

MICRO-RNAs EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS: REVISÃO DE LITERATURA

LITERATURE REVIEW: MICRO-RNA RELATIONSHIP WITH CANCER IN FEMALE DOGS WITH MAMMARY TUMOR.

¹SOUZA, Letícia Loranda Granada de; ²GAUDENCIO, Isabela de Medeiros Baptista; ³SILVA, Cristiane Laurindo da; ⁴SOUZA, Felipe Pinheiro de

^{1a2}Discente do Curso de Medicina Veterinária — Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos-Unifio

³Docente do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos-Unifio

RESUMO

Devido ao avanço na expectativa de vida dos animais domésticos, afecções carcinogênicas têm sido frequentemente abordadas. Atualmente a neoplasia mamária tem sido o tumor mais diagnosticado em cadelas, por isso médicos veterinários têm buscado por métodos de diagnóstico e tratamento que sejam precisos para esse problema, tendo em vista que essa afecção pode desencadear metástases no organismo. Os miRNAs são pequenos RNAs com 20 a 24 nucleotídeos, não codificantes, que medeiam o silenciamento gênico pós-transcricional e ajustam a regulação de muitos genes envolvidos com câncer. Devido à importância dos miRNAs associados a tumorigênese e seus papéis fisiológicos no ambiente tumoral, estudos apontam que entender mais sobre os miRNAs pode ser fundamental para o uso dos mesmos em tratamentos terapêuticos para diversos tipos de tumores. A presente revisão tem como objetivo descrever de forma sucinta sobre o funcionamento dos miRNAs e sua aplicabilidade na identificação de células neoplásicas.

Palavras-chave: Ambiente Tumoral; Câncer Canino; Expressão Gênica; Oncologia; RNA.

ABSTRACT

Due to the soaring in the life expectancy of domestic animals, carcinogenic conditions have been frequently addressed. On the present time, mammary neoplasia has been the most diagnosed tumor in dogs, thereby veterinarians have been searching for precise diagnosis and treatment methods for this problem, considering that this condition can trigger metastases in the body. miRNAs are small non-coding RNAs of 20 to 24 nucleotides that mediate post-transcriptional gene silencing and adjust the regulation of many genes involved in cancer. Owing to the importance of miRNAs associated with tumorigenesis and their physiological roles in the tumoral region, studies indicate that further knowledge about miRNAs can be fundamental for their use in therapeutic treatments for different types of tumors. The present review purpose to succinctly describe the functioning of miRNAs and their applicability in the identification of neoplastic cells.

Keywords: Tumoral Region; Canine Cancer; Gene Expression; Oncology; RNA.

INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida dos cães, a frequência na rotina clínica de doenças inerentes à idade, como o câncer tem se tornado prevalente (DOBSON, 2011; WITHROW *et al.*, 2013).

A neoplasia mamária é o tumor mais diagnosticado em cadelas, portanto, representam um problema clínico significativo (SALAS *et al.*, 2002; SORENMO, 2003; REDDY *et al.*, 2009; BENAVENTE *et al.*, 2016). Entre os tumores mamários

caninos, aproximadamente 50% deles são malignos (SALAS *et al.*, 2002; SORENMO, 2003; BENAVENTE *et al.*, 2016) sendo o tipo tumoral mais comum o carcinoma tubular (adenocarcinoma), seguido do carcinoma papilífero, carcinoma sólido, carcinoma complexo e carcinossarcoma (SALAS *et al.*, 2002; REDDY *et al.*, 2009).

Até o momento, o único tratamento eficaz é a cirurgia, que consiste na retirada das glândulas alteradas e dos gânglios linfáticos locais. Geralmente, ao mesmo tempo, uma ovariectomia (OHE) também é realizada. No entanto, estudos recentes demonstraram que nem todos os casos de tumor mamário se beneficiam da OHE (KRISTIANSEN *et al.*, 2016). Alternativamente, os MicroRNAs (miRNA) são apontados como biomarcadores tumorais e podem ser usados como alvos terapêuticos para diversas doenças (ZHANG; WANG; GEMEINHART, 2013).

