b>CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DE CRYAB, CD63 E CD9 COMO INDICADOR DE MALIGNIDADE E DE PROGRESSÃO TUMORAL EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS .....</b>	<b>18</b>
1 INTRODUÇÃO .....	18
1.1 ALFA-B CRISTALINA (CRYAB) .....	19
1.2 CD63 E CD9 .....	20
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
4 CONCLUSÃO .....	29
CONCLUSÕES .....	31
REFERÊNCIAS.....	32

## INTRODUÇÃO GERAL

As neoplasias da glândula mamária têm grande relevância na medicina humana e veterinária, sendo o tumor mais comum em cadelas e em mulheres com mais de 40 anos. No ano de 2022 foram diagnosticados, na medicina humana, 2,3 milhões de casos e contabilizados aproximadamente 670 mil óbitos (Misdorp et al., 1999; WHO, 2022). De acordo com a Veterinary Society of Surgical Oncology (VSSO), a neoplasia mamária representa, atualmente, aproximadamente 42% das neoplasias diagnosticadas na medicina veterinária.

Devido às similaridades clínico patológicas entre os tumores da mulher e da cadela, como a incidência espontânea, curso da doença, vias moleculares e marcadores semelhantes, vários são os estudos comparando a biologia tumoral dessas duas espécies (Abdelmegeed et al., 2018).

Apesar de sinais clínicos e exames complementares, como exames de imagem, fornecer informações importantes para o diagnóstico e prognóstico, a avaliação microscópica do tumor, corado rotineiramente com hematoxilina e eosina (HE) ainda é considerada o padrão ouro, sendo um exame simples, relativamente barato e com boa acurácia. A avaliação consiste em observar a arquitetura tecidual e a morfologia das células, permitindo analisar a proliferação celular neoplásica associada ao parênquima mamário normal (Misdorp et al., 1999; Goldschmidt et al., 2011; WHO, 2019; Cassali et al., 2020).

Os fatores prognósticos e preditivos mais importantes das neoplasias mamárias são definidos pelo patologista. O tamanho do tumor, a classificação histopatológica e o grau histológico, a identificação de metástases em linfonodos e a avaliação de receptores hormonais e da expressão gênica são definidos na rotina por técnicas anatomopatológicas e de imuno-histoquímica. Ferramentas de biologia molecular também auxiliam na identificação desses fatores e a combinação entre eles é determinante para a indicação da melhor terapia para cada caso, já que os tumores mamários têm uma heterogeneidade intratumoral considerável (Misdorp et al., 1999; Goldschmidt et al., 2011; Peña et al., 2013; WHO, 2019; Cassali et al., 2020).

A classificação molecular adiciona informações ao diagnóstico morfológico através da identificação e quantificação de marcadores. Ao longo do tempo, foram identificados marcadores diagnósticos, que identificam e podem até detectar previamente alguma lesão; prognósticos, que indicam a agressividade da doença e o

comportamento tumoral na ausência de tratamento e fatores preditivos, que identificam os indivíduos que desenvolvem uma boa resposta às terapias estabelecidas (Wei, et al., 2020, WHO, 2019).

Diversas são as técnicas para análise molecular tumoral, sendo a imunohistoquímica (IHQ) a mais utilizada na rotina das medicinas humana e veterinária. Outras técnicas da biologia molecular como as variações da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (multiplex, RT-PCR, Real Time, PCR digital, entre outras), sequenciamento de ácidos nucleicos (DNA e RNA), hibridização in situ, proteômica e análise de painéis de expressão gênica fornecem dados para complementar a histopatologia, sendo realizadas tradicionalmente com o tecido neoplásico coletado por biópsia incisional ou excisional (Sorenmo et al., 2013; WHO, 2019).

Análises genômicas realizadas pela técnica de microarray determinaram mutações em inúmeros genes. Relacionados com motilidade e adesão celular, organização de citoesqueleto, proliferação e regulação de ciclo celular, apoptose e reparo de DNA, esses genes estão diretamente relacionados ao desenvolvimento de neoplasias. Na medicina humana, já são utilizados painéis comerciais na avaliação de pacientes com câncer de mama que, associados à expressão de outros marcadores, fornece informações prognósticas e preditivas que contribuem com o tratamento (van de Vijver et al., 2002; Paik et al., 2004; Nielsen et al., 2014).

Mesmo com técnicas e alvos bem estabelecidos, novos biomarcadores são necessários para enriquecer o conhecimento da biologia tumoral, já que algumas características como a heterogeneidade inter e intratumoral e a resistência a quimioterápicos proporcionada pelo microambiente interferem diretamente na conduta terapêutica. No presente trabalho, objetivou-se avaliar os possíveis biomarcadores na medicina veterinária que possam contribuir para determinar o prognóstico de cadelas com neoplasias mamárias. O trabalho é composto por dois capítulos, com os seguintes objetivos específicos:

I. Apresentar, por meio de uma revisão sistemática, as informações presentes na literatura sobre o tema e caracterizar a função da maioria dos biomarcadores.

II. Avaliar a expressão de CRYAB, CD63 e CD9 em neoplasias mamárias caninas, correlacionando com fatores prognósticos, malignidade e progressão tumoral.

## **CAPÍTULO 1: ANÁLISE DE BIOMARCADORES PROGNÓSTICOS PARA NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

### **1 INTRODUÇÃO**

As análises de biomarcadores de expressão gênica dos tumores de mama em cadelas se iniciaram em 2009 por Wensman et al., seguidas por Pawłowski et al. em 2013, que identificaram cinco genes associados ao comportamento biológico de carcinomas dos diferentes graus. Mais adiante, Klopfleisch et al. (2010), por meio de análises proteômicas, identificaram alterações na expressão de 1101 genes, sendo a maioria relacionados com o ciclo, diferenciação e sinalização celular. Em 2011, o mesmo grupo de pesquisa comparou a expressão da glândula mamária normal e de neoplasias metastáticas, por análise de transcriptoma, e identificou alteração na expressão de 1312 genes, sendo os mais expressos relacionados com divisão celular e invasão tecidual. Em 2019, Varallo et al. identificaram alteração de expressão de 1699 genes de carcinomas mamários em relação à glândula normal, com destaque para aqueles relacionados à comunicação celular.

Alterações na expressão de receptores de hormônios (estrógeno - ER e progesterona - PR) e do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) são relevantes para estabelecer tratamentos neoadjuvante e/ou adjuvante em humanos. Através da análise por IHC e PAM50, são descritas quatro classificações que combinam diferentes expressões desses três receptores e determinam, inicialmente, a terapia a ser recebida. A expressão de Ki-67, uma proteína envolvida com proliferação e apoptose, também é avaliada nessa classificação, entretanto o seu uso é controverso e não é utilizado pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica - ASCO. (Harris et al., 2016; Kaszak et al., 2018; WHO, 2019).

A classificação molecular de acordo com ER/PR/HER2 é utilizada mundialmente na medicina humana e vem sendo utilizada na veterinária, com a vantagem de ser mais objetiva quando comparada com a classificação histológica, fazendo a correlação entre genótipo e fenótipo. Vários trabalhos buscam associar a morfologia com a expressão desses marcadores, o que influencia diretamente em ambas as classificações, criando subdivisões e/ou agrupando certos tipos tumorais. Ainda assim, ambas as classificações ainda não refletem a heterogeneidade biológica dos tumores, já que os diferentes tipos histológicos são resultado de uma combinação

entre origem celular e alterações genéticas e epigenéticas (Weigelt et al., 2010; Peña et al., 2014; WHO, 2019).

Na medicina veterinária, não existe ainda uma padronização utilizada como rotina. Alguns estudos utilizam a imuno-histoquímica para identificar ER, PR, HER2 e Ki-67 e determinar prognóstico e fatores preditivos da neoplasia de mama, enquanto outros adicionam ainda a expressão de COX-2, PNCA, p53, E-caderina e VEGF (Kaszak et al., 2018; Cassali et al., 2020). A detecção de rotina de CA 15-3 sérico é recente e, se associada à CEA e ferritina, o diagnóstico de neoplasias malignas tem 80,4% de sensibilidade e 78% de especificidade (Fan et al., 2021). Quanto às outras técnicas, da Costa et al. (2011) isolaram e identificaram cinco possíveis marcadores em células tumorais circulantes (CTCs) de tumores mamários (CK19, ERBB2, EGFR, CLDN7 e ELF3); Colombo et al. (2021), a partir da avaliação de DNA tumoral circulante (ctDNA) e de fragmentos de tecido por NGS, compararam as alterações encontradas em tumores mamários em humanos e cães, reportando mutações simultâneas em 66 e 59 variantes, respectivamente.

Com o objetivo de sintetizar de forma criteriosa a informação científica sobre essa questão, foi realizada uma abordagem qualitativa através de uma revisão sistemática de literatura, na qual foram buscados trabalhos que identificaram possíveis marcadores prognósticos em cadelas com neoplasias mamárias relacionadas à inflamação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A busca de artigos foi realizada nas bases de dados *PubMed*, *Science Direct* e *Google Scholar*, utilizando as seguintes palavras-chave e termos *MeSH*: ((*canine OR dogs OR dogs*) AND (*mammary OR breast OR (mammary AND gland)*) AND (*cancer OR tumor OR tumors OR neoplasm OR neoplasms OR neoplasia*)) AND (*biomarkers*). Os critérios de inclusão abrangeram publicações entre 2010 e 2024 que abordassem diagnóstico histopatológico de pelo menos 30 casos espontâneos de neoplasia mamária em cães e fornecer informações de prognóstico. Além disso, os trabalhos originais, em inglês, deveriam analisar de forma comparativa os achados clínico patológicos com material coletado de animais saudáveis. Como critério de exclusão, foram eliminados artigos que avaliaram marcadores provenientes de cultivo celular ou que abrangesse outras neoplasias e espécies.

