



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM REPRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA - REPROAMAZON

LETÍCIA DA SILVA RAIOL

EXPRESSÃO DE microRNAs EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE GATAS

BELÉM

2025

LETÍCIA DA SILVA RAIOL

EXPRESSÃO DE microRNAs EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE GATAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Reprodução Animal do Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal – ReproAmazon, para obtenção do título de Mestra em Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho.

BELÉM

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R149e Raiol, Letícia da silva
Expressão de micrnas em neoplasias mamárias de gatas / Letícia da silva Raiol. - 2026.
65 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Reprodução Animal na AMAZÔNIA (ReproAmazon), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2026.
Orientador: Prof. Dr. Sebastião tavares rolim Filho

1. Oncologia veterinaria. 2. anticoncepcional. 3. carcinoma mamario. 4. Microrna. 5. Rt-qpcr. I. Filho, Sebastião tavares rolim, *orient.* II. Título

CDD

636.0896964

LETÍCIA DA SILVA RAIOL

EXPRESSÃO DE microRNAs EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE GATAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Reprodução Animal do Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal – ReproAmazon, para obtenção do título de Mestra em Reprodução Animal.

Data de Aprovação: 28 de fevereiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente

SEBASTIAO TAVARES ROLIM FILHO

Data: 21/03/2025 10:40:05-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho – Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



Documento assinado digitalmente

EDNALDO DA SILVA FILHO

Data: 28/03/2025 18:24:04-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Ednaldo da Silva Filho – 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



Documento assinado digitalmente

SIMONE DO SOCORRO DAMASCENO SANTOS

Data: 21/03/2025 10:49:24-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Simone do Socorro Damasceno Santos – 2º Examinadora
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ



Documento assinado digitalmente

ANA CASSIA SARMENTO FERREIRA

Data: 28/03/2025 15:16:00-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Ana Cássia Sarmiento Ferreira – 3º Examinadora
INSTITUTO FEDERAL DO PARÁ

*Aos meus pais Abelardo Raiol e Adalgisa Raiol. É tudo por vocês,
sempre será.*

Agradeço a Deus por ter traçado cada passo do meu caminho, muito antes que eu pudesse imaginar até onde ele me levaria.

À minha família, em especial aos meus pais, Gisa e Abel, pois, se cheguei até aqui, foi por eles serem incansáveis, à minha irmã, Laís e aos meus avós, Dina e Aldemir ("Bebeco"), que sei que estaria muito feliz (*in memoriam*). Agradeço a todos por estarem sempre ao meu lado e por todo ensinamento, incentivo, apoio e amor. Amo vocês!

Aos meus queridos orientadores, Sebastião Rolim e Haroldo Ribeiro, pelas oportunidades e ensinamentos ao longo desses anos, desde a graduação, residência médica até agora, no mestrado na área da Reprodução Animal. Agradeço também a todos os demais professores que contribuíram de forma ímpar para a minha formação.

Ao meu amor e amigo Aquino, que não solta a minha mão desde antes de o meu nome sair no listão da UFRA.

Aos meus amigos Pedro Portela, residente do Laboratório de Patologia Animal (LaboPat), que foi diligente no auxílio com as minhas amostras histológicas e às minhas amigas residentes anestesistas, Carol Modesto e Elenara Botelho, por toda a ajuda com os animais e as amostras.

Agradeço ao Hospital Veterinário, aos residentes dos setores de Reprodução Animal e de Cirurgia, ao Instituto de Saúde e Produção Animal (ISPA) e a todos os demais amigos que foram de extrema importância, jamais esquecerei o apoio e a ajuda recebidos.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), pela infraestrutura e formação acadêmica (deixará saudades) e ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia (REPROAMAZON), pela oportunidade de realização deste mestrado.

À professora Dra. Simone Damasceno e à amiga Anelise Sarges, do Laboratório de Fertilização *in vitro* Otávio Ohashi na UFPA (LabFiv), pelo carinho e acolhimento na reta final do mestrado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à FAPESPA (Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa), pela bolsa concedida.

*"Entre o desafio do prognóstico e a fragilidade do paciente, a
veterinária se faz abrigo."*

RESUMO

As neoplasias mamárias felinas apresentam elevada frequência de malignidade e comportamento biológico agressivo, o que justifica a investigação de marcadores capazes de ampliar sua caracterização. O objetivo deste estudo foi descrever aspectos clínicos e patológicos de gatas com neoplasia mamária e explorar o perfil de quantificação por RT-qPCR de microRNAs selecionados, considerando o histórico de uso de anticoncepcionais. A amostra foi composta por seis gatas: quatro com neoplasia mamária, classificadas nos grupos sem anticoncepcional (FSA; n=2) e com anticoncepcional (FCA; n=2), e duas classificadas como controles (FC; n=2). A caracterização tumoral utilizou os quatro casos neoplásicos, enquanto a análise molecular incluiu os seis animais com resultados de RT-qPCR. Foram avaliados let-7a, miR-29b, miR-191, miR-200b, miR-200c, miR-484, miR-10b e miR-21. As gatas com tumor apresentaram média de idade de 10,75 anos, mediana de 10 anos e amplitude de 8 a 15 anos. A maior dimensão tumoral variou de 2,20 a 7,00 cm; duas das quatro lesões estavam ulceradas, ambas no FSA. Os diagnósticos histopatológicos incluíram carcinoma sólido, carcinoma sólido grau II/III, carcinoma cribriforme e carcinoma túbulo-papilífero grau II. As réplicas técnicas foram consolidadas por animal, e valores de Cq iguais a zero foram considerados ausentes nos cálculos. Os Cq médios de FC/FSA/FCA foram, respectivamente: let-7a 19,61/17,57/23,71; miR-29b 25,79/31,65/31,22; miR-191 25,11/28,28/31,18; miR-200b 25,53/26,71/26,70; miR-200c 25,47/30,72/30,54; miR-484 25,87/27,21/28,74; miR-10b 29,77/29,35/29,57; e miR-21 26,03/28,04/28,97. Como Cq maior corresponde, em condições comparáveis, a menor quantidade inicial do alvo, os dados foram interpretados como perfil exploratório de quantificação. Não foi aplicado $\Delta\Delta Cq$, pois não estavam disponíveis um normalizador endógeno validado e as eficiências dos ensaios. Os resultados evidenciam heterogeneidade clínica, histológica, biológica e técnica e sustentam a continuidade da investigação, mas não demonstram expressão diferencial nem efeito causal do anticoncepcional.

Palavras-chave: anticoncepcional; carcinoma mamário felino; microRNA; oncologia comparada; RT-qPCR.