Os miRNAs correspondem a uma classe de pequenos RNAs de fita simples com comprimento de 17 a 25 nucleotídeos. Originam-se de regiões não codificadoras de proteínas (introns) e desempenham um papel na regulação gênica pós-transcricional em condições fisiológicas normais, sendo essenciais na diferenciação tecidual, ciclo celular, proliferação e apoptose (REDDY, 2015).

Eles regulam até 60% dos genes codificadores de proteínas (FRIEDMAN, 2008), entretanto existem vários mecanismos que podem levar à expressão alterada do miRNA, incluindo alterações genômicas, como ampliações, deleções, mutações, polimorfismos, alterações epigenéticas e alterações na biogênese do miRNA. Essas alterações podem ser responsáveis por desregular os níveis da expressão do miRNA ou alterar os genes-alvo do miRNA nas células tumorais (CALIN *et al.*, 2004).

Alguns estudos já relataram a expressão diferencial de miRNA comparando células tumorais com células normais. Em alguns tipos de câncer, miRNAs específicos têm expressão diferencial dependendo do estágio do tumor, desde a carcinogênese até a invasão e metástase. Os miRNAs podem atuar tanto em oncogene quanto em genes supressores tumorais, contribuindo para a formação tumoral em ambos os casos (DI LEVA *et al.*, 2014; REDDY, 2015).

Nas células tumorais, os miRNAs expressos de forma aberrante exercem funções supressoras ou oncogênicas de tumor, regulando a expressão de mRNAs em diferentes vias de sinalização, afetando assim a progressão do tumor (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014). A presente revisão teve como objetivo

fornecer uma atualização sobre a biodinâmica de miRNAs e sua relação com o câncer de mama em cadelas.