A questão norteadora do estudo foi estabelecida por meio da estratégia PICO, ou seja, População, Intervenção/Exposição, Comparação e *Outcome*, e análise seguiu o checklist PRISMA (2020), compreendendo as etapas de identificação, triagem por título e resumo, triagem por texto completo e inclusão definitiva dos artigos. Os registros foram organizados com o auxílio do software *StArt* 3.0.3 BETA e as extrações de dados incluíram informações sobre país em que ocorreu o estudo, número de animais (saudáveis e acometidos por neoplasias), número de tumores malignos e benignos, referência de classificação histológica, biomarcador, material coletado, método de detecção e resultados relevantes.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após aplicação dos critérios PRISMA e dos critérios de inclusão e exclusão para a seleção dos artigos, foram incluídos 49 artigos para a revisão sistemática de literatura. A Figura 1 demonstra o fluxograma seguido.

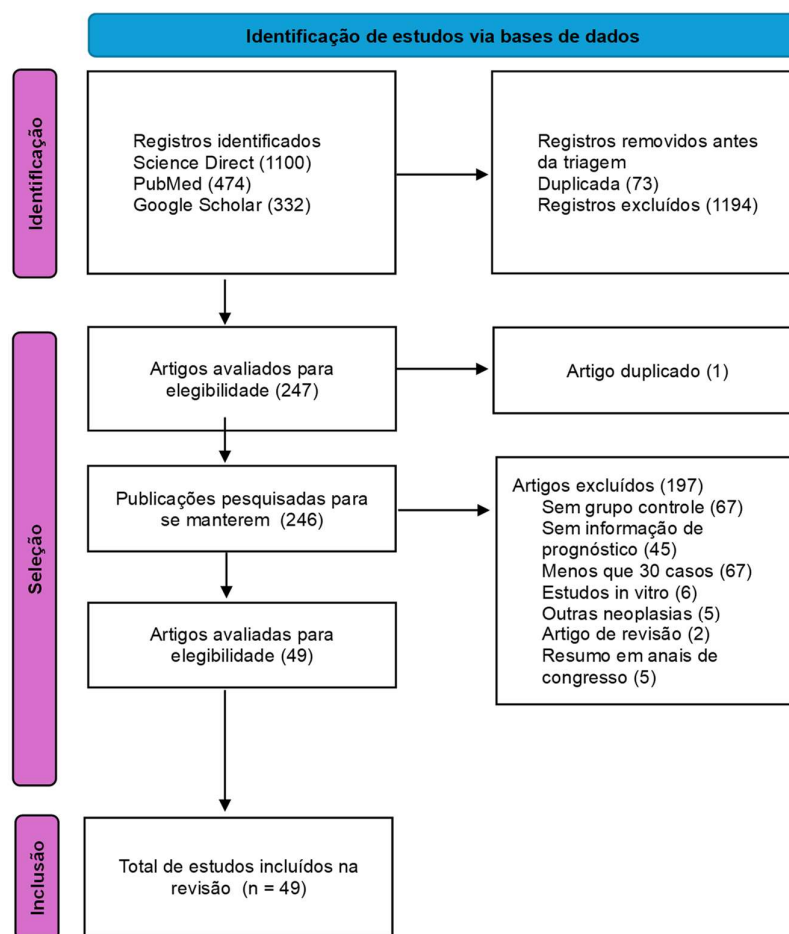


Figura 1. Fluxograma baseado nos critérios PRISMA para seleção dos artigos.

Os estudos analisados foram realizados em 15 países diferentes. Um total de 44 grupos de possíveis marcadores foram identificados em 4046 animais através de técnicas como imuno-histoquímica, ELISA, PCR (e variações), Western Blot e análise hematológica, utilizadas de acordo com o material coletado (tecido, sangue, soro e/ou plasma) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização do corpus da pesquisa conforme autores, ano de publicação, país, possíveis biomarcadores, método de detecção e amostra utilizada.

PRIMEIRO AUTOR	ANO	PAÍS	BIOMARCADOR	DETECÇÃO	AMOSTRA
Senhorello	2019	Brasil	Antígeno carcinoembrionário (CEA)	ELISA	Soro
			Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )		
			Interferon gama (INF- $\gamma$ )		
			IL-1, IL-6, NOx	ELISA	
Machado	2015	Brasil	Produtos da Oxidação Avançada de Proteínas (AOPP)	ESPECTOFOTOMETRIA	Soro
			Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP)	LC-MS/MS	

<b>Novais</b>	2024	Brasil	Exossomo Inibidor de Inter-alfa-tripsina (ITIH) Enolase alfa (ENO1) Fator de início de tradução de eucariotos 2 (eEF2) Actina B (ACTB) CA 15.3	LC-MS/MS	Plasma
<b>Campos</b>	2012	Brasil	Antígeno carcinoembrionário (CEA) Lactato desidrogenase (LDH)	ELISA WESTERN BLOT	Soro
<b>Estrela-Lima</b>	2013	Brasil	CXCL-10, IL-2, IL-4, IL-6, CXCL-8, IL-10, IL15, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$	ELISA	Plasma
<b>Martins</b>	2016	Brasil	NF-kB IL-4 IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$	qPCR ELISA	Soro Tecido
<b>Huang</b>	2015	China	COX-2	IHQ	Tecido
<b>Fan</b>	2021	China	CA15-3, CEA, Ferritina sérica	ELISA RT-PCR	Soro
<b>Ren</b>	2023	China	IL-6 IL-8	ELISA IHQ	Soro Tecido
<b>Wang</b>	2015	China	CHIP (Carboxy terminus of Hsc70) gene	RT-PCR IHQ	Tecido
<b>Hasan</b>	2015	Egito	CA 15-3	ELISA	Soro
<b>Mohr</b>	2016	Alemanha	Receptor de Estrógeno (ESR1) Receptor de progesterona (PGR) Receptor de Prolactina (PRLR) Receptor de Hormônio do Crescimento (GHR)	Multiplex bDNA	Tecido
<b>Bulkowska</b>	2017	Alemanha	Citoqueratina, Vimentina, Actina de Músculo Liso, s100, p63	IHQ MicroRNA microarray qRT-PCR	Plasma Tecido
<b>Baba</b>	2019	Índia	CA 15-3, CEA, IL-8, TNF- $\alpha$	ELISA	Soro
<b>Birdi</b>	2019	Índia	Hsp27	ELISA	Soro
<b>Dezfoulian</b>	2020	Irã	CD117 calretinina Fosfatase alcalina placentária (Plap)	IHQ	Tecido
<b>Brunetti</b>	2014	Itália	CD117	IHQ	Tecido
<b>Bongiovanni</b>	2015	Itália	Survivina	IHQ	Tecido
<b>Parisi</b>	2023	Itália	Foxp3+	IHQ	Tecido
<b>Cacciola</b>	2021	Itália	Translocase de Carnitina (CACT), Transferase de Palmitol Carnitina 2 (CPT2), Acetiltransferase-O de Carnitina (CrAT)	Western Blot IHQ	Tecido
<b>Fukumoto</b>	2013	Japão	L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1)	RT-PCR Western Blot	Tecido
<b>Chen</b>	2022	Japão	miRNAs (cfa-miR-1-3p, cfa-miR-133a-3p and cfa-miR-133c-3p)	NGS qPCR	Tecido
<b>Yoshimura</b>	2019	Japão	S100A4	IHQ	Tecido
<b>Kaji</b>	2021	Japão	Receptor de Protease Ativa 2 (PAR2)	IHQ	Tecido
<b>Chung</b>	2022	Coréia do Sul	Klotho	IHQ	Tecido
<b>Im</b>	2012	Coréia do Sul	Fator de transcrição de zinco (Snail) E-caderina	IHQ	Tecido
<b>Kim</b>	2012	Coréia do Sul	Foxp3+	IHQ	Tecido

<b>Koo</b>	2023	Coréia do Sul	Oncogene associado a glioma 1 (GLI-1) Sonic hedgehog (SHH)	ELISA Western Blot	Soro Tecido
<b>Cheon</b>	2023	Coréia do Sul	SLUG	IHQ	Tecido
<b>Uribe-Querol</b>	2023	México	Relação neutrófilo/Linfócito (NLR) Relação Albumina/Globulina (AGR)	Hemograma	Sangue
<b>Ariyaratna</b>	2020	Nova Zelândia	Densidade de Mastócitos	Azul de toluidina	Tecido
<b>Bujak</b>	2020	Polônia	Ligantes de regulação de Linfócitos T (PD-L2, Gal9, CD8) Genes associados a Linfócitos T citotóxicos (CD8 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) Genes associados a Linfócitos Th1 (CXCR3, TBX21) Genes associados a Linfócitos Th2(IL-4, GATA3, CCR2) IL-10, IL-12A p35, IL-12B p40 Genes associados a Linfócitos Th17 (IL-17, ROR $\gamma$ t) Genes de crescimento (HPRT, RPS19) COX-2, CD31; Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF); Ki-67; CD3, MAC387	qPCR IHQ ELISA	Tecido
<b>Carvalho</b>	2016	Portugal	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF); Ki-67; CD3, MAC387	IHQ	Tecido
<b>Tavares</b>	2012	Portugal	MUC6 Antígeno Tn	IHQ	Tecido
<b>Santos</b>	2011	Portugal	Metaloproteinase 2 (MMP-2) Inibidor de Metaloproteinase 2 (TIMP-2)	IHQ Imunofluorescência	Tecido
<b>Pereira</b>	2010	Portugal	Caveolina-1 (Cav-1)	IHQ	Tecido
<b>Queiroga</b>	2010	Portugal	Hormônio do Crescimento/Fator de crescimento <i>insulin-like</i> 1 (GH/IGF-I)	ELISA	Tecido
<b>Canadas-Sousa</b>	2021	Portugal	Polimorfismo de nucleotídeos (SNP) (gene da Prolactina-rs23932236)	PCR Espectrometria de Massa	Sangue
<b>Cho</b>	2024	Coréia do Sul	Myeloid cell leukemia-1 (MCL-1)	IHQ	Tecido
<b>Kim</b>	2011	Coréia do Sul	HER-2 HER-3	IHQ	Tecido
<b>Suárez-Bonnet</b>	2011	Espanha	Proteína 14-3-3 $\sigma$	IHQ	Tecido
<b>Guil-Luna</b>	2023	Espanha	cfDNA (mutações em KRAS, TP53, PIK3CA e p16)	ddPCR	Plasma Tecido
<b>Queiroga</b>	2014	Espanha	Prolactina	ELISA	Soro Tecido
<b>Chang</b>	2021	China	<i>Thymidylate synthetase</i> (TYMS) <i>Hyaluronan and proteoglycan link protein 1</i> (HAPLN1) <i>Insulin-like growth factor-binding protein 5</i> (IGFBP5)	ELISA	Soro
<b>Chen</b>	2019	China	Lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos (NGAL) Metaloproteinase 9 (MMP9)	IHQ	Tecido
<b>Yuan</b>	2022	China	Auto-anticorpos, (TYMS-AAb, IGFBP5-AAb, HAPLN1-AAb, AGR2-AAb)	Western Blot ELISA	Soro