ABSTRACT

Feline mammary neoplasms are frequently malignant and biologically aggressive, supporting the investigation of markers that may improve tumor characterization. This study described clinicopathological features of cats with mammary neoplasia and explored RT-qPCR quantification profiles of selected microRNAs according to contraceptive history. The study sample comprised six cats: four with mammary neoplasia, classified as no-contraceptive (FSA; n=2) or contraceptive-exposed (FCA; n=2), and two classified as controls (FC; n=2). Tumor characterization used the four neoplastic cases, whereas molecular analysis included all six animals with RT-qPCR results. The targets were let-7a, miR-29b, miR-191, miR-200b, miR-200c, miR-484, miR-10b, and miR-21. Tumor-bearing cats had a mean age of 10.75 years, a median age of 10 years, and a range of 8–15 years. Maximum tumor dimension ranged from 2.20 to 7.00 cm; two of four lesions were ulcerated, both in FSA. Histopathological diagnoses included solid carcinoma, grade II/III solid carcinoma, cribriform carcinoma, and grade II tubulopapillary carcinoma. Technical replicates were consolidated at the animal level, and Cq values equal to zero were treated as missing in the calculations. Mean Cq values for FC/FSA/FCA were, respectively: let-7a 19.61/17.57/23.71; miR-29b 25.79/31.65/31.22; miR-191 25.11/28.28/31.18; miR-200b 25.53/26.71/26.70; miR-200c 25.47/30.72/30.54; miR-484 25.87/27.21/28.74; miR-10b 29.77/29.35/29.57; and miR-21 26.03/28.04/28.97. Because a higher Cq corresponds, under comparable conditions, to a lower starting target quantity, the data were interpreted as an exploratory quantification profile. The $\Delta\Delta Cq$ method was not applied because a validated endogenous normalizer and assay efficiencies were not available. The findings demonstrate clinical, histological, biological, and technical heterogeneity and support further investigation, but they do not demonstrate differential expression or a causal effect of contraceptive exposure.

Keywords: contraceptive; feline mammary carcinoma; microRNA; comparative oncology; RT-qPCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cq – ciclo de quantificação.

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais.

EMT – transição epitélio-mesenquimal.

FCA – felina com neoplasia mamária e histórico de anticoncepcional.

FC – felina controle.

FSA – felina com neoplasia mamária sem histórico de anticoncepcional.

miRNA – microRNA.

mRNA – RNA mensageiro.

OSH – ovariosalpingohisterectomia.

RT-qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa após transcrição reversa.

UFRA – Universidade Federal Rural da Amazônia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxo amostral e definição dos denominadores analíticos	33
Figura 2 – Distribuição individual das idades das gatas com neoplasia mamária	37
Figura 3 – Distribuição individual da maior dimensão tumoral por grupo	38
Figura 4 – Aspectos clínicos das alterações mamárias observadas. A) Neoplasia mamária; B) hiperplasia e neoplasia mamárias	39
Figura 5 – Procedimento cirúrgico de mastectomia em gata	40
Figura 6 – Variabilidade entre réplicas técnicas dos microRNAs.....	41
Figura 7 – Mapa de Cq médio por animal e microRNA	42
Figura 8 – Distribuição dos Cq por grupo biológico.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequencias de nucleotídeos dos microRNAs.....	345
Tabela 2 – Composição da base molecular de RT-qPCR.....	40
Tabela 3 – Combinações com elevada variabilidade entre réplicas técnicas	41
Tabela 4 – Cq médio por grupo, calculado a partir das médias individuais.....	43
Tabela 5 – Síntese de estudos primários utilizados na comparação dos achados moleculares	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Problema de pesquisa.....	12
1.2 Hipótese de trabalho	12
1.3 Justificativa	13
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Anatomia, fisiologia e responsividade hormonal da glândula mamária felina.....	15
3.2 Epidemiologia e perfil clínico-patológico: evidências brasileiras e internacionais.....	16
3.3 Castração, anticoncepcionais e exposição a progestágenos.....	17
3.4 Apresentação clínica, estadiamento e fatores prognósticos.....	18
3.5 Histopatologia, sistemas de classificação e graduação	19
3.6 Tratamento, seguimento e prognóstico	20
3.7 Fenótipos moleculares e biomarcadores emergentes no carcinoma mamário felino.....	21
3.8 Microambiente tumoral, inflamação, transição fenotípica e vesículas extracelulares....	22
3.9 Oncologia comparada: limites e oportunidades do modelo felino	23
3.10 Biogênese, função e desregulação dos microRNAs	24
3.11 microRNAs em oncologia mamária felina e biomarcadores circulantes.....	25
3.12 microRNAs selecionados neste estudo	25
3.12.1 let-7a.....	26
3.12.2 miR-29b	26
3.12.3 miR-191	27
3.12.4 miR-200b e miR-200c.....	27
3.12.5 miR-484	28
3.12.6 miR-10b	29
3.12.7 miR-21	29
3.13 RT-qPCR, qualidade analítica, normalização e interpretação de Cq.....	30
3.14 Síntese do referencial e lacunas que sustentam o estudo.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Delineamento do estudo.....	33

4.2 Local e período	33
4.3 Aspectos éticos	33
4.4 Base clínico-patológica e grupos	34
4.5 Obtenção e conservação dos tecidos	34
4.6 Extração e avaliação do RNA	35
4.7 RT-qPCR	35
4.8 Consolidação das réplicas e controle de qualidade	36
4.9 Estratégia de análise	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Composição das bases	37
5.2 Idade	37
5.3 Localização e tamanho tumoral	38
5.4 Ulceração, cirurgia e histopatologia	38
5.5 Composição da base molecular	40
5.6 Variabilidade entre réplicas técnicas	40
5.7 Perfil global de Cq	42
5.8 Resultados por microRNA	43
5.8.1 let-7a	43
5.8.2 miR-29b	43
5.8.3 miR-191	43
5.8.4 miR-200b	43
5.8.5 miR-200c	44
5.8.6 miR-484	44
5.8.7 miR-10b	44
5.8.8 miR-21	44
6 DISCUSSÃO	45
6.1 Populações analíticas e unidade amostral	45
6.2 Perfil clínico-patológico e fatores prognósticos	45
6.3 Exposição a anticoncepcionais e fatores de confusão	46
6.4 Interpretação dos Cq e qualidade analítica	46
6.5 Comparabilidade entre estudos de microRNAs mamários	47
6.6 let-7a	48
6.7 miR-29b	48
6.8 miR-191	49

6.9 miR-200b e miR-200c	49
6.10 miR-484	50
6.11 miR-10b	50
6.12 miR-21	51
6.13 Integração dos achados e potencial como biomarcadores	51
6.14 Limitações.....	52
6.15 Pontos fortes e contribuição do estudo	52
7 CONCLUSÃO.....	53
8 DIRETRIZES PARA PESQUISAS FUTURAS	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE A – CONSOLIDAÇÃO DOS C _q POR ANIMAL	60

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias ocupam posição de destaque na oncologia felina por reunirem elevada proporção de malignidade, invasão local e capacidade metastática. Embora a incidência seja menor que a observada em cadelas, o comportamento biológico dos carcinomas mamários de gatas tende a ser mais agressivo, com evolução clínica frequentemente rápida e prognóstico condicionado pelo estágio da doença no momento do diagnóstico. Esse perfil torna indispensável combinar exame clínico, avaliação histopatológica e investigação de marcadores biológicos que contribuam para compreender a heterogeneidade tumoral (Giménez et al., 2010; Zappulli et al., 2015).

O tamanho da lesão, a ulceração, o grau histológico, a invasão linfovascular, o comprometimento linfonodal e a presença de metástases estão entre os fatores mais utilizados na estimativa prognóstica. Contudo, dois tumores semelhantes do ponto de vista macroscópico podem apresentar comportamento distinto, o que evidencia os limites de uma avaliação baseada apenas em morfologia e estadiamento. A incorporação de marcadores moleculares pode complementar essa leitura, identificar vias relacionadas à progressão e, futuramente, apoiar decisões diagnósticas ou terapêuticas.