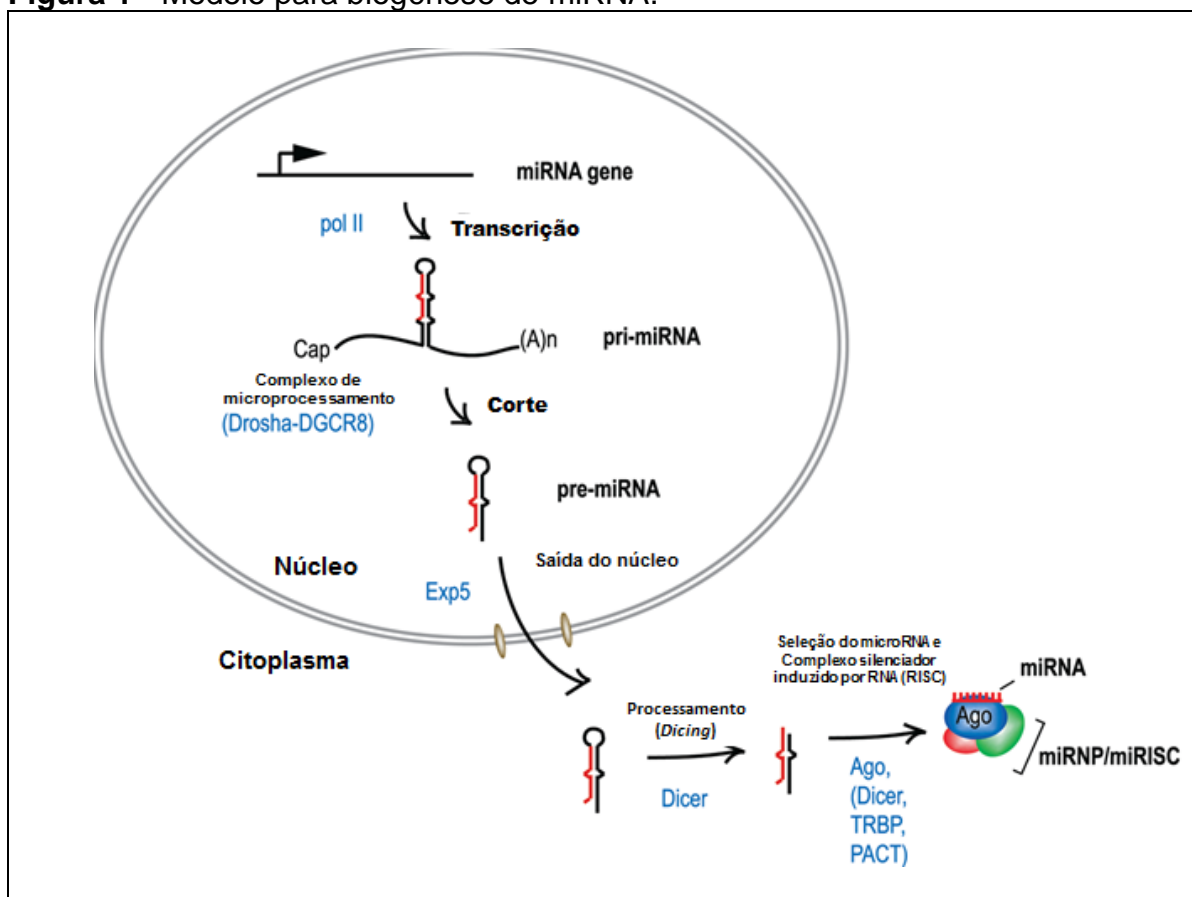
DESENVOLVIMENTO

Biodinâmica de micro-RNAs

O primeiro RNA, lin-4, foi descoberto em 1993 por meio de uma triagem genética em nematóides. Mais tarde, no mesmo ano, foi descoberta a regulação do lin-14 pelo lin-4, o que demonstrou a função reguladora de pequenos RNAs (LEE *et al.*, 1993; WIGHTMAN *et al.*; 1993). O RNA lin-4 mais curto é agora reconhecido como a origem de uma classe abundante de pequenos RNAs reguladores, conhecidos como MicroRNAs (miRNAs). Atualmente, a regulação gênica dirigida por miRNA é uma área ativa de estudo. Centenas de miRNAs foram descobertos por técnicas de clonagem e RNA fracionado por tamanho (LAU *et al.*, 2001).

Em animais, os miRNAs são sintetizados a partir de miRNAs primários (pri-miRNAs) pela ação de duas proteínas do tipo RNase III: Drosha no núcleo e Dicer no citoplasma (KIM; HAN; SIOMI, 2009). Os pri-miRNAs são processados para pré-miRNAs e, então, com o auxílio da exportina 5, os pré-miRNAs são transportados para o citoplasma e processados por Dicer, levando à formação do miRNA de fita dupla, que é desenrolado por proteínas Argonaute (AGO) e incorporados ao complexo silenciador induzido por RNA (RISC). O RISC se liga diretamente a região não traduzida de RNA mensageiro que são direcionados para degradar ou reprimir a tradução (BARTEL, 2004). A Figura 1 demonstra a biogênese e o processamento dos miRNAs.

Figura 1 - Modelo para biogênese de miRNA.



Fonte: Adaptado de Lee et al (2006.)

Estudos revelaram que a regulação gênica mediada por miRNA é dinâmica, sendo influenciada por fatores que podem contribuir para a intensidade dessa regulação. Entre esses fatores, incluem a compartimentação funcionalizada e transporte de miRISC dentro das células. A disponibilidade e abundância de miRNAs e seus mRNAs alvo também são fatores que determinam quais genes serão regulados (O'BRIEN *et al.*, 2018).

Os miRNAs exibem em grande parte uma complementaridade limitada com seus mRNAs alvo em animais, mas isso ainda é suficiente para regular vários processos fisiológicos. Tem sido sugerido que eles reprimem a etapa de iniciação do processo de tradução, que pode ser seguida pela degradação do mRNA (KATO e SLACK, 2008). Geralmente, miRNAs podem regular redes de genes de forma dinâmica ou transitória, por *feedbacks* e *loops* de regulação, afetando as redes reguladoras de genes, levando a mudanças nos perfis transcricionais (O'BRIEN *et al.*, 2018).