<b>Ekici</b>	2023	Turquia	Relação Neutrófilo/Linfócito (NLR) Relação Linfócito/Monócito (LMR) Relação Plaqueta/Linfócito (PLR)	Hemograma	Sangue
--------------	------	---------	--	-----------	--------

A utilização do tecido neoplásico, coletado após procedimentos cirúrgicos, representa 61,8% (34/55) das amostras utilizadas, enquanto sangue e seus derivados, 38,2% (21/55). Esses resultados indicam que, mesmo com novas técnicas de detecção sendo desenvolvidas, como variações mais sensíveis e específicas da PCR, e a expectativa do desenvolvimento de métodos menos invasivos, exemplificado pela coleta de líquidos circulantes, a imuno-histoquímica é ainda a ferramenta mais utilizada para avaliação de moléculas presentes e/ou produzidas pelo tecido neoplásico.

Com o progresso dos estudos, a medicina apresentou a técnica de biópsia líquida. Este método não invasivo consiste na utilização de fluidos corporais como sangue, urina, líquor, saliva e líquidos cavitários para detectar e investigar marcadores não só tumorais, mas também de outras doenças. Na oncologia, essa detecção pode ser feita através do isolamento, identificação e quantificação de células tumorais circulantes (CTCs), ácidos nucleicos tumorais circulantes (ctDNA, ctRNA, miRNAs), vesículas extracelulares secretadas pelas células neoplásicas, com destaque para os exossomos, entre outros (Asaga et al., 2011; Neoh et al., 2018; Khatami et al., 2018; Wei et al., 2020).

Esses componentes podem ser liberados ativamente pelas células viáveis, dependendo do estímulo recebido, ou por células necróticas e/ou apoptóticas. Uma das vantagens da biópsia líquida é a identificação de marcadores dinâmicos, que fornecem informações sobre o prognóstico, recidivas e metástases, além do monitoramento em tempo real do paciente e de uma possível resistência antiqumioterápica adquirida do tumor (Neoh et al., 2018; Bonner et al., 2018; Lobo et al., 2019; Li et al., 2019; Garnica et al., 2020; Kilgor et al., 2020).

Apesar da heterogeneidade entre os tipos de biomarcadores avaliados, todos os estudos concluíram que os biomarcadores testados tiveram a capacidade de correlacionar com a agressividade da neoplasia, identificando níveis e concentrações de substâncias mais altas e/ou baixas em animais com metástases em linfonodos, metástases distantes e pior prognóstico.

Os biomarcadores identificados podem ser classificados em várias categorias, baseadas na função de cada um, como moléculas associadas ao crescimento neoplásico, invasão e desenvolvimento de metástases e inflamação. Biomarcadores de promoção do crescimento incluem CA 15.3 e CEA e estão associados à proliferação e invasão celular, já descritos anteriormente. A invasão tecidual e as metástases ainda são facilitadas por marcadores como NGAL (*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), promovendo a migração e invasão das células cancerosas (Campos et al., 2012; Baba et al., 2019; Chen et al., 2019; Senhorello et al., 2019).

Biomarcadores relacionados à resposta imunológica, como IL-6, IL-10, IL-17 e COX-2, desempenham papéis na inflamação e na regulação imunológica dentro do microambiente tecidual, sendo um aspecto importante da biologia tumoral (Estrela-Lima et al., 2013; Machado et al., 2015; Carvalho et al., 2016; Bujak et al., 2020).

Leucócitos, inicialmente, atuam como um mecanismo de defesa contra o desenvolvimento de tumores; entretanto a inflamação crônica pode promover a angiogênese, causar danos no DNA e favorecer a proliferação e metástase neoplásica, além de impedir a apoptose (Damar et al., 2016). A relação entre as neoplasias e a inflamação crônica pode afetar a contagem e a porcentagem diferencial de leucócitos antes do início do tratamento. De maneira geral, o processo inflamatório no microambiente tumoral desempenha um impacto positivo na progressão, invasão e metástase do tumor. Os leucócitos infiltrantes, como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos e linfócitos, exercem funções significativas nesses processos. Quando ativadas, as citocinas (citadas na tabela 1) facilitam a remodelação da matriz extracelular e a ativação de vias anti-apoptóticas como mecanismo de proteção das células neoplásicas. Tumores maiores, com características de agressividade como necrose e metástase para linfonodos regionais estão frequentemente associados à resposta inflamatória (Damar et al., 2016).

De acordo com Chen et al. (2017), análises moleculares revelaram que um aumento na quantidade de neutrófilos pode favorecer a carcinogênese, o crescimento das células tumorais e as metástases em neoplasias orais, mediados através de citocinas inflamatórias, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a IL-8 e o TNF. Glogauer et al. (2015), indicam que os neutrófilos podem intensificar o potencial invasor de carcinomas ao ativar vias de degradação da matriz extracelular.

NLR é caracterizado pela relação neutrófilo/linfócito, sendo determinada pelo hemograma convencional. Por ser de fácil acesso e um exame relativamente barato,

é um marcador apropriado para a inflamação sistêmica, com informações importantes em relação ao estado geral do paciente. Uma NLR de pré-tratamento aumentada está associada a um mau prognóstico, bem como à progressão tumoral e metástases (Ekici et al., 2023; Uribe-Querol et al., 2023).

Ainda sobre o desenvolvimento de metástases, houve análise da expressão de moléculas que influenciam o microambiente tumoral, como metaloproteinases (MMP2 e MMP9) e fatores que influenciam na transformação epitelial-mesenquimal das células. Sabe-se que a perda de moléculas de adesão, a modificação estrutural celular e a transformação da matriz extracelular são processos que facilitam a migração e invasão de tecido adjacentes, permitindo o deslocamento das células tumorais para vasos sanguíneos e linfáticos (Santos et al., 2011; Im et al., 2012; Chen et al., 2019; Novais et al., 2024).

#### 4 CONCLUSÃO

Mesmo com alguns entraves para a realização desta revisão sistemática, como o acesso restrito a alguns trabalhos, foi possível identificar biomarcadores potenciais em neoplasias mamárias caninas e seu significado quanto ao prognóstico. Na maioria dos trabalhos, há diferença significativa de expressão e/ou concentração de tais biomarcadores associados com um prognóstico ruim, tendo relação com o desenvolvimento de características neoplásicas mais agressivas e com o desenvolvimento de metástases, sendo assim potenciais alvos terapêuticos.

Ainda é necessária a realização de estudos clínicos randomizados que permitam estabelecer o papel dos diferentes biomarcadores identificados para diagnóstico e prognóstico das neoplasias mamárias caninas, assim como para definir a melhor amostra e melhor método para a avaliação da sua expressão.

## **CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DE CRYAB, CD63 E CD9 COMO INDICADOR DE MALIGNIDADE E DE PROGRESSÃO TUMORAL EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

### **1 INTRODUÇÃO**

Exossomos são vesículas extracelulares com funções variadas, atuando na comunicação intercelular transferindo moléculas, influenciando no microambiente, modulando o sistema imune e atuando no controle de qualidade de proteínas (Petgel e Gould, 2019).

Com o reconhecimento dos exossomos como importante componente na fisiologia tecidual, os também denominados oncossomos estão relacionados com o comportamento tumoral maligno, incluindo estimulação de proliferação celular, supressão do sistema imune e estímulo de angiogênese e migração celular, levando ao desenvolvimento de metástases (Xu et al., 2018). Como a quantidade e conteúdo dos oncossomos são variados de acordo com o tipo de neoplasia, as pesquisas dão ênfase em identificar os biomarcadores exossomais, dentre proteínas de membrana, proteínas citoplasmáticas e ácidos nucleicos como mRNA, miRNA, e outros RNAs não codificantes (Petgel e Gould, 2019).

As tetraspaninas como CD9 e CD63 são reconhecidas como componentes-chave das proteínas de superfície dos exossomos, desempenhando papéis fundamentais na biogênese e no direcionamento da carga destes (Jalalian et al., 2019). Exossomos derivados de tumores desempenham papéis importantes no desenvolvimento e progressão do tumor e na transição epitelial-mesenquimal (EMT), já que essas proteínas podem interagir com receptores, como integrinas, nas células receptoras, facilitando a maior captação dos exossomos. Assim, o aumento de expressão das tetraspaninas têm sido amplamente detectados nos pacientes com câncer por diversos grupos de pesquisa. A associação das tetraspaninas com tumores torna essas proteínas de superfície exossomais potentes biomarcadores para vários tipos de câncer (Malla et al., 2018).