A influência hormonal constitui outro eixo relevante. A esterilização precoce reduz o risco de carcinoma mamário, enquanto a administração repetida de progestágenos para supressão do estro foi associada a alterações proliferativas mamárias e maior risco de neoplasia. Ainda assim, a exposição a anticoncepcionais não atua isoladamente. Idade, duração do uso, princípio ativo, dose, estado ovariano, número de gestações e características próprias do tumor podem modificar a associação observada (Misdorp; Romijn; Hart, 1992; Overley et al., 2005).

Os microRNAs, pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão gênica após a transcrição, passaram a ser investigados como componentes importantes da biologia tumoral. Essas moléculas modulam proliferação, apoptose, diferenciação, angiogênese, interação com o microambiente e aquisição de capacidade invasiva. Dependendo dos genes-alvo e do contexto celular, podem funcionar como supressores tumorais ou como oncomiRs. A desregulação de perfis de microRNAs em cânceres humanos levou ao desenvolvimento de estudos diagnósticos, prognósticos e terapêuticos, mas a validação em medicina veterinária ainda é limitada (Bartel, 2004; Bertoli; Cava; Castiglioni, 2015).

A caracterização do miRNAoma felino demonstrou que o gato possui um repertório amplo e conservado de microRNAs, criando base para estudos em doenças espontâneas da

espécie (Laganà et al., 2017). No carcinoma mamário felino, a evidência disponível ainda é escassa, mas trabalhos sobre miR-10b em tumores primários e metástases mostraram semelhanças com mecanismos descritos no câncer de mama humano, reforçando o valor da oncologia comparada (Savan et al., 2022).

A RT-qPCR é frequentemente escolhida para estudos de microRNAs por sua sensibilidade e especificidade. Entretanto, o resultado bruto do equipamento precisa ser interpretado adequadamente. O Cq representa o ciclo em que a fluorescência ultrapassa um limiar e, em condições equivalentes, valores menores correspondem a maior quantidade inicial do alvo. A quantificação relativa exige normalização por referência estável, eficiência conhecida dos ensaios e controle rigoroso da qualidade das réplicas. Sem esses elementos, não é metodologicamente correto converter Cq bruto em “expressão aumentada” ou “reduzida” (Bustin et al., 2009, 2025).

A amostra do estudo contém seis animais. A caracterização clínica geral inclui os seis registros, mas as variáveis tumorais e histopatológicas referem-se aos quatro casos de neoplasia mamária. A análise molecular também inclui seis animais, distribuídos em FC, FSA e FCA. Os denominadores foram explicitados para cada resultado, mantendo o animal como unidade biológica e evitando que réplicas técnicas fossem confundidas com novos indivíduos.

O estudo avalia os microRNAs let-7a, miR-29b, miR-191, miR-200b, miR-200c, miR-484, miR-10b e miR-21. A seleção contempla moléculas associadas, em diferentes contextos, à proliferação, transição epitélio-mesenquimal, sinalização hormonal, invasão e metástase. Diante do pequeno número de animais por grupo e das limitações documentais do ensaio, a proposta não é declarar biomarcadores validados, mas apresentar uma análise exploratória tecnicamente coerente, identificar padrões e estabelecer requisitos para uma etapa confirmatória.

1.1 Problema de pesquisa

Quais características clínicas e patológicas são observadas em gatas com neoplasias mamárias classificadas segundo o histórico de uso de anticoncepcionais e quais padrões exploratórios de Cq são apresentados por microRNAs selecionados nos grupos controle, FSA e FCA?

1.2 Hipótese de trabalho

Parte-se da hipótese de que as neoplasias mamárias felinas apresentam heterogeneidade clínica e molecular e de que o histórico de exposição hormonal pode

acompanhar diferenças no perfil de microRNAs. Considerando o delineamento e o tamanho amostral, essa hipótese é tratada como geradora de novas investigações, e não como relação causal a ser confirmada neste estudo.

1.3 Justificativa

A relevância científica decorre da escassez de estudos de microRNAs em carcinoma mamário felino e da necessidade de métodos mais rigorosos para interpretar dados de RT-qPCR. A relevância clínica relaciona-se à agressividade da doença e à busca por marcadores que possam complementar os fatores prognósticos tradicionais. A relevância social e preventiva envolve o uso ainda recorrente de anticoncepcionais hormonais em gatas, muitas vezes sem acompanhamento veterinário, e a necessidade de produzir evidências que subsidiem orientação responsável aos tutores. Por fim, a relevância translacional reside nas semelhanças entre tumores mamários felinos e subtipos agressivos de câncer de mama humano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar aspectos clínicos e patológicos de gatas com neoplasias mamárias e avaliar, de modo exploratório, o perfil de Cq de microRNAs selecionados em animais com e sem histórico de uso de anticoncepcionais, utilizando gatas controle como referência molecular descritiva.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever a distribuição dos animais segundo idade, localização tumoral, maior dimensão da lesão, ulceração, cirurgia e diagnóstico histopatológico.
- Caracterizar separadamente os grupos FSA e FCA, sem atribuir à exposição hormonal relações causais não demonstradas pelo delineamento.
- Identificar a composição da base molecular e manter as réplicas técnicas no nível correto de análise.
- Recalcular as médias de Cq por animal, desconsiderando valores iguais a zero como Cq não válido.
- Avaliar a variabilidade das triplicatas técnicas e sua repercussão sobre a confiabilidade das estimativas de Cq.
- Descrever os padrões de Cq de let-7a, miR-29b, miR-191, miR-200b, miR-200c, miR-484, miR-10b e miR-21 nos grupos FC, FSA e FCA.
- Discutir os achados em relação à literatura de carcinoma mamário felino, câncer de mama humano e oncologia comparada.
- Delimitar as limitações metodológicas e propor procedimentos para validação futura da expressão relativa dos microRNAs.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomia, fisiologia e responsividade hormonal da glândula mamária felina

A glândula mamária da gata é organizada em quatro pares de mamas distribuídos ao longo das regiões torácica e abdominal. Como em outros mamíferos, o epitélio ductal e lobuloalveolar responde a estímulos endócrinos que variam com a idade, o ciclo reprodutivo, a gestação e a lactação. A proliferação e a diferenciação do tecido mamário resultam de uma interação entre hormônios ovarianos, fatores de crescimento e sinais locais do estroma. Essa dependência fisiológica é relevante para a oncologia porque parte dos fatores associados ao risco de neoplasia mamária felina também se relaciona à duração e à intensidade da exposição hormonal ao longo da vida reprodutiva (Overley et al., 2005; Withrow; Vail; Page, 2013).

A progesterona possui papel importante na diferenciação lobuloalveolar e na manutenção de respostas proliferativas do tecido mamário. Em condições de estimulação hormonal exógena, sobretudo com progestágenos utilizados para supressão do estro, podem ocorrer alterações proliferativas mamárias e uterinas. A literatura sobre contracepção felina ressalta que os progestágenos tradicionais não são isentos de efeitos adversos e que risco, dose, duração e contexto clínico devem ser considerados na decisão reprodutiva (Ferré Dolcet, 2025).