Sabe-se que a interrupção de um miRNA pode afetar a transcrição de vários genes que afetam as vias de sinalização relacionadas ao câncer (REDDY, 2015). A expressão do miRNA por sua vez, se torna mais fácil de quantificar em amostras representativas, como tecidos obtidos de cirurgia ou biópsia e tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina para análise anatomopatológica (HU *et al.*, 2010).

MicroRNA e câncer

Nas células tumorais, os miRNAs expressos de forma aberrante exercem funções supressoras ou oncogênicas do tumor em questão, regulando a expressão de mRNAs em diferentes vias de sinalização, afetando a progressão do tumor (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014).

Os miRNAs geralmente estão localizados em regiões contendo ganhos ou perdas genômicas envolvidas no câncer (CALIN *et al.*, 2004; GARZON *et al.*, 2009).

O perfil de expressão global de miRNA é útil para diferenciar entre um tecido normal e neoplásico; para identificar o tecido primário da metástase e para distinguir diferentes subtipos histológicos de tumores ou até mesmo determinar associações a distúrbios genéticos específicos (IORIO e CROCE, 2012).

Em paralelo, o primeiro estudo de perfil de miRNA em câncer de mama humano identificou uma assinatura de 15 miRNAs que poderiam diferenciar o câncer de mama de tecidos mamários normais com 100% de precisão (IORIO *et al.*, 2005). Starkey *et al.* (2007) observaram expressão anormal de 133 miRNAs em tecido mamário tumoral em comparação com a expressão em tecido normal. Além dos miRNA, acredita-se que a divisão celular aberrante do tumor com replicação danificada do DNA, hipóxia, acúmulo de mutações em genes de reparo do DNA, modificações epigenéticas podem contribuir para esse fenômeno (KLOPFLEISCH *et al.*, 2010). A proliferação celular contínua causada por proto-oncogenes ativados por mutação ou inativação de genes supressores de tumor induz a replicação do DNA danificado (HALAZONETIS; GORGOLIS; BARTEK, 2008). Além disso, hipóxia crônica ou ciclos de hipóxia e reoxigenação contribuem para a instabilidade genômica (BRISTOW e HILL, 2008).

Em alguns tipos de câncer, miRNAs específicos apresentam níveis de expressão diferenciados desde a carcinogênese até invasão e metástase. Os

miRNAs podem agir tanto na oncogênese, quanto em genes supressores de tumor colaborando com a formação tumoral em ambos os casos (DI LEVA *et al.*, 2014; REDDY, 2015). Por exemplo, em estudo conduzido por Bhome *et al.* (2017), foi constatado que exossomos de fibroblastos transferidos para células cancerígenas colorretais, com um aumento resultante nos níveis de miRNA celular, influenciou na proliferação, sobrevivência e resistência a quimioterápicos.

Sabe-se que os miRNAs podem regular mRNAs em diferentes vias de sinalização, afetando a progressão do tumor (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014). Portanto, atualmente é estudado que alterar os níveis de miRNA em células cancerígenas tem um potencial promissor como um método terapêutico (FORTERRE *et al.*, 2020).

MiRNA e neoplasia mamária em cadelas

Atualmente, milhares de miRNAs foram previstos em animais, plantas e vírus por diferentes abordagens (ZHANG *et al.*, 2006), incluindo métodos experimentais (ROSALINDA e VICTOR AMBROS, 2001), abordagens computacionais (BROWN e SANSEAU, 2005), marcadores de sequências expressas (EST) e sequenciamentos de genomas (ZHANG *et al.*, 2005, 2006).

Alguns estudos já foram desenvolvidos em cães avaliando os níveis de expressão de miRNAs em hemangiossarcoma (GRIMES *et al.*, 2016), leucemia linfocítica crônica (GIOIA *et al.*, 2011), melanomas (NOGUCHI *et al.*, 2011; STARKEY *et al.*, 2017), carcinomas prostáticos (KOBAYASHI *et al.*, 2017) e neoplasias mamárias (BOGGS *et al.*, 2008; VON DEETZEN *et al.*, 2014; KRÓL *et al.*, 2014; LUTFUL *et al.*, 2015; OSAKI *et al.*, 2016; BULKOWSKA *et al.*, 2017).