Como já documentado por Reddy et al. (2018), a secreção de CRYAB pelas células é realizada via exossomos, podendo ser avaliada, com variações, através de soro, plasma e urina. O aumento de sua expressão por imuno-histoquímica já é documentado em várias neoplasias e é considerado um fator prognóstico ruim, associado ao comportamento mais agressivo da doença, desenvolvimento de

metástases, pior resposta à terapia e menor sobrevida (Boslooper et al., 2008; Holcakova et al., 2008; Tang et al., 2009, Malin et al., 2014; van de Schootbrugge et al., 2014; Nagaraj et al., 2016; Shi et al., 2016).

### 1.1 ALFA-B CRISTALINA (CRYAB)

As proteínas de choque térmico são chaperonas moleculares que protegem as células contra estímulos apoptóticos. Dividem-se em seis grupos de acordo com seu peso molecular, onde as proteínas de choque térmico pequenas (small heat shock proteins – sHSPs) são as únicas não dependentes de ATP para exercer sua atividade e, dessa forma, consideradas como “chaperonas de emergência” (Jong et al., 1993; Narberhaus, 2002; Nakamoto et al., 2006).

A ação das sHSPs consiste na exposição de sítios hidrofóbicos da região N-terminal, que se ligam a proteínas desnaturadas, prevenindo assim sua agregação, ou como mediadora de outras chaperonas. Sua distribuição depende do tipo de tecido e do estímulo estressor, apresentando subunidades citoplasmáticas, nucleares ou de membrana plasmática. Na membrana, a primeira estrutura que entra em contato com as alterações do meio extracelular, as sHSPs atuam na organização e fluidez da região polar e prevenindo, assim a ruptura da bicamada lipídica (Nakamoto et al., 2006; Sun e MacRae, 2005; Bakthisaran et al., 2015; Janowska et al., 2019).

No citoplasma, a maior ação das sHSPs é na proteção do citoesqueleto, interagindo principalmente com os microtúbulos, vimentina, actina e desmina e, no núcleo, a interage com DNAs de fita dupla e simples, além de RNA mensageiro. Definida como uma ação promíscua, diferentes sHSPs podem interagir com o mesmo alvo a partir de mecanismos diferentes, todos com o objetivo de prevenir a agregação proteica (Sun e MacRae, 2005; Bakthisaran et al., 2015; Janowska et al., 2019).

A espécie humana expressa dez tipos de sHSPs, encontradas em vários tecidos, principalmente em cristalino, músculo e rins. A mais estudada, a  $\alpha$ -cristalina, é composta por dois subgrupos,  $\alpha$ A-cristalina (CRYAA) e  $\alpha$ B-cristalina (CRYAB), na qual a CRYAB tem característica mais hidrofóbica e, portanto, maior atividade como chaperona se comparada à CRYAA. A proteína identificada como CRYAB expressa em cães apresenta 98,3% de similaridade com a CRYAB humana (Narberhaus et al., 2002; Sun e MacRae, 2005; Mymrikov et al., 2011).

Além da interação com proteínas desnaturadas, CRYAB atua nas vias de apoptose inibindo a translocação de Bax, Bcl-Xs e p53 para a mitocôndria, além de inibir a ativação de caspase-3. Como sua ação é dependente de fosforilação, mutações que causam hiperfosforilação alteram a solubilidade dessa chaperona e são responsáveis por inúmeras doenças degenerativas, com perda da ação protetora, como em algumas miopatias, cardiomiopatias, doenças neurodegenerativas e na catarata (Iwaki et al., 1992; Shinohara et al., 1993; Selcen e Engel, 2003; Maloyan et al., 2005).

Na oncologia, a expressão aumentada de CRYAB é relacionada a um comportamento agressivo tumoral, associada à progressão, transição epitelial-mesenchimal, infiltração inflamatória, menor sobrevida e recidivas mais prováveis em diversos tumores (Boslooper et al., 2008; Holcakova et al., 2008; Malin et al., 2014). Voduc et al. (2015) associaram o aumento de expressão de CRYAB em câncer de mama com uma maior chance de desenvolver metástases para o sistema nervoso central.

Com relação ao meio extracelular, a CRYAB atua na modulação de VEGF, aumentando sua expressão e conseqüentemente a angiogênese, além de inibir o sistema imune com uma ação anti-inflamatória, aumentando a concentração de IL-10 e MMP-8 e inibindo a ação de IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e óxido nítrico no local (Masilamoni et al., 2005; Nahomi et al., 2013; Finlay et al., 2018).

Diante do potencial valor prognóstico e preditivo para malignidade que a expressão CRYAB possui em humanos e cadelas, este relatado por MIRANDA, J.L. (2019), o objetivo desse trabalho é avaliar a expressão de alfa B-cristalina em cadelas com tumores de glândula mamária e correlacionar com indicadores de malignidade e de progressão tumoral.

## 1.2 CD63 E CD9

CD63 é um membro das tetraspaninas, família de proteínas de membrana associadas à superfície celular, envolvidas em processos celulares como ativação, adesão, diferenciação e invasão tumoral. Foi descoberta inicialmente como um antígeno de superfície expresso em alta quantidade em células de melanoma e identificada como um supressor tumoral, reduzindo a motilidade celular e a degradação de matriz extracelular (Pols, Klumperman, 2009; Seubert et al., 2015).

Diversos estudos relatam que a expressão de CD63 tem uma relação negativa com a malignidade em neoplasias, incluindo câncer de pulmão e cólon em humanos (Kaprio et al., 2020; Koh et al., 2019). Em discordância, descobriu-se que CD63 também está envolvida na regulação do transporte de proteínas associadas ao desenvolvimento e à disseminação de tumores por meio dos exossomos. CD63 pode facilitar a metástase atuando como um receptor do inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP), interagindo com  $\beta 1$  integrinas, o que está correlacionado com a progressão tumoral e a redução da sobrevida (Cui et al., 2015; Seubert et al., 2015). Este papel duplo de CD63, como um possível supressor tumoral e facilitador da metástase, destaca a complexidade da sua função na biologia do câncer e a necessidade de mais pesquisas para esclarecer suas funções específicas em diferentes contextos tumorais.

CD9 também é um membro da superfamília das tetraspaninas, caracterizado por quatro domínios transmembranares, três intracelulares e dois extracelulares. Entre os 33 tipos conhecidos de tetraspaninas em humanos, como CD9, CD81, CD151 e CD37, essas proteínas são essenciais em diversos processos fisiopatológicos, incluindo adesão celular, crescimento, motilidade, sinalização e metástase de neoplasias malignas (Murayama et al., 2015; Le Naour et al., 2006).

É uma proteína amplamente expressa em diversos tipos de células tumorais, na qual se observa uma correlação inversa com a sobrevivência de pacientes acometidos por cânceres de mama, estômago, ovário e melanoma maligno (Huang et al., 1998; Furuya et al., 2005; Yin et al., 2014). Alguns trabalhos demonstram que a superexpressão de CD9 ou a administração de anticorpos monoclonais anti-CD9, que aumentam sua função, podem reduzir a capacidade metastática, a migração e a motilidade das células tumorais de melanoma, neoplasias de pulmão e cólon (Ikeyama et al., 1993; Takeda et al., 2007; Ovalle et al., 2007). Porém, ainda não há uma investigação detalhada sobre o papel do CD9 nas células imunes associadas ao tumor no microambiente tumoral. Dada a influência significativa das células imunes no crescimento e na regressão tumoral, é essencial explorar as implicações prognósticas da expressão de CD9 tanto em células tumorais quanto em células imunes (Salgado et al., 2015).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em conformidade com as recomendações da Legislação Brasileira, as resoluções normativas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA/MCTI) através da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica e as Diretrizes de Prática da Eutanásia recomendada pelo CONCEA/MCTI, aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV – Processo 25/2021). Os dados e material biológico de todos os animais foram coletados após devida autorização pelos responsáveis, mediante assinatura do Termo de Ciência e Autorização.

As informações referentes ao animal e sua condição clínica foram colhidas a partir das fichas de atendimento do HOV/UFV, com ênfase na ficha oncológica. Os principais dados coletados constituíram em idade, histórico reprodutivo e características da massa tumoral.

Fragmentos representativos das massas tumorais e dos linfonodos regionais foram coletados nos procedimentos de mastectomia realizados na rotina do HOV/DVT entre 2021 e 2022, sem interferência da pesquisa. O material foi fixado em solução de formalina a 10% tamponada por 24 horas, processado rotineiramente em parafina. As lâminas, confeccionadas com cortes de 4µm de espessura, coradas por hematoxilina e eosina, foram avaliadas a microscopia óptica foram observadas e a classificação dos tumores realizada de acordo com Goldschmidt et al. (2017) e Cassali et al. (2020) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação histológica das neoplasias mamárias em cães propostas por diferentes autores.