Uma alteração mamária hormonalmente responsiva que integra o diagnóstico diferencial é a hiperplasia fibroepitelial, também denominada hiperplasia fibroadenomatosa. Trata-se de proliferação benigna que pode surgir em fêmeas jovens após exposição endógena ou exógena à progesterona. Sua importância para estudos de neoplasia decorre da necessidade de distinguir proliferações hormonais não neoplásicas de tumores epiteliais malignos por meio do exame histopatológico, evitando que a associação entre hormônios e aumento mamário seja interpretada, por si só, como evidência de carcinogênese (Giménez et al., 2010; Rodrigues-Jesus et al., 2025a).

A responsividade hormonal dos carcinomas mamários felinos, entretanto, não é uniforme. Tumores espontâneos podem diferir quanto à expressão de receptores de estrogênio, progesterona e HER2, bem como quanto a vias proliferativas e inflamatórias. Essa heterogeneidade reforça que o histórico reprodutivo e o uso de anticoncepcionais são variáveis biológicas relevantes, mas não suficientes para explicar isoladamente o fenótipo de um carcinoma ou seu perfil de microRNAs (Cassali et al., 2025; Gameiro; Urbano; Ferreira, 2021).

3.2 Epidemiologia e perfil clínico-patológico: evidências brasileiras e internacionais

Os tumores mamários estão entre as neoplasias mais frequentes de gatas e apresentam proporção de malignidade superior à observada em muitas séries caninas. Revisões recentes ressaltam, contudo, que a frequência absoluta e a distribuição dos histotipos variam conforme localização geográfica, população atendida, critérios de inclusão e sistema de classificação utilizado. Por essa razão, dados regionais são necessários para contextualizar casuísticas brasileiras e evitar a transposição automática de percentuais provenientes de outros países (Rodrigues-Jesus et al., 2025a).

No Brasil, Souza et al. (2024) publicaram uma das maiores caracterizações recentes de lesões mamárias felinas, reunindo espécimes de 418 gatos submetidos à remoção cirúrgica, com ou sem linfadenectomia, e identificando 858 lesões. O estudo confirmou o predomínio de neoplasias malignas e mostrou que os animais com tumores malignos eram mais velhos do que aqueles com lesões benignas ou não neoplásicas. Além da dimensão da casuística, o trabalho é relevante por demonstrar a diversidade morfológica das lesões mamárias encontradas na rotina diagnóstica brasileira e por reforçar a necessidade de correlacionar achados epidemiológicos, clínicos e histopatológicos (Souza et al., 2024).

Outro levantamento nacional recente, realizado em Fortaleza com laudos de 2022 e 2023, avaliou 40 felinos e 54 lesões mamárias. Entre as lesões felinas, 87,04% foram classificadas como malignas, 3,70% como benignas e 9,26% como não neoplásicas. O carcinoma cribriforme foi o tipo maligno mais frequente, correspondendo a 24,07% das lesões. Nesse conjunto, tumores maiores que 3 cm representaram 42,59% das avaliações do tumor primário, e, entre os linfonodos com metástase, houve elevada participação de macrometástases. Esses dados brasileiros são particularmente úteis para esta dissertação porque demonstram que tamanho tumoral avançado e comportamento metastático permanecem problemas concretos na prática oncológica felina nacional (Souza et al., 2024).

A comparação entre estudos brasileiros e internacionais deve ser feita com cautela. Parte das diferenças na frequência dos histotipos decorre da evolução dos sistemas classificatórios e da seleção dos casos encaminhados à histopatologia. A revisão de Rodrigues-Jesus et al. (2025a) destaca que o tamanho reduzido de várias coortes, a diversidade de desfechos e a falta de uniformidade na avaliação de fatores prognósticos dificultam a generalização dos achados. Assim, séries nacionais recentes não devem ser tratadas apenas como confirmação de números internacionais, mas como evidência própria sobre o perfil da doença em populações atendidas no Brasil.

O predomínio de gatas adultas e idosas nas casuísticas de carcinoma mamário é recorrente. Esse aspecto tem importância metodológica em estudos moleculares, porque grupos com diferenças substanciais de idade podem apresentar variações biológicas independentes do fator de exposição investigado. Consequentemente, idade, estado reprodutivo, histotipo, grau e extensão da doença precisam ser descritos e considerados como potenciais fontes de heterogeneidade quando se comparam perfis de expressão entre animais (Rodrigues-Jesus et al., 2025a; Souza et al., 2024).

3.3 Castração, anticoncepcionais e exposição a progestágenos

A relação entre estado reprodutivo e risco de carcinoma mamário felino está apoiada por estudos epidemiológicos clássicos. A ovariectomia ou ovariectomia realizada precocemente foi associada à redução do risco de desenvolvimento de carcinoma mamário, enquanto a administração regular de progestágenos foi associada a aumento de risco em determinadas populações. Esses achados estabeleceram a base para considerar a exposição hormonal como variável relevante na epidemiologia da doença (Misdorp; Romijn; Hart, 1992; Overley et al., 2005).

A literatura contemporânea sobre controle reprodutivo continua tratando a segurança dos progestágenos como uma preocupação. Ferré Dolcet (2025), ao revisar métodos reversíveis de contracepção em felinos, ressalta que progestágenos tradicionais podem estar associados a alterações mamárias, afecções uterinas e complicações metabólicas, além de destacar a importância do princípio ativo, da dose, do intervalo e da duração do uso. Esse conjunto de fatores mostra por que a simples classificação dicotômica “usou” ou “não usou” anticoncepcional é insuficiente para estimar exposição hormonal acumulada.

Do ponto de vista biológico, a hipótese de que a exposição hormonal possa modificar vias de regulação gênica é plausível, mas não autoriza atribuir a ela qualquer diferença molecular observada em pequenos grupos de tumores. Carcinomas mamários espontâneos acumulam alterações genéticas, epigenéticas, inflamatórias e microambientais que também modulam expressão gênica e microRNAs. Portanto, em desenhos observacionais, o histórico de anticoncepcional deve ser interpretado em conjunto com idade, castração, tamanho, grau, subtipo histológico, invasão linfovascular e presença de metástase (Gameiro; Urbano; Ferreira, 2021; Vilela et al., 2024).

Há ainda uma lacuna específica para a pergunta desta dissertação: embora seja biologicamente justificável investigar microRNAs em tumores de gatas expostas ou não a

anticoncepcionais, a literatura recente não estabelece uma assinatura de microRNAs validada como consequência direta do uso de progestágenos em carcinoma mamário felino. Assim, diferenças entre grupos devem ser apresentadas como achados exploratórios e geradores de hipóteses, e não como efeito causal do anticoncepcional.

3.4 Apresentação clínica, estadiamento e fatores prognósticos

Os carcinomas mamários felinos podem se apresentar como nódulos únicos ou múltiplos, comprometendo uma ou mais glândulas e, em alguns casos, ambas as cadeias mamárias. Ulceração, aderência, crescimento infiltrativo e comprometimento linfonodal sugerem doença localmente avançada. O estadiamento clínico, portanto, não se limita à medida do nódulo: integra tamanho do tumor primário, envolvimento de linfonodos regionais e metástases à distância, além de características locais que podem modificar o prognóstico (Giménez et al., 2010; Rodrigues-Jesus et al., 2025a).