A análise computacional indica que o número total de miRNAs pode ser superior a 1% do total de genes codificadores de proteínas (LAI *et al.*, 2003; LIM *et al.*, 2003); mais de 30% dos genes que codificam proteínas podem ser direcionadas por miRNAs (BEREZIKOV *et al.*, 2005; LEWIS *et al.*, 2005).

Na oncologia veterinária, os miRNAs foram examinados em outros tipos de tumor. Além disso, foram observadas semelhanças no padrão de expressão de miRNA entre cânceres de mama humanos e os tumores mamários caninos (BOGGS *et al.*, 2007; BOGGS *et al.*, 2008; VON DEETZEN *et al.*, 2014)

No estudo conduzido por Chen *et al.* (2022), foi usado a técnica de *Next Generation Sequencing* (NGS) seguido de reação em cadeia da polimerase

quantitativa (qPCR) em larga escala para investigar miRNAs diferencialmente expressos no tumor mamário canino em relação ao tecido normal da glândula mamária (CHEN *et al.*, 2022). Diferenças na expressão de microRNA entre os tumores mamários caninos não metastáticos e metastáticos já foram relatadas em um estudo baseado em microarray (BULKOWSKA *et al.*, 2017), sugerindo que seus perfis de expressão diferem entre alguns subtipos histológicos, indicando seu potencial como biomarcadores específicos.

Numerosos estudos indicam que o nível de expressão do miRNA é alterado em vários tipos de câncer, mesmo dentro do mesmo tumor. Descobriu-se que os miRNAs participam de quase todos os processos celulares importantes, como a regulação da proliferação celular, diferenciação, angiogênese, migração e apoptose (BOGGS; WRIGHT; STICKNEY, 2008).

Diferentes padrões de expressão de miRNA (determinados por qRT-PCR) foram observados em diferentes tipos de tumor: miR-15a e miR-16 mostraram uma significativa diminuição da regulação em carcinomas ductais caninos, enquanto miR-181b, miR-21, miR-29b e O miRlet-7f foi fortemente regulado positivamente em carcinomas papilares tubulares caninos (BOGGS; WRIGHT; STICKNEY, 2008).

De acordo com Kabir *et al.* (2016), transição de fase G1 para S do ciclo celular é fortemente regulada por várias famílias de miRNAs, que influenciam a expressão dos genes CKI (genes que controlam processos citoplasmáticos e nucleares, incluindo replicação e reparo de DNA). Portanto, diferentes miRNAs regulam o ciclo celular de células da glândula mamaria de cadelas tanto positiva quanto negativamente, diferenciando a expressão de muitos genes em diferentes estágios, e a desregulação das vias reguladoras tem sido implicada em diferentes condições patológicas ou de desenvolvimento de neoplasias.

Aplicação clínica

Considerando que os miRNAs regulam a expressão de múltiplos genes-alvo e estão associados a mecanismos moleculares desregulados no câncer, estes podem constituir estratégias promissoras de tratamento (KASINSKI e SLACK, 2011).

Dependendo da função do miRNA no tecido e da sua expressão no tumor, existe a possibilidade do desenvolvimento de terapias baseadas em miRNAs,

sendo eles, antagonistas ou mimetizadores de miRNAs (KASINSKI e SLACK, 2011). As moléculas antagonistas são aplicadas para inibir ou sequestrar miRNAs com expressão aumentada e as moléculas mimetizadoras são aplicadas para restaurar miRNAs com perda de função ou diminuição da expressão (BADER *et al.*, 2011).

Bockhorn *et al.*, (2013) relataram que níveis elevados do miR-30c sensibilizam as células de câncer de mama aos seguintes medicamentos: Paclitaxel e doxorrubicina em modelo pré-clínico.

Em um dos estudos pioneiros que demonstram a utilidade dos inibidores de miRNA no câncer, Ma *et al.* (2007) identificaram uma expressão aumentada do miR-10b no câncer de mama metastático e demonstraram que a regulação positiva deste miR pode conferir potencial de metástase para linhagens celulares de câncer de mama não-metastático.