CLASSIFICAÇÃO	GOLDSCHMIDT ET AL (2011)	CASSALI ET AL (2020)
<b>Neoplasias Benignas</b>	Adenoma Adenoma papilar intraductal Adenoma ductal <i>Com diferenciação escamosa</i> Fibroadenoma Mioepitelioma Adenoma complexo Tumor misto benigno	Adenoma Adenomioepitelioma Mioepitelioma Adenoma basaloide Fibroadenoma Tumor misto benigno Papiloma ductal Tumor filoides
<b>Neoplasias Malignas</b>	Carcinoma <i>in situ</i> Carcinoma <i>Tubular</i> <i>Tubulopapilar</i> <i>Papilar cístico</i> <i>Cribriforme</i> Carcinoma micropapilar invasivo Carcinoma sólido Comedocarcinoma Carcinoma anaplásico Carcinoma em tumor misto Carcinoma complexo Carcinoma e mioepitelioma maligno Carcinoma misto Carcinoma ductal Carcinoma papilar intraductal Carcinoma - Tipo especial <i>Células Fusiformes</i> <i>Células Escamosas</i> <i>Adenoescamoso</i> <i>Mucinoso</i> <i>Rico em lipídeo – secretório</i> <i>Mioepitelioma maligno</i> <i>Variante fusiforme do carcinoma escamoso</i> <i>Variante fusiforme do carcinoma</i> Inflamatório Osteossarcoma Condrossarcoma Fibrossarcoma Hemangiossarcoma Carcinossarcoma Outros	Carcinoma <i>In situ</i> <i>In situ ductal</i> <i>In situ lobular</i> <i>Carcinoma em tumor misto</i> <i>Papilar (invasivo e não invasivo)</i> <i>Tubular</i> <i>Sólido</i> <i>Cribriforme</i> Carcinoma – Tipo especial <i>Micropapilar</i> <i>Lobular pleomórfico</i> <i>Secretório</i> <i>Mucinoso</i> <i>Rico em lipídeo</i> <i>Rico em glicogênio</i> <i>Células Fusiformes</i> <i>Células Escamosas</i> <i>Carcinoma com diferenciação sebácea</i> Adenomioepitelioma maligno Mioepitelioma maligno Fibrossarcoma Osteossarcoma Carcinossarcoma Sarcoma em tumor misto Condrossarcoma Lipossarcoma Hemangiossarcoma Sarcoma filoides Outros

Para realização da imuno-histoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizados e hidratados com álcool em concentrações decrescentes (100%, 90%, 80%, 70%) e água. A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato pH 6,0 a 95°C por 10 minutos (CD63 e CD9) e dois ciclos de 5 minutos (CRYAB). Após 30 minutos de resfriamento, as lâminas foram imersas três vezes em água destilada por

dois minutos. Depois, foi utilizado o bloqueador de peroxidase (EasyLink One – EasyPath®) por 10 minutos, os cortes foram lavados com água destilada e incubados com o bloqueador de proteína (EasyLink One – EasyPath®) por mais 10 minutos em temperatura ambiente. Os anticorpos primários anti-CD63 (diluição 1:250, MX-49.129.5, Santa Cruz Biotechnology) anti-CRYAB (diluição 1:250, F-10, Santa Cruz Biotechnology), anti-CD9 (diluição 1:250, C-4, Santa Cruz Biotechnology) foram incubados por uma hora a 37°C e lavados três vezes com PBS durante dois minutos cada. Os cortes foram incubados com o polímero EasyLink One (EasyPath®) por 20 minutos, lavados três vezes com PBS por dois minutos e incubados por cinco minutos com o cromógeno DAB. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina. O controle negativo foi realizado com PBS como anticorpo primário. Para o controle positivo, foram utilizados fragmentos de coração (CRYAB), vesícula biliar (CD63) e rim (CD9) provenientes de animais necropsiados na rotina do HOV/DVT, assim como glândulas mamárias normais para efeitos de comparação. As lâminas, observadas em microscópio óptico, foram avaliadas de forma semi-quantitativa de acordo com a intensidade da imunomarcação e quantidade de células marcadas, considerando os critérios: ausente (0), discreto (<30%), moderado (30 a 70%) e acentuado (>70%).

A quantidade e a intensidade de expressão de CRYAB, CD63 e CD9 entre as diferentes graduações histológicas, incluindo ainda neoplasias benignas, foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn com correção de Bonferroni, em caso de significância ( $\alpha = 5\%$ ). A relação das expressões com o tamanho dos nódulos foi avaliada por Correlações de Spearman. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trinta e nove cadelas atendidas no HOV/DVT – UFV foram incluídas no presente trabalho, com idades entre 2 e 18 anos. A avaliação histopatológica dos tumores revelou que, de 85 tumores, 21 foram classificados como benignos e 64, malignos. Considerando a graduação histológica das neoplasias malignas, 31 tumores foram classificados como grau I, 19 como grau II e 10 como grau III, seguindo os critérios de Elton & Ellis (1991). De acordo com a classificação de Cassali et al. (2020), 4 neoplasias malignas (Carcinoma em tumor misto) não possuíam suficiente formação tubular para graduação histológica.

Em relação ao estadiamento clínico, a tabela 1 mostra a quantidade de animais classificados de acordo com Sorenmo et al. (2013). Não houve animais em estágio V, já que, de acordo com a rotina cirúrgica, os animais atendidos à época não estavam estáveis o suficiente para a mastectomia.

Tabela 1. Estadiamento TNM dos animais diagnosticados com neoplasias mamárias e suas respectivas características.

<b>Estágio</b>	<b>Animais</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>I</b>	18	T1 (< 3 cm)	N0	M0
<b>II</b>	11	T2 (3 – 5 cm)	N0	M0
<b>III</b>	6	T3 (> 5 cm)	N0	M0
<b>IV</b>	4	T (1,2 ou 3)	N1	M0
<b>V</b>	0	T(1,2 ou 3)	N (0 ou 1)	M1

N0: Ausência de metástase em linfonodos regionais.

M0: Ausência de metástases distantes.

N1: Metástase em linfonodos regionais (detectadas por histopatologia)

M1: Metástases distantes detectadas.

A imuno-histoquímica com os anticorpos anti-CD9, anti-CD63 e anti-CRYAB foi realizada em todos os nódulos retirados cirurgicamente, além das glândulas mamárias normais coletadas de cadelas encaminhadas para necropsia. Comparativamente, os tumores tiveram expressão das proteínas aumentada em relação ao tecido mamário normal, definida por uma maior área do corte e maior intensidade da marcação, porém sem relevância estatística.

À avaliação da imunomarcação, a quantidade de células neoplásicas marcadas e a intensidade da marcação (comparada com os controles positivos) foram distribuídas como ausente, discreta (>30%), moderada (30-70%) e acentuada (<70%) (Figuras 1 e 2). A tabela 2 resume os achados de imunomarcação relacionados à graduação histológica.

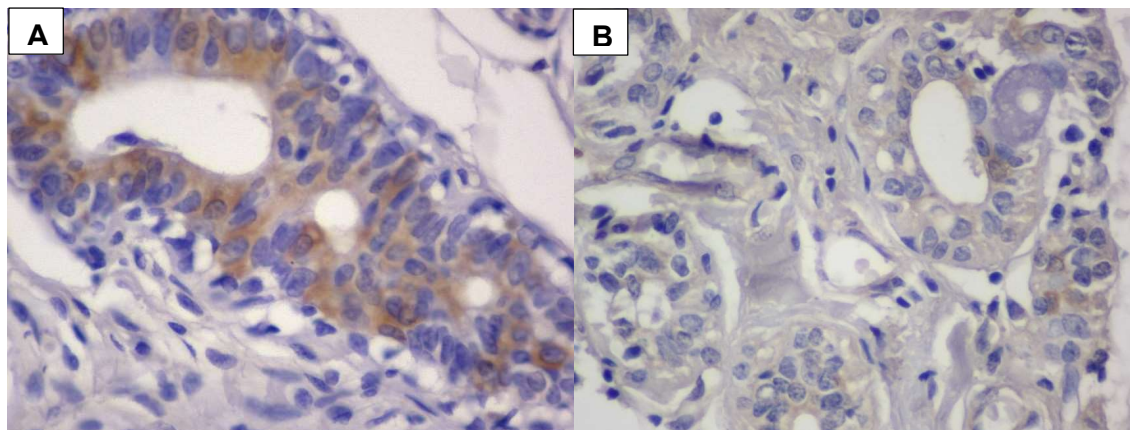


Figura 1. Imunomarcção de CRYAB em neoplasias mamárias caninas. A. Células epiteliais neoplásicas com marcação de intensidade acentuada. Ob 20x. B. Intensidade discreta. Obj. 10x

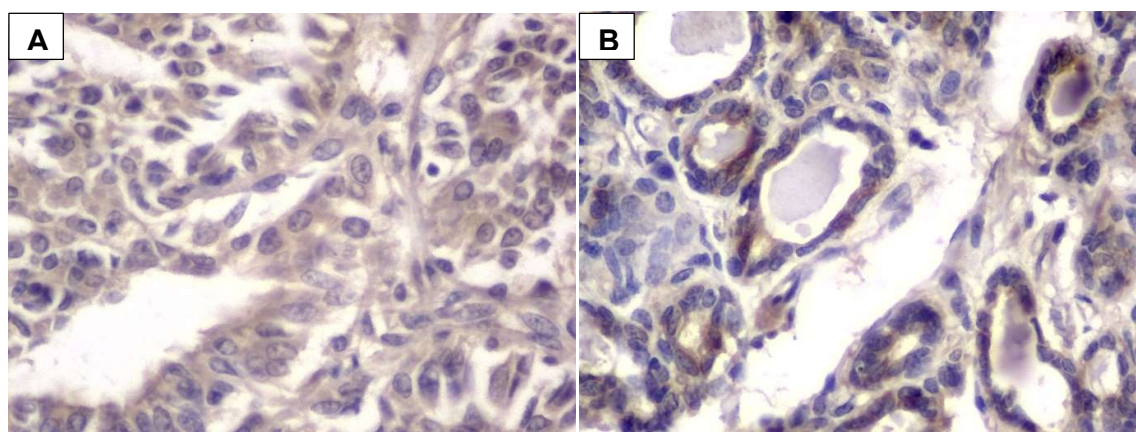


Figura 2. Imunomarcção de CD63 e CD9 em neoplasias mamárias caninas. A. Células epiteliais neoplásicas com marcação para CD63 de intensidade moderada. Ob 20x. B. CD9. Intensidade acentuada. Obj. 10x

Tabela 2. Expressão e Intensidade de CRYAB, CD9 e CD63 nas Diferentes Gradações Histológicas das Neoplasias Mamárias.