Monteiro, Petrucci e Queiroga (2025), em análise retrospectiva de 75 gatas com carcinoma mamário, confirmaram que tumor maior que 3 cm, ulceração, invasão linfovascular e metástase linfonodal estavam associados a menor sobrevida. Na análise multivariável, invasão linfovascular, graus histológicos II e III e ulceração cutânea permaneceram fatores prognósticos relevantes. Os autores propuseram refinamento do estágio III, distinguindo tumores grandes sem linfonodo positivo, lesões com invasão/ulceração e casos com metástase regional. A proposta reforça que tumores agrupados sob um mesmo estágio tradicional podem possuir riscos diferentes (Monteiro; Petrucci; Queiroga, 2025).

Os dados brasileiros de Fortaleza convergem com a relevância clínica do tamanho e da avaliação linfonodal. Na série de Sousa et al. (2024), 42,59% das classificações tumorais felinas correspondiam a tumores maiores que 3 cm, e a avaliação de linfonodos mostrou participação expressiva de macrometástases. Ainda que o desenho não tenha sido de sobrevida, o perfil demonstra que casos avançados continuam presentes na rotina diagnóstica brasileira e justifica a coleta sistemática de dados de estadiamento nos estudos de biomarcadores.

Além das variáveis anatômicas e histológicas, marcadores sistêmicos vêm sendo investigados. Em estudo brasileiro, Soares et al. (2023) avaliaram parâmetros hematológicos e bioquímicos em gatas com carcinoma mamário submetidas à cirurgia. A mediana de sobrevida global foi de 365 dias e a mediana de sobrevida livre de doença de 242 dias; contagem plaquetária e concentração de hemoglobina corpuscular média permaneceram

fatores independentes associados à sobrevida global na análise multivariável. O trabalho mostra que biomarcadores prognósticos podem emergir de diferentes níveis biológicos e que o valor clínico de microRNAs deve futuramente ser testado em modelos que incluam variáveis clínico-patológicas já reconhecidas (Soares et al., 2023).

3.5 Histopatologia, sistemas de classificação e graduação

A histopatologia permanece o padrão de referência para confirmação e classificação dos tumores mamários felinos. Além de definir o tipo de neoplasia, o exame permite avaliar diferenciação, padrão de crescimento, mitoses, necrose, invasão linfovascular e outras características associadas ao comportamento biológico. Revisões recentes enfatizam que a nomenclatura dos tumores mamários felinos evoluiu significativamente e que comparações históricas exigem conhecimento do sistema de classificação utilizado em cada estudo (Rodrigues-Jesus et al., 2025a).

No contexto brasileiro e latino-americano, esforços de padronização têm buscado aproximar diagnóstico, prognóstico e tratamento. O consenso coordenado por Cassali et al. (2024) reúne recomendações para tumores mamários caninos e felinos de arranjo sólido e reforça a necessidade de descrição histopatológica sistematizada, interpretação do grau e integração com informações clínicas. Essa padronização é especialmente importante em tumores sólidos, pois diferenças de arquitetura e diferenciação podem modificar a classificação e a interpretação prognóstica.

A validade prognóstica dos sistemas de classificação continua sendo objeto de investigação. Em estudo de sobrevida publicado em 2026, Rodrigues-Jesus et al. (2026a) compararam a classificação da Organização Mundial da Saúde de 1999 com a classificação de patologia cirúrgica revisada em 2019. A classificação de 2019 permitiu maior estratificação dos tumores; carcinomas associados a ductos apresentaram sobrevida mais favorável, enquanto tumores múltiplos sincrônicos, maior tamanho, estágio clínico mais elevado, crescimento infiltrativo e invasão linfovascular se associaram a piores desfechos.

No segundo estudo da mesma coorte, diferentes sistemas de graduação e o índice prognóstico de Nottingham adaptado à veterinária foram comparados. Os autores observaram concordância limitada entre os sistemas e demonstraram que o desempenho prognóstico variava conforme o desfecho analisado. O sistema original de Elston-Ellis e a versão revisada mantiveram associação com sobrevida global após ajuste, enquanto outro sistema apresentou melhor relação com intervalo livre de doença. Os achados apoiam o uso cuidadoso da

graduação e indicam que critérios mitóticos ainda necessitam de validação em coortes independentes (Rodrigues-Jesus et al., 2026b).

Esses avanços têm consequência direta para estudos moleculares. Um microRNA pode parecer associado a determinado grupo simplesmente porque esse grupo reúne maior proporção de tumores de alto grau, infiltrativos ou de um histotipo particular. Quanto menor a amostra biológica, maior é o risco de confusão. Por isso, a descrição histológica detalhada não é informação acessória, mas parte indispensável da interpretação de biomarcadores em carcinoma mamário felino.

3.6 Tratamento, seguimento e prognóstico

A cirurgia permanece a principal modalidade de tratamento local para carcinomas mamários felinos ressecáveis. A extensão da mastectomia é definida de acordo com distribuição, número e localização das lesões, condições clínicas da paciente e avaliação dos linfonodos. A literatura sustenta a importância do diagnóstico precoce e da abordagem cirúrgica adequada, mas o risco de recorrência e metástase continua elevado em tumores avançados (Giménez et al., 2010; Gemignani et al., 2018).

A associação entre estratégia cirúrgica e desfecho não pode ser interpretada sem considerar estágio e características tumorais. No estudo de Gemignani et al. (2018), realizado com 107 gatos, a abordagem cirúrgica foi analisada em conjunto com complicações, progressão e sobrevida específica da doença. Trabalhos subsequentes reforçaram que tamanho, grau, invasão linfovascular, crescimento infiltrativo e comprometimento linfonodal possuem peso prognóstico relevante, demonstrando que a avaliação do tratamento deve ser ajustada ao risco basal do animal (Monteiro; Petrucci; Queiroga, 2025; Rodrigues-Jesus et al., 2026a).

Terapias sistêmicas adjuvantes são empregadas em situações selecionadas, porém a evidência veterinária é menos consolidada que na oncologia humana. A investigação contemporânea tem se voltado para biomarcadores preditivos, receptores, vias de sinalização e alvos imunológicos que possam orientar terapias mais específicas. Gameiro, Urbano e Ferreira (2021) sintetizaram avanços em HER2, subtipos triplo-negativos e terapias direcionadas, enquanto Vilela et al. (2024) revisaram o potencial de checkpoints imunes como PD-1, CTLA-4, LAG-3, VISTA e TIM-3 no contexto comparativo entre carcinoma mamário felino e câncer de mama humano.

A evolução do conhecimento sugere que o prognóstico do carcinoma mamário felino deve ser compreendido como resultado da interação entre extensão anatômica, características histológicas e biologia molecular. Biomarcadores como microRNAs são promissores justamente por poderem acrescentar informação a essas dimensões, mas seu valor clínico depende de demonstrar ganho prognóstico ou diagnóstico além dos fatores convencionais já estabelecidos.

3.7 Fenótipos moleculares e biomarcadores emergentes no carcinoma mamário felino

O carcinoma mamário felino não constitui uma entidade molecular uniforme. Estudos de imunofenotipagem e biologia tumoral sustentam a existência de perfis análogos, com limitações, aos subtipos utilizados no câncer de mama humano, incluindo fenótipos luminais, HER2-positivos e triplo-negativos. A utilidade dessa comparação está em formular hipóteses sobre vias de sinalização e resposta terapêutica; sua limitação está em supor equivalência completa entre espécies (Cassali et al., 2025; Gameiro; Urbano; Ferreira, 2021).