Em seguida, Ma *et al.* (2010) avaliaram este achado em modelos de câncer de mama em camundongos e demonstraram que a terapia com aplicações intravenosas de inibidores derivados antagomiR miR-10b resultou em uma considerável inibição da metástase no pulmão, porém sem evidência de redução do tamanho do tumor primário.

Assim como para outras classes de medicamentos, a eficácia e segurança dos medicamentos derivados de miRNA devem ser cuidadosamente avaliadas e serão dependente de muitos estudos pré-clínicos, do contexto celular, de lesões genéticas e epigenéticas pré-existentes (ASIAF; AHMAD; ARJUMAND, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelo exposto, podemos verificar a possibilidade do uso de miRNAs como marcadores tumorais, além de o ter como um potencial adjuvante no diagnóstico, tratamento e na evolução dos tumores de mama em cadelas. Porém, vale a pena ressaltar que existem poucos estudos sobre o assunto dentro da medicina veterinária, sendo necessário cautela sobre a utilização dos microRNAs como terapia e sua verdadeira eficácia.

REFERÊNCIAS

ASIAF, A.; AHMAD, S. T.; ARJUMAND, W. **MicroRNA and Cancer**. New York, NY: Springer New York, v. 1699, 2018.

- BADER, A. et al. Developing therapeutic microRNAs for cancer. **Gene Therapy**, v. 18, p. 1121–1126, 2011.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.
- BENAVENTE, M. A.; BIANCHI, C. P.; ABA, M. A. Canine mammary tumors: risk factors, prognosis and treatments. **Journal of Veterinary Advances**, v. 6, p. 1291-1300, 2016.
- BEREZIKOV, E. et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. **Cell**, v. 120, p. 21–24, 2005.
- BHOME, R. et al. Exosomal microRNAs derived from colorectal cancer-associated fibroblasts: role in driving cancer progression. **Aging**, v. 9, p. 2666-2694, 2017.
- BOCKHORN, J. et al. MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11. **Nature Communications**, v. 307, n. 4, p. 1393, 2013.
- BOGGS, R. M. et al. Identification, amplification and characterization of miR-17-92 from canine tissue. **Gene**, v. 404, p. 25-30, 2007.
- BOGGS, R. M. et al. MicroRNA expression in canine mammary cancer. **Mammalian Genome**. v. 19, p. 561-569, 2008.
- BULKOWSKA, M. et al. MicroRNA expression patterns in canine mammary cancer show significant differences between metastatic and non-metastatic tumours. **BMC Cancer**, v. 17, p. 1-17, 2017.
- BRISTOW, R. G; HILL, R. P. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 3, p. 180-192, 2008.
- BROWN, J. R.; SANSEAU, P. A computational view of microRNAs and their targets. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 595–601, 2005.
- CALIN, G. A. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 9, p. 2999-3004, 2004.
- CHEN, H. W. et al. Micro RNA differential expression profile in canine mammary gland tumor by next generation sequencing. **Gene**, v. 818, 2022.
- DI LEVA, G.; GAROFALO, M.; CROCE, C. M. MicroRNAs in cancer. **Annual Review of Pathology**, v.9, p. 287–314, 2014.
- DOBSON, J. M. Introduction: Cancer in cats and dogs. In: DOBSON, J. M.; LASCELLES, B. D. X. (Eds.). **BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology**. 3. ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, p. 1–5, 2011.

FORTERRE, A. A Comprehensive Review of Cancer MicroRNA Therapeutic Delivery Strategies. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1852, 2020.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, v. 19, p. 92–105, 2008.

GARZON, R. et al. MicroRNAs in Cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 60, n. 1, p. 167–179, 2009.

GIOIA, G. et al. Immunophenotype-related microRNA expression in canine chronic lymphocytic leukemia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, p. 228–235, 2011.

GRIMES, J. A. et al. A comparison of microRNA expression profiles from splenic hemangiosarcoma, splenic nodular hyperplasia, and normal spleens of dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 12, p. 272, 2016.

HALAZONETIS, T. D.; GORGOULIS, V. G.; BARTEK, J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. **Science**, v. 319, n. 5868, p. 1352–1355, 2008.