	0	I	II	III	Kruskal-Wallis p	Comparações Post-Hoc (Dunn)
<b>Amostras</b>	3	31	19	10	-	-
<b>Mediana (q CRYAB)</b>	1	2	1	2	p = 0,003	0 vs III: p = 0,0285*
<b>IQR (q CRYAB)</b>	0	1	1	0	-	I vs II: p = 0,178 (ns)
<b>Mediana (i CRYAB)</b>	1	1	1	1	p = 0,946	0 vs I: p = 0,0261 (ns)
<b>IQR (i CRYAB)</b>	0.5	0.5	0.5	0.75	-	II vs III: p = 0,0200*
						0 vs II: p = 0,252 (ns)
						I vs III: p = 0,158 (ns)
<b>Mediana (q CD63)</b>	1	1	1	1.5	p = 0,109	-
<b>IQR (q CD63)</b>	0	2	0	1	-	-
<b>Mediana (i CD63)</b>	1	1	1	1	p = 0,005	I vs III: p = 0,00874**
<b>IQR (i CD63)</b>	0	1	0.5	1	-	0 vs I: p = 1 (ns)
						0 vs II: p = 1 (ns)
						0 vs III: p = 1 (ns)
						I vs II: p = 0,059 (ns)
						II vs III: p = 1 (ns)
<b>Mediana (q CD9)</b>	1	1	1	1	p = 0,342	-
<b>IQR (q CD9)</b>	0	0	0.5	0	-	-
<b>Mediana (i CD9)</b>	1	1	1	1	p = 0,879	-
<b>IQR (i CD9)</b>	0	0	0.5	0	-	-

ns: Não significativo

\*: Significativo

\*\*: Muito significativo

Para a expressão de CRYAB, houve uma diferença estatisticamente significativa entre as gradações histológicas ( $p = 0,003$ ). As comparações post-hoc indicaram que a expressão de CRYAB foi significativamente diferente entre os grupos 0 e III ( $p = 0,0285$ ) e entre os grupos II e III ( $p = 0,0200$ ). Entretanto, a intensidade de expressão de CRYAB não apresentou diferenças significativas entre as gradações ( $p = 0,946$ ).

Este resultado corrobora com Pagano et al. (2021), que identificaram correlação entre a gradação de carcinoma colorretal em humano com a gradação

histológica, sugerindo que a avaliação de CRYAB pode ser utilizada para determinação de prognóstico.

Outro estudo criou um modelo de superexpressão de CRYAB *in vivo* e *in vitro*, com evidências que apoiam o papel da  $\alpha$ B-Cristalina como um oncogene, na qual a regulação positiva é suficiente para induzir proliferação tumoral, promover a sobrevivência celular em ambientes hostis para a célula, como hipóxia e diminuição de pH, além de inibir a apoptose pelas vias intrínseca e extrínseca (Rashied et al., 2023)

Para CD63, não foram observadas diferenças significativas entre as graduações histológicas ( $p = 0,109$ ). Já a intensidade de expressão de CD63 se mostrou significativa ( $p = 0,005$ ), com uma diferença entre os grupos I e III ( $p = 0,00874$ ).

Kaprio et al. (2020), Miki et al. (2018) e Lewitowicz et al. (2003) observaram que a alta expressão de CD63 estava associada a um pior prognóstico em neoplasias gastrointestinais em humanos. Em contraste, Kwon et al. (2014) e Koh et al. (2019) mostraram que a baixa expressão de CD63 estava relacionada a uma menor sobrevivência em neoplasias pulmonares. Koh et al. (2019) revelou que a expressão de CD63 está associada ao prognóstico em tumores sólidos, com efeitos variáveis dependendo do tipo de tumor, e que é significativamente associada à sobrevida específica de cada doença.

No caso de CD9, tanto a expressão quanto a intensidade não apresentaram diferenças significativas entre as graduações histológicas ( $p = 0,342$  e  $p = 0,879$ ). Esses resultados indicam que, enquanto a expressão de CRYAB e a intensidade de CD63 variam entre determinadas graduações histológicas, a expressão e intensidade de CD9 permanecem constantes entre as diferentes graduações, indicando que CD9 pode ter um papel funcional estável em diferentes estágios da doença. A ausência de variações na expressão de CD9 entre os diferentes graus histológicos sugere que o CD9 não é um marcador específico para a classificação histológica das neoplasias mamárias, mas pode ter um papel constante no microambiente tumoral.

Reyes et al. (2018), por meio de uma revisão, demonstra que CD9 tem papel fundamental no processo inflamatório, influenciando na adesão e migração leucocitária, o que influencia também o microambiente tumoral e, por consequência, a proliferação e agressividade das células neoplásicas.

A análise das correlações entre o tamanho do tumor (T) e a imunohistoquímica revelou que a expressão de CRYAB não apresentou correlações estatisticamente significativas com o tamanho do tumor, tanto para a quantidade (qCRYAB) quanto para a intensidade (iCRYAB). Isto sugere que a expressão de CRYAB pode não estar diretamente associada ao crescimento tumoral nas neoplasias mamárias caninas estudadas, indicando que esse marcador pode não ser um indicador relevante do tamanho do tumor nesse contexto.

Por outro lado, CD63 e CD9 mostraram correlações significativas com o tamanho do tumor. A intensidade de CD63 apresentou uma correlação positiva forte e significativa ( $p < 0,001$ , coeficiente = 0,449), indicando que uma expressão mais intensa de CD63 está associada a tumores maiores. A intensidade de CD9 também apresentou uma correlação positiva significativa ( $p = 0,008$ , coeficiente = 0,351), embora com uma intensidade menor em comparação ao CD63. Esses resultados sugerem que a expressão mais intensa tanto de CD63 quanto CD9 podem ser importantes no crescimento tumoral.

Estudos prévios indicam que CD9 pode influenciar a motilidade e a adesão celular, contribuindo para o desenvolvimento e a progressão dos tumores (Murayama et al., 2015; Le Naour et al., 2006). Assim, enquanto o CD9 não parece variar com a graduação histológica, sua intensidade pode refletir aspectos significativos da agressividade tumoral e do crescimento, fornecendo informações sobre o comportamento do tumor.

#### 4 CONCLUSÃO

Com base na análise dos dados obtidos, observou-se que a expressão de CRYAB, CD63 e CD9 nas neoplasias mamárias caninas apresenta variações significativas em relação à graduação histológica e ao tamanho do tumor. Por outro lado, CD9 não apresentou diferenças na expressão ou intensidade entre as graduações histológicas, mas sua intensidade mostrou uma correlação positiva significativa com o tamanho do tumor, sugerindo que o CD9 está envolvido na progressão tumoral e no crescimento, apesar de não ser um marcador específico para a graduação histológica.

Entretanto, é importante destacar que uma das limitações deste estudo é o número relativamente baixo de casos avaliados, o que pode influenciar na capacidade de generalização dos resultados. A quantidade limitada de amostras pode ter impactado a significância estatística observada para alguns dos marcadores analisados, como a expressão e intensidade de CRYAB e CD9. Estudos subsequentes com um número maior de casos são essenciais para confirmar e expandir esses achados, proporcionando uma compreensão mais abrangente sobre a utilidade desses marcadores na classificação e prognóstico das neoplasias mamárias caninas.

## **CONCLUSÕES**

Esta tese teve como objetivo analisar possíveis biomarcadores relacionados com a evolução de neoplasias mamárias em cadelas. Com base nos resultados obtidos através dos estudos realizados nos Capítulos 1 e 2, foi possível concluir que existem inúmeras moléculas e características que podem ser avaliadas. No Capítulo 1, os métodos de detecção, por mais simples que pareçam, fornecem informações importantes relacionadas ao prognóstico do animal. Ainda, no Capítulo 2, há um aumento de expressão e/ou concentração de CD63, CRYAB e CD9, estando associados com características de malignidade.

Ainda é necessária a realização de estudos clínicos randomizados que permitam estabelecer o papel dos diferentes biomarcadores identificados para diagnóstico e prognóstico das neoplasias mamárias caninas, assim como para definir a melhor amostra e melhor método para a avaliação da sua expressão.

## 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.
- ARIYARATHNA, H. et al. Low Stromal Mast Cell Density in Canine Mammary Gland Tumours Predicts a Poor Prognosis. **J Comp Pathol**. v.175, p.29-38. 2020.
- ASAGA, S. et al. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 84–91, 2011.
- BABA, O. K.; SOOD, N.K.; GUPTA, K. Clinical Evaluation of Glycoproteins and Inflammatory Cytokines in the Serum of Dogs Affected with Canine Mammary Cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.** v.89, p.1465–1469. 2019.
- BAKTHISARAN, R. et al. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 4, p. 291–319, 2015.
- BIRDI, R. et al. Circulating level of heat shock protein 27 is elevated in dogs with mammary tumors. **3 Biotech**. v.9, n.6, p.229. 2019.
- BONGIOVANNI, L. et al. Survivin and related proteins in canine mammary tumors: immunohistochemical expression. **Vet Pathol**. v.52, n.2, p.269-275. 2015.
- BONNER, E. R. et al. Liquid biopsy for pediatric central nervous system tumors. **npj Precision Oncology**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2018.
- BOSLOOPER, K. et al. The clinic-pathological roles of alpha-B-crystallin and p53 expression in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Pathology**, v.40, p.500–504, 2008.
- BRUNETTI, B. et al. CD117 expression influences proliferation but not survival in canine mammary tumours. **J Comp Pathol**. v.151, n.2-3, p.202-206. 2014.
- BUJAK, J. K. et al. The Expression of Selected Factors Related to T Lymphocyte Activity in Canine Mammary Tumors. **Int J Mol Sci**. v.21, n.7, p.2292. 2020.
- 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.1:728. 2017.
- CACCIOLA, N. A. et al. Metabolic Flexibility in Canine Mammary Tumors: Implications of the Carnitine System. **Animals**. v.11, p. 2969. 2021.
- CAMPOS, L. C. et al. “CA15.3, CEA and LDH in dogs with malignant mammary tumors.” **Journal of veterinary internal medicine** v.26, n.6, p.1383-8. 2012.
- CANADAS-SOUSA, A. et al. Single Nucleotide Polymorphism in Prolactin Gene Is Associated With Clinical Aggressiveness and Outcome of Canine Mammary Malignant Tumors. **Vet Pathol**. v.58, n.6, p.1051-1057. 2021.