A busca por biomarcadores felinos vem incorporando proteínas, parâmetros hematológicos, assinaturas de expressão e análises ômicas. O estudo brasileiro de Soares et al. (2023) ilustra o potencial de marcadores periféricos de baixo custo, enquanto investigações moleculares recentes procuram identificar alterações mais diretamente ligadas à biologia tumoral. Essa coexistência de marcadores simples e complexos é relevante: a utilidade clínica de um biomarcador depende não apenas da associação biológica, mas também de reprodutibilidade, custo, acessibilidade e capacidade de modificar a decisão clínica.

Em 2025, Aruvornlop et al. compararam o fosfoproteoma de carcinomas mamários felinos de diferentes graus com controles mamários normais. O estudo incluiu tumores dos graus 1, 2 e 3 e identificou fosfoproteínas diferencialmente reguladas, incluindo candidatos relacionados à patogênese e ao prognóstico do câncer de mama humano. Os achados mostram que alterações pós-traducionais também distinguem estados tumorais e que a biologia molecular do carcinoma felino pode ser interrogada além da expressão de RNA (Aruvornlop et al., 2025).

Do ponto de vista translacional, esses estudos reforçam que biomarcadores devem ser avaliados em camadas complementares. microRNAs podem refletir regulação pós-transcricional; fosfoproteínas refletem ativação de vias; imunomarcadores revelam fenótipo celular; e variáveis histológicas sintetizam o comportamento tecidual. A integração dessas

informações tende a ser mais informativa que a interpretação isolada de uma única molécula (Cassali et al., 2025).

3.8 Microambiente tumoral, inflamação, transição fenotípica e vesículas extracelulares

A compreensão contemporânea do câncer reconhece que a progressão tumoral depende não apenas das células neoplásicas, mas também do microambiente constituído por células imunes, fibroblastos, matriz extracelular, vasos e mediadores solúveis. O conceito é particularmente importante para os microRNAs, pois essas moléculas podem ser expressas por diferentes compartimentos celulares e também transportadas em vesículas extracelulares. Portanto, o perfil obtido de um fragmento tumoral representa uma mistura da contribuição de células neoplásicas e não neoplásicas presentes na amostra (Hanahan, 2022; Rodrigues-Jesus et al., 2025b).

Em carcinomas mamários felinos, Nascimento et al. (2022) demonstraram valor clínico da composição imune do microambiente em uma série de 73 tumores. Maior proporção de linfócitos T CD8⁺ no estroma foi associada a maior sobrevida livre de doença e sobrevida global, enquanto maior proporção intratumoral de células CD4⁺ se correlacionou com positividade linfonodal. Macrófagos CD163⁺ foram associados a tumores indiferenciados. Esses achados demonstram que localização e fenótipo das células imunes são relevantes, não apenas a presença genérica de inflamação.

Rodrigues-Jesus et al. (2024) ampliaram essa análise ao caracterizar infiltrados inflamatórios em 307 lesões mamárias de 185 gatas, além de controles sem alterações mamárias. Infiltrados intra e perilesionais foram frequentes e mais marcantes nas neoplasias malignas. A distribuição espacial da inflamação e a presença de estruturas linfoides terciárias integram, assim, uma dimensão histológica do microambiente que pode influenciar prognóstico e também a composição molecular do tecido analisado.

As vesículas extracelulares representam outro componente emergente da comunicação tumoral. Chang et al. (2023) demonstraram experimentalmente que vesículas derivadas de carcinoma mamário felino podem favorecer a formação de nicho pré-metastático hepático por meio de esfingosina quinase 1, ativando células estreladas hepáticas. A redução ou inibição dessa via diminuiu a ativação induzida pelas vesículas e a colonização hepática no modelo utilizado. O estudo fornece evidência mecanística de que o tumor felino pode preparar órgãos distantes antes do estabelecimento de metástases macroscópicas.

No campo dos microRNAs, Howard et al. (2023) demonstraram que perfis de proteínas e miRNAs em vesículas extracelulares plasmáticas diferenciaram gatas com adenocarcinoma mamário de controles saudáveis. O trabalho encontrou alterações em miRNAs no tecido e em vesículas plasmáticas, mostrando que o sentido da variação pode depender do compartimento analisado. Essa observação é fundamental: um miRNA reduzido em vesículas circulantes não necessariamente apresenta o mesmo padrão no tecido tumoral, e resultados de soro, plasma, vesículas e tecido não devem ser comparados como se fossem equivalentes.

3.9 Oncologia comparada: limites e oportunidades do modelo felino

A oncologia comparada utiliza tumores espontâneos de animais de companhia para investigar mecanismos relevantes também ao câncer humano. Gatas com carcinoma mamário desenvolvem doença em organismo imunocompetente, sob envelhecimento, exposições ambientais e heterogeneidade natural, aspectos que diferenciam esse modelo de muitos tumores induzidos experimentalmente. Ao mesmo tempo, diferenças de espécie, expectativa de vida, manejo reprodutivo e disponibilidade terapêutica impõem limites à extrapolação (Cassali et al., 2025).

Uma revisão brasileira publicada em 2025 reuniu evidências de tumores mamários caninos, felinos e murinos como modelos para pesquisa translacional em câncer de mama, abordando diagnóstico, fatores prognósticos, microambiente, inflamação e terapias. Os autores destacam que modelos espontâneos podem contribuir para compreender progressão e resposta terapêutica, desde que cada espécie seja analisada em seu próprio contexto biológico (Cassali et al., 2025).

O carcinoma mamário felino tem despertado interesse especial para formas agressivas de câncer de mama. Gameiro, Urbano e Ferreira (2021) discutem semelhanças moleculares relevantes em fenótipos HER2-positivos e triplo-negativos, e Vilela et al. (2024) ampliam a comparação para checkpoints imunes e microambiente. Essas aproximações oferecem racional para selecionar biomarcadores e alvos terapêuticos, mas não autorizam assumir que um marcador validado em mulheres terá desempenho idêntico em gatas.

O estudo de Savan et al. (2022) é um exemplo concreto de investigação translacional envolvendo microRNA. Os autores avaliaram miR-10b em tumores e metástases felinas e, a partir de evidências prévias em câncer de mama, testaram em uma gata com doença metastática uma estratégia experimental baseada em anti-miR-10b conjugado a

nanopartículas. A demonstração de distribuição do agente às lesões e de alteração de miR-10b/HOXD10 após a administração mostrou como o modelo felino pode participar de etapas intermediárias de desenvolvimento terapêutico sem apagar as diferenças entre espécies.

3.10 Biogênese, função e desregulação dos microRNAs

Os microRNAs são pequenos RNAs não codificantes, em geral com aproximadamente 18 a 25 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional. Sua descoberta remonta ao lin-4 em *Caenorhabditis elegans*, e trabalhos posteriores demonstraram que a regulação por microRNAs é amplamente conservada e participa de desenvolvimento, diferenciação, proliferação, apoptose e resposta ao estresse (Lee; Feinbaum; Ambros, 1993; Bartel, 2004).