HU, Z. et al. Serum microRNA signatures identified in a genomewide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 10, p. 1721–1726, 2010.

IORIO, M. V. et al. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 16, p. 7065–7070, 2005.

IORIO, M. V.; CROCE, C. M. microRNA involvement in human cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 6, p. 1126–1133, 2012.

KASINSKI, A. L.; SLACK, F. J. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 12, p. 849–864, 2011.

KATO, M.; SLACK, F. J. MicroRNAs: small molecules with big roles - C. elegans to human cancer. **Biology of the Cell**, v. 100, p. 71–81, 2008.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogênese de pequenos RNAs em animais. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, p. 126–139, 2009.

KLOPFLEISCH, R. et al. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. **BMC Cancer**, v. 10, n. 618, 2010.

KOBAYASHI, M. et al. MicroRNA expression profiling in canine prostate cancer. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 4, p. 719–725, 2017.

KRISTIANSEN, V. M. et al. Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, p. 230-241, 2016.

KRÓL, M. et al. Macrophages mediate a switch between canonical and non-canonical Wnt pathways in canine mammary tumors. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014.

LAI, E. C. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. **Nature Genetics**, v. 30, p. 363–364, 2002.

LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v. 294, p. 853–858, 2001.

LAU, N. C. et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, p. 858-862, 2001.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, p. 843-854, 1993.

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell** v. 120, p. 15–20, 2005.

LIM, L. P. et al. Vertebrate microRNA genes. **Science**, v. 299, n. 5612, p. 1540, 2003.

LIM, L. P. et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. **Genes Development**. v. 17, p. 991–1008, 2003.

LUTFUL KABIR, F. M. et al. Canine mammary carcinomas: a comparative analysis of altered gene expression. **Veterinary Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1, 2015.

LUTFUL, K. F. M. et al. Tumor Suppressor Genes in Canine Breast Cancer Models. **Journal Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 12, p. 2956-69, 2015.

MA, L.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WEINBERG, R. A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. **Nature**, v. 373 n. 7163, p. 682–688, 2007.

MA, L. et al. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 341– 347, 2010.

NOGUCHI, S. et al. MicroRNAs as tumour suppressors in canine and human melanoma cells and as a prognostic factor in canine melanomas. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 2, p. 113-23, 2013.

O'BRIEN, J. et al. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. 402, 2018.

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.

REDDY, K. B. MicroRNA (miRNA) in cancer. **Cancer cell international**, v. 15, n. 1, p. 38, 2017.

REDDY, G. B. M. et al. Histopathological classification and incidence of canine mammary tumours. **Indian Journal of Veterinary Pathology**, v. 33, p. 152-155, 2009.

RODRIGUEZ, A. et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. **Science**, v. 316, n. 5824, p. 608-611, 2007.

LEE, R. C.; AMBROS, V. Uma extensa classe de pequenos RNAs em *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, p. 862-864, 2001.

SALAS, Y.; MARQUEZ, A.; DIAZ, D.; ROMERO, L. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002–2012: A growing animal health problem. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 2015.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics Am Small Animal Practice**, v. 33, p. 573–596, 2003.

STARKEY, M. P. et al. Metastasis-associated microRNA expression in canine uveal melanoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 16, n. 1, p. 81-89, 2017.

VON DEETZEN, M. C. et al. Malignancy associated microRNA expression changes in canine mammary cancer of different malignancies. **ISRN Veterinary Science**, v.2014, n. 148597, p. 1-5, 2014.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, p. 855-862, 1993.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. Why worry about cancer in companion animals? In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. (Eds.). **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 5. ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, p. 15–16, 2013.

YANG, N. et al. MicroRNAs: Pleiotropic Regulators in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2491, 2018.

ZHANG, B. et al. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. **Developmental Biology**, v. 289, p. 3–16, 2005.

ZHANG, B. et al. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. **Cell Research**, v. 15, n. 5, p. 336-360, 2005.

ZHANG, B. H.; PAN, X. P.; ANDERSON, T. A. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. **FEBS Letters**, v. 580, p. 3753–3762, 2006.