- CARVALHO, M. I. et al. A Comparative Approach of Tumor-Associated Inflammation in Mammary Cancer between Humans and Dogs. **Biomed Res Int.**2016:4917387. 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.
- CASSALI, G.D. **Patologia mamária canina: Do diagnóstico ao tratamento.** São Paulo: Editora MedVet, 2017. 224 p.
- CHANG, S. C. et al. Significant association of serum autoantibodies to TYMS, HAPLN1 and IGFBP5 with early stage canine malignant mammary tumours. **Vet Comp Oncol.** v.19, n.1, p.172-182. 2021.
- CHEN, F. et al. Feasibility of a novel one-stop ISET device to capture CTCs and its clinical application. **Oncotarget**, v.8, p.3029–3041, 2017.
- CHEN, H.W.; et al. Micro RNA differential expression profile in canine mammary gland tumor by next generation sequencing. **Gene.**818:146237. 2022.
- CHEN, X. et al. Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2019.
- CHEON, S. B.; KIM, W. H. Upregulation of SLUG expression in canine mammary gland tumors and its prognostic significance. **BMC Vet Res.** v.19, p.112. 2023.
- CHO, J. et al. Evaluation of MCL-1 as a prognostic factor in canine mammary gland tumors. **PLoS ONE** 19(7): e0306398. 2024.
- CHUNG, H. et al. Down-expression of klotho in canine mammary gland tumors and its prognostic significance. **PLoS ONE** 17(6): e0265248. 2022.
- COLOMBO, J. et al. Liquid biopsy as a diagnostic and prognostic tool for women and female dogs with breast cancer. **Cancers**, v. 13, n. 20, 2021.
- DA COSTA, A. et al. Potential markers for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood. **Veterinary Journal**, v. 190, n. 1, p. 165–168, 2011.
- DAMAR, M. et al. Pretreatment Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Salivary Gland Tumors Is Associated with Malignancy. **Otolaryngol Head Neck Surg.** v.155, n.6, p.988-996. 2016.
- DEZFOULIAN, O. et al. Calretinin expression as a risk biomarker for metastatic canine mammary carcinoma. **Vet. arhiv.** v. 90, p.453-466. 2020.
- EKICI, Z. M. et al. Evaluation of some systemic inflammatory biomarkers in canine malignant mammary tumors. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, v.29, n.5, p.513-520, 2023.
- ESTRELA-LIMA, A. et al. Plasma biomarkers profile of female dogs with mammary carcinoma and its association with clinical and pathological features. **Vet Comp Oncol.** v.14, n.1, p.88-100. 2013.

FAN, Y. et al. Combined detection of CA15-3, CEA, and SF in serum and tissue of canine mammary gland tumor patients. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2021.

FINLAY, T.M.; PALMER, A.L.; OUSMAN, S.S. Murine neutrophils treated with alphaB-crystallin reduce IL-2p40 production by dendritic cells. **Immunology**, v.155, p.72–84, 2018.

FUKUMOTO, S. et al. L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1) Expression in Canine Mammary Gland Tumors. **J Vet Med Sci**. v.75, n.4, p.431-437. 2013.

GARNICA, T. K. et al. Liquid biopsy based on small extracellular vesicles predicts chemotherapy response of canine multicentric lymphomas. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

GLOGAUER, J. E. et al. Neutrophils Increase Oral Squamous Cell Carcinoma Invasion through an Invadopodia-Dependent Pathway. **Cancer Immunol Res**. v.3, n.11, p.1218-1226. 2015.

GOLDSCHMIDT, M. H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumors of the mammary gland. In: Meuten, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 5<sup>a</sup> Ed. p 723-765, 2017.

GOLDSCHMIDT, M.H. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Vet Path**, v.48, n.1, p.117-131, 2011.

GUIL-LUNA, S. et al. Analysis of cell-free DNA concentration, fragmentation patterns and *TP53* gene expression in mammary tumor-bearing dogs: A pilot study. **Front. Vet. Sci**. 10:1157878. 2023.

HARRIS, L. N. et al. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of clinical Oncology clinical practice guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 10, p. 1134–1150, 2016.

HASAN, S. M. H.; ZAGHLOL, N. F.; EL-SHAMY, S. A.; LATTEEF, D.K. Hematological and Biochemical Abnormalities of Canine Mammary Gland Tumors Correlated to Their Histopathological Types and Serum Biomarkers. **Assiut Vet. Med. J**. v. 61, n. 145, p. 178-200. 2015.

HOLCAKOVA, J. et al. Identification of  $\alpha$ B-crystallin, a biomarker of renal cell carcinoma by SELDI-TOF MS. **Int J Biol Mark**, v.23, n.1, p.48-53, 2008.

HUANG, C. I.; KOHNO, N.; OGAWA, E.; ADACHI, M.; TAKI, T.; MIYAKE, M. Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. **Am J Pathol**. v.153, n.3, p.973-983. 1998.

HUANG, J. et al. The potential role of COX-2 in cancer stem cell-mediated canine mammary tumor initiation: an immunohistochemical study. **J Vet Sci**. v. 16, n.2, p. 225-31. 2015.

IM, K.S. et al. Possible role of Snail expression as a prognostic factor in canine mammary neoplasia. **J Comp Pathol**. v.147, n.2-3, p.121-128. 2012.

IWAKI, T. et al. Accumulation of alpha B crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions. **Am J Pathol**, v.140, n.2, p.345-356. 1992.

JALALIAN, S. H. et al. Exosomes, new biomarkers in early cancer detection. **Anal Biochem**, v. 571, p. 1–13, 2019.

JANOWSKA, M. K. et al. Mechanisms of small heat shock proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 10, 2019.

JONG, W. W.; LEUNISSEN, J. A. M.; VOORTER, C. E. M. Evolution of the  $\alpha$ -crystallin/small heat-shock protein family. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 103–126, 1993.

KAJI, K, et al. Protease-Activated Receptor-2 Is Associated With Adverse Outcomes in Canine Mammary Carcinoma. **Vet Pathol**.v.58, n.1, p.53-62. 2021.

KAPRIO, T. et al. Tetraspanin CD63 independently predicts poor prognosis in colorectal cancer. **Histol Histopathol** 19: 18209, 2020.

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

KHATAMI, F.; LARIJANI, B.; TAVANGAR, S. M. The presence of tumor extrachromosomal circular DNA (ecDNA) as a component of liquid biopsy in blood. **Medical Hypotheses**, v. 114, n. February, p. 5–7, 2018.

KILGOUR, E. et al. Liquid Biopsy-Based Biomarkers of Treatment Response and Resistance. **Cancer Cell**, v. 37, n. 4, p. 485–495, 2020.

KIM, J. H. et al. Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. **Vet J**. v.193, n.1, p.222-227. 2012.

KIM, J. H. et al. Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: histopathological and immunohistochemical study. **Vet J**. v.189, n.3, p.318-322. 2011.

KLOPFLEISCH, R. et al. Proteome of metastatic canine mammary carcinomas: similarities to and differences from human breast cancer. **J Proteome Res**, v.9, p. 6380–6391, 2010.

KLOPFLEISCH, R. et al. The metastatic cascade is reflected in the transcriptome of metastatic canine mammary carcinomas. **Vet Journal**, v.190, p.236–243, 2011.

KOH, H., AN, H., JUNG, J. AND SONG, D. The prognostic significance of CD63 expression in patients with non-small cell lung cancer. **Pol J Pathol** 70: 183-188, 2019.

KOO, H.; LEE, S.; KIM, W. H. Usability of serum hedgehog signalling proteins as biomarkers in canine mammary carcinomas. **BMC Vet Res**. v.19, p.1, p.231. 2023.

LE NAOUR, F. et al. Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. **Mol Cell Proteomics**. v.5, n.5, p.845-857. 2006.