Na via canônica, transcritos primários de microRNA são processados no núcleo e dão origem a precursores que são exportados para o citoplasma, onde ocorre processamento adicional. Uma das fitas maduras é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA e reconhece RNAs mensageiros por complementaridade de sequência, promovendo repressão da tradução e/ou redução da estabilidade do transcrito. Como um microRNA pode regular numerosos alvos, pequenas mudanças na sua abundância podem repercutir em diferentes vias simultaneamente (Bartel, 2004; Hayes; Peruzzi; Lawler, 2014).

No câncer, a desregulação dos microRNAs pode resultar de alterações cromossômicas, mudanças epigenéticas, modificação de fatores de transcrição ou perturbações da própria maquinaria de biogênese. Em consequência, determinados microRNAs atuam predominantemente como supressores tumorais, enquanto outros favorecem fenótipos oncogênicos. Essa classificação não é absoluta: o efeito depende do conjunto de alvos disponível, do tipo celular, do estágio da doença e do microambiente (Hanahan, 2022; Iorio; Croce, 2012).

A caracterização do miRNAoma felino estabeleceu uma base essencial para a pesquisa na espécie. Laganà et al. (2017) identificaram precursores e sequências maduras de microRNAs em tecidos felinos, permitindo avançar da extrapolação de sequências de outras espécies para estudos dirigidos no gato. Desde então, a utilização de microRNAs como biomarcadores em medicina felina vem se ampliando, embora permaneça muito menor que a produção científica em oncologia humana e canina.

3.11 microRNAs em oncologia mamária felina e biomarcadores circulantes

O interesse pelos microRNAs como biomarcadores decorre de três características principais: participação direta em vias do câncer, possibilidade de mensuração por técnicas sensíveis e presença em diferentes materiais biológicos. Em tecidos, podem refletir composição e estado funcional do tumor; na circulação, podem estar livres associados a proteínas ou protegidos em vesículas extracelulares. Entretanto, o desempenho de um biomarcador depende do material, da etapa pré-analítica, da técnica de quantificação e do método de normalização (Bertoli; Cava; Castiglioni, 2015; Bustin et al., 2025).

Na oncologia felina, a evidência direta ainda é limitada. Howard et al. (2023) demonstraram diferenças no conteúdo de miRNAs de tecido e de vesículas extracelulares plasmáticas entre gatas com adenocarcinoma mamário e controles. Savan et al. (2022) demonstraram relevância de miR-10b em doença metastática. Esses estudos são importantes porque utilizam a espécie-alvo, mas também mostram que o campo ainda não possui, para a maioria dos microRNAs candidatos, grandes coortes independentes com validação diagnóstica e prognóstica.

Por isso, estudos em cães e humanos são úteis como evidência comparativa, não como substitutos de validação felina. Em tumores mamários caninos, diferentes trabalhos identificaram alterações de let-7, miR-29b, miR-21 e outros microRNAs associadas a histotipo e comportamento metastático (Boggs et al., 2008; Bulkowska et al., 2017; Ferreira et al., 2025; Huniadi et al., 2026). A utilidade dessa literatura está em indicar vias e candidatos biologicamente plausíveis; a limitação está em diferenças de espécie, classificação tumoral e composição da amostra.

Outra questão é a discrepância entre tecido e circulação. Um tumor pode reter determinados microRNAs e secretar seletivamente outros em vesículas. Além disso, sangue e plasma contêm microRNAs produzidos por células hematológicas, endoteliais e imunes. Assim, um marcador circulante pode ter valor clínico mesmo sem reproduzir exatamente a expressão do tecido, mas sua interpretação exige desenho específico e controles apropriados (Chang et al., 2023; Howard et al., 2023).

3.12 microRNAs selecionados neste estudo

A seleção de let-7a, miR-29b, miR-191, miR-200b, miR-200c, miR-484, miR-10b e miR-21 reúne moléculas envolvidas em processos distintos e complementares da carcinogênese, como diferenciação, apoptose, plasticidade epitelial, remodelamento do

microambiente e metástase. A força da evidência, entretanto, não é igual para todos os alvos. Para miR-10b existem dados diretamente em carcinoma mamário felino; para os demais, grande parte do racional provém de câncer de mama humano e de estudos mamários caninos. Essa diferença é explicitada a seguir para evitar que evidência comparativa seja apresentada como validação na espécie felina.

3.12.1 let-7a

A família let-7 está entre os grupos clássicos de microRNAs com função predominantemente supressora tumoral. Seus membros regulam oncogenes e vias associadas a proliferação, diferenciação e manutenção de fenótipos indiferenciados. Em câncer de mama humano, a redução de let-7 tem sido relacionada à ativação do eixo Lin28/let-7, no qual Lin28A e Lin28B bloqueiam etapas da biogênese de let-7 e favorecem a expressão de genes pró-tumorais (Ali; Ahmad; Parveen, 2025; Liu et al., 2015).

A revisão de Ali, Ahmad e Parveen (2025) descreve associação entre redução de let-7 e aumento de Lin28 em diferentes subtipos de câncer de mama humano, incluindo tumores receptor de estrogênio positivos e negativos, HER2-positivos e, no caso de Lin28B, tumores triplo-negativos. O eixo também é discutido em relação à metástase e resistência terapêutica. Esses dados atualizam o racional para investigar let-7a, mas permanecem evidência humana.

Em medicina veterinária, estudos caninos recentes continuam incluindo membros da família let-7 entre potenciais discriminadores moleculares de tumores mamários. Ferreira et al. (2025) avaliaram let-7b, miR-29b e miR-125b em diferentes tipos histológicos de carcinoma mamário canino. A proximidade funcional entre membros da família não permite, contudo, substituir dados específicos de let-7a ou extrapolar diretamente o padrão canino para tecido mamário felino.

3.12.2 miR-29b

O miR-29b participa de vias relacionadas a matriz extracelular, diferenciação, epigenética, apoptose e metástase. Em câncer de mama humano, a literatura descreve predominantemente atividade supressora tumoral, inclusive por eixos envolvendo GATA3; entretanto, a direção do efeito não é uniforme entre modelos. Amirian et al. (2023) sintetizaram essa aparente contradição e mostraram que membros da família miR-29 podem apresentar efeitos distintos conforme subtipo, compartimento e rede de alvos.

A dependência do contexto é reforçada por Jurj et al. (2023), que estudaram miR-29b-3p em linhagens de câncer de mama triplo-negativo. A inibição do microRNA reduziu

proliferação e formação de colônias e modificou vias de apoptose e autofagia, indicando que, naquele modelo específico, níveis elevados podiam sustentar aspectos do fenótipo tumoral. O achado contrasta com estudos que descrevem miR-29b como supressor e ilustra por que a função não deve ser inferida a partir de uma única direção de variação.

Em tumores mamários caninos, Ferreira et al. (2025) identificaram utilidade potencial de miR-29b, em conjunto com outros microRNAs, para diferenciação de tipos histológicos. A ausência de uma base equivalente e ampla em carcinoma mamário felino transforma o miR-29b, neste estudo, em candidato exploratório cuja interpretação deve priorizar o dado obtido na amostra e não uma expectativa prévia de aumento ou redução.

3.12.3 miR-191

O miR-191 foi inicialmente relacionado ao câncer de mama humano como microRNA responsivo ao estrogênio, com capacidade de influenciar proliferação, migração e sobrevivência celular. Nagpal et al. (2013) demonstraram sua regulação em modelos de câncer de mama e contribuíram para o interesse desse alvo em estudos que envolvem contexto hormonal.

Trabalhos mais recentes ampliaram seu papel para a comunicação entre tumor e microambiente. Ni et al. (2024) observaram aumento de miR-191-5p em amostras humanas de câncer de mama e demonstraram que exossomos derivados de células tumorais podiam transferir miR-191-5p a macrófagos, favorecendo polarização do tipo M2 por regulação de SOCS3. O estudo associa esse microRNA não apenas à célula tumoral, mas à remodelação imune do microambiente.

Esse racional é interessante para uma pesquisa que estratifica gatas segundo histórico de anticoncepcional, porém não deve ser confundido com prova de efeito dos progestágenos felinos sobre miR-191. O estímulo hormonal, a espécie, o material biológico e o contexto tumoral são diferentes. Além disso, miR-191 já foi empregado como possível controle endógeno em estudos de soro humano, o que demonstra que a estabilidade de um microRNA é dependente da matriz e não uma propriedade universal (Hu et al., 2012).

3.12.4 miR-200b e miR-200c

A família miR-200 desempenha papel conhecido na plasticidade epitelial e na transição epitélio-mesenquimal, principalmente por interação com fatores como ZEB1 e ZEB2. Estudos clássicos demonstraram que miR-200b e miR-200c podem sustentar características epiteliais e reduzir programas mesenquimais em determinadas células tumorais

(Gregory et al., 2008). A relação entre essa família e agressividade, entretanto, não é linear em todos os compartimentos do tumor.

Evidências humanas recentes ilustram essa complexidade. Qiao et al. (2024) encontraram níveis reduzidos de miR-200c em exossomos séricos de pacientes com câncer de mama em comparação com controles e doença mamária benigna, propondo utilidade diagnóstica no material circulante. Em contraste, Lin et al. (2024) demonstraram que aumento de miR-200c em uma subpopulação de fibroblastos associados ao câncer podia reprogramar o estroma para um fenótipo pró-tumoral, favorecendo inflamação, metabolismo glicolítico, crescimento e resistência terapêutica. Os resultados não são contraditórios quando se considera que foram avaliados compartimentos celulares e materiais distintos.

Em tecido mamário felino, portanto, a interpretação de miR-200b e miR-200c deve considerar a proporção relativa de células epiteliais, fibroblastos, infiltrado imune e áreas necróticas. Uma diferença de Cq em tecido total não informa qual célula contribuiu para a variação. Essa limitação é particularmente relevante em amostras pequenas e histologicamente heterogêneas.

3.12.5 miR-484

O miR-484 tem sido estudado tanto como molécula biologicamente ativa quanto como candidato a referência em determinados ensaios. Hu et al. (2012) propuseram miR-484 e miR-191 como controles endógenos para uma estratégia específica de perfil sérico em câncer de mama humano. Esse uso histórico, entretanto, não implica estabilidade em tecido mamário, nem permite assumir que miR-484 seja adequado como normalizador em tumores felinos.

A função oncogênica do miR-484 ganhou evidência humana recente. Tahtsakal et al. (2025) analisaram tecidos mamários de 42 pacientes e encontraram maior expressão de miR-484 em tumores malignos do que em benignos e em tecido tumoral quando comparado ao tecido adjacente. O aumento também acompanhou indicadores de maior agressividade e foi relacionado a alterações em proteínas da via de apoptose, incluindo BCL2, caspase 3 e caspase 9. Os autores propuseram atuação de miR-484 como oncomiR naquele contexto.

Para o carcinoma mamário felino, não há evidência equivalente que permita reproduzir automaticamente essa classificação funcional. A inclusão de miR-484 nesta dissertação deve, portanto, ser entendida como investigação exploratória de um candidato com relevância em oncologia humana, cujo comportamento na espécie felina precisa ser validado.

3.12.6 miR-10b

Entre os microRNAs avaliados nesta dissertação, miR-10b possui uma das bases mais diretamente relacionadas à metástase mamária. O estudo clássico de Ma, Teruya-Feldstein e Weinberg (2007) demonstrou que miR-10b podia promover invasão e metástase em modelos de câncer de mama, inaugurando extensa literatura sobre seu papel no processo metastático.

A evidência felina é especialmente importante. Savan et al. (2022) avaliaram localização e expressão de miR-10b em carcinoma mamário felino e metástases, observando semelhanças com o padrão descrito em câncer de mama humano. O trabalho também explorou a entrega de uma estratégia anti-miR-10b em uma gata com doença metastática, demonstrando modulação de miR-10b e de seu alvo HOXD10 após o tratamento experimental.

A literatura translacional continua avançando. Halim et al. (2025) revisaram o potencial de miR-10b como marcador clínico e alvo terapêutico específico do câncer de mama metastático, destacando sua relação com etapas de invasão e manutenção de células metastáticas. Para a presente dissertação, esses dados reforçam o interesse de miR-10b, mas também indicam que sua informação biológica pode ser mais evidente em frentes invasivas e metástases do que em uma comparação simples entre tecido mamário primário e controle.

3.12.7 miR-21

O miR-21 é um dos oncomiRs mais estudados em tumores sólidos e atua sobre genes relacionados à apoptose, sobrevivência e invasão. Em câncer de mama humano, sua superexpressão tem sido relacionada à repressão de genes como PTEN e PDCD4, favorecendo proliferação, invasão e resistência terapêutica (Syed et al., 2024).

Uma revisão sistemática com meta-análise publicada em 2025 reuniu 18 estudos observacionais e encontrou associação entre alta expressão de miR-21 e piores desfechos de sobrevida global e recorrência em câncer de mama humano. A magnitude da associação variou entre subtipos, sendo mais pronunciada em tumores triplo-negativos e não significativa em determinados grupos HER2-positivos. Esse resultado reforça a utilidade prognóstica potencial e, ao mesmo tempo, a dependência do contexto molecular (Conte et al., 2025).

Na medicina veterinária, miR-21 também foi investigado em tumores mamários caninos. Ramadan et al. (2022) integraram expressão de miR-21, marcadores séricos e imunohistoquímica, enquanto estudos anteriores já haviam apontado perfis alterados em neoplasias mamárias caninas. Para felinos, entretanto, ainda faltam estudos de validação

comparáveis. Consequentemente, qualquer diferença observada nesta dissertação deve ser descrita como comportamento do Cq na amostra estudada, sem afirmar valor prognóstico ou oncogênico específico para a espécie.

3.13 RT-qPCR, qualidade analítica, normalização e interpretação de Cq

A reação em cadeia da polimerase quantitativa após transcrição reversa é amplamente utilizada para mensuração de microRNAs por sua sensibilidade e capacidade de quantificar alvos em pequenas quantidades de material. A fluorescência gerada ao longo dos ciclos permite estimar o ciclo de quantificação, denominado Cq. Em condições analíticas comparáveis, uma amostra que cruza o limiar em menor número de ciclos contém maior quantidade inicial do alvo do que uma amostra com Cq mais alto. Portanto, Cq numericamente maior não deve ser descrito como