- LI, X. et al. Liquid biopsy of circulating tumor DNA and biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, n. September 2018, p. 596–607, 2019.
- LOBO, J. et al. Identification and Validation Model for Informative Liquid Biopsy-Based microRNA Biomarkers: Insights from Germ Cell Tumor In Vitro, In Vivo and Patient-Derived Data. **Cells**, v. 8, n. 12, 2019.
- MACHADO, V.S. et al. Oxidative stress and inflammatory response biomarkers in dogs with mammary carcinoma. **Pathol Res Practice**. v.211, p. 677–681. 2015
- MALIN, D. et al. AlphaB-crystallin: a novel regulator of breast cancer metastasis to the brain. **Clin Cancer Res**, v. 20, p.56–67. 2014.
- MALLA, R. R.; PANDRANGI, S.; KUMARI, S.; GAVARA, M. M.; BADANA, A. K. Exosomal tetraspanins as regulators of cancer progression and metastasis and novel diagnostic markers. **Asia-Pacific J Clin Oncol**, v. 14, n. 6, p. 383–391, 2018.
- MALOYAN, A. et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in  $\alpha$ -B-crystallin desmin related cardiomyopathy. **Circulation**, v. 112, n. 22, p.3451-3461. 2005.
- MARTINS, G. R.; GELALETI, G. B.; MOSCHETTA, M. G.; MASCHIO-SIGNORINI, L. B. & ZUCCARI, D. A. Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines Mediated by NF- $\kappa$ B Factor as Prognostic Markers in Mammary Tumors. **Mediators Inflamm**. vol. 2016: 9512743. 2016.
- MASILAMONI, J. G.; JESUDASON, E. P.; BHARATHI, S. N.; JAYAKUMAR, R. The protective effect of alpha-crystallin against acute inflammation in mice. **Biochim Biophys Acta**, v.1740, p.411-20, 2005.
- MIRANDA, Jéssica Leis de. Expressão de alfa-b cristalina em tumores mamários caninos e sua relação com angiogênese. 2019. 35 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2019.
- MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMEN, E.; LIPSCOMB, T.P. **Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat**. 2nd ser., vol. 7. Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization, Washington, DC, 1999.
- MOHR, A. et al. Hormone Receptor Expression Analyses in Neoplastic and Non-Neoplastic Canine Mammary Tissue by a Bead Based Multiplex Branched DNA Assay: A Gene Expression Study in Fresh Frozen and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Samples. **PLoS ONE**, v.11, n.9: e0163311. 2016.
- MURAYAMA, Y.; ORITANI, K.; TSUTSUI, S. Novel CD9-targeted therapies in gastric cancer. **World J Gastroenterol**. v.21, n.11, p.3206-3213. 2015.
- MYMRIKOV, E. V.; SEIT-NEBI, A. S.; GUSEV, N. B. Large potentials of small heat shock Proteins. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1123–1159, 2011.
- NAGARAJ, R. H. et al. Therapeutic potential of  $\alpha$ -crystallin. **Biochim Biophys Acta**, v.1860, p.252–257, 2016.

NAHOMI, R.B. et al. Chaperone peptides of alpha crystallin inhibit epithelial cell apoptosis, protein insolubilization, and opacification in experimental cataracts. **J Biol Chem**, v.288, p.13022– 13035. 2013.

NAKAMOTO, H.; VÍGH, L. The small heat shock proteins and their clients. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 3, p. 294–306, 2007.

NARBERHAUS, F.  $\alpha$ -Crystallin-Type Heat Shock Proteins: Socializing Minichaperones in the Context of a Multichaperone Network. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 64–93, 2002.

NIELSEN, T. et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. **BMC Cancer**, v.14, 177, 2014.

NOVAIS, A. A.; et al. Exploring Canine Mammary Cancer through Liquid Biopsy: Proteomic Profiling of Small Extracellular Vesicles. **Cancers**, 16, 2562. 2024.

PAGE, M. J., et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews **BMJ** 2021; 372 :n71 doi:10.1136/bmj.n71

PAIK, S. et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node negative breast cancer. **N Engl J Med**, v.351, p.2817-2826, 2004.

PARISI, F.; et al. Confirmation of the Prognostic Value of Foxp3+ Cells in Canine Mammary Tumors. **Animals**. v.13, p. 505. 2023.

PAWŁOWSKI, K.M. et al. Five markers useful for the distinction of canine mammary malignancy. **BMC Vet Res**, v.9, n.138, 2013.

PEGTEL, D. M.; GOULD, S. J. 9-038. **Exosomes**. 2019.

PEÑA, L. et al. Prognostic value of histological grading in non-inflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: Relationship with clinical and histological characteristics. **Vet Pathol**, v.50, p.94-105, 2013.

PEÑA, L. et al. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Vet Path**, v.51, n.1, p.127-145, 2014.

PEREIRA, P. D. et al. Caveolin-1 in diagnosis and prognosis of canine mammary tumours: comparison of evaluation systems. **J Comp Pathol**. v.143, n.2-3, p.87-93. 2010.

POLS, M.S., KLUMPERMAN, J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. **Exp Cell Res**. v. 315, p.1584-1592, 2009.

QUEIROGA, F. L. et al. Clinical and prognostic implications of serum and tissue prolactin levels in canine mammary tumours. **Vet Rec**.v.175, n.16, p.403, 2014.

- QUEIROGA, F. L. et al. Serum and intratumoural GH and IGF-I concentrations: prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer. **Res Vet Sci.** v.89, n.3, p.396-403. 2010.
- REDDY, V. S.; MADALA, S. K.; TRINATH, J.; REDDY, G. B. Extracellular small heat shock proteins: Exosomal biogenesis and function. **Cell Stress Chaperones**, v.23, p.441–454, 2018.
- REN, X.; FAN, Y.; SHI, D.; LIU, Y. Expression and significance of IL-6 and IL-8 in canine mammary gland tumors. **Sci Rep.**v.13, n.1:1302. 2023.
- REYES, R., CARDEÑES, B., MACHADO-PINEDA, Y., CABAÑAS, C. Tetraspanin CD9: A Key Regulator of Cell Adhesion in the Immune System. **Front. Immunol.** 9:863. 2018.
- SANTOS. A. et al. Immunohistochemical evaluation of MMP-2 and TIMP-2 in canine mammary tumours: a survival study. **Vet J.** v.190, n.3, p.396-402. 2011.
- SELCEN, D.; ENGEL, A.G. Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations. **Ann Neurol**, v.54, n.6, p.804-810. 2003.
- SENHORELLO, I. L. S.; et al. Clinical value of carcinoembryonic antigen in mammary neoplasms of bitches. **Vet Comp Oncol.** 1–9. 2019.
- SEUBERT, B. et al. Tetraspanin CD 63 acts as a pro-metastatic factor via  $\beta$ -catenin stabilization. **Int J Cancer** 136: 2304-2315, 2015. PMID: 25354204. DOI: 10.1002/ijc.29296
- SHI, Q.-M.; LUO, J.; WU, K.; et al. High level of  $\alpha$ B-crystallin contributes to the progression of osteosarcoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 8, p. 9007-9016, 2016.
- SHINOHARA, H. et al. Alpha B-crystallin and HSP28 are enhanced in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. **J Neurol Sci**, v.119, n.2, p.203-208. 1993.
- SORENMO, K.U. et al. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology. 5ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company.**, 2013. p.553-571.
- SUÁREZ-BONNET, A. et al. Expression of 14-3-3  $\sigma$  protein in normal and neoplastic canine mammary gland. **Vet J.** v.190, n.3, p.345-351. 2011.
- SUN, Y.; MACRAE, T. H. Small heat shock proteins: Molecular structure and chaperone function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 21, p. 2460–2476, 2005.
- TANG, Q. et al. Expression and prognostic significance of the alpha B-crystallin gene in human hepatocellular carcinoma. **Hum Pathol**, v.40, n.3, p.300-305. 2009.
- TAVARES, C. et al. Mucin 6 and Tn antigen expression in canine mammary tumours: correlation with pathological features. **J Comp Pathol.** v.147, n.4, p.410-418. 2012.

- URIBE-QUEROL, E. et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and principal component analysis offer prognostic advantage for dogs with mammary tumors. **Front. Vet. Sci.** 10:1187271. 2023.
- VAN DE SCHOOTBRUGGE, C. et al. Effect of hypoxia on the expression of  $\alpha$ B-crystallin in head and neck squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v.14. 2014.
- VAN DE VIJVER, M.J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med**, v.347, p.1999-2009, 2002.
- VARALLO, G. R. et al. Global gene expression profile in canine mammary carcinomas. **Veterinary Journal**, v. 254, p. 105393, 2019.
- VODUC, K. D. et al.  $\alpha$ B-crystallin expression in breast cancer is associated with brain metastasis. **Breast Cancer**, v. 1, n. May 2015.
- VSSO. Mammary Tumors – Canine. 2024. Disponível em: <https://vsso.org/mammary-tumors-canine>. Acesso em 20 de Junho de 2024.
- WANG, H.; JIANG, D.; LI, W.; et al. Evaluation of serum extracellular vesicles as noninvasive diagnostic markers of glioma. **Theranostics**, v.9, n.18, 5347-5358, 2018.
- WANG, H.; YANG, X.; JIN, Y. et al. Expression and significance of CHIP in canine mammary gland tumors. **J Vet Med Sci**.v.77, n.11, p.1465-1471. 2015.
- WEI, J. et al. The new horizon of liquid biopsy in sarcoma: The potential utility of circulating tumor nucleic acids. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 18, p. 5293–5308, 2020.
- WEI, Y. et al. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat**, v.147, n,2, p.423–431, 2014.
- WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: How special are they? **Molecular Oncology**, v. 4, n. 3, p. 192–208, 2010.
- WENSMAN, H. et al. Extensive expression of craniofacial related homeobox genes in canine mammary sarcomas. **Breast Cancer Res Treat**, v.118, p.333–343, 2009.
- WHO Classification of Tumors Editorial Board, ed. **WHO classification of tumors, 5th edition – Breast tumors**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2019.
- WHO. Breast Cancer. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Acesso em 20 de Junho de 2024.
- XU, R. et al. Extracellular vesicles in cancer e implications for future improvements in cancer care. **Nat Rev Clin Oncol**, v.15, p.617-638, 2018.
- YOSHIMURA, H. et al. Expression and Roles of S100A4 in Anaplastic Cells of Canine Mammary Carcinomas. **Vet Pathol**. v.56, n.3, p.389-398. 2019.
- YUAN, S.H.-C.; et al. The Implication of Serum Autoantibodies in Prognosis of Canine Mammary Tumors. **Animals**, v.12, p.2463. 2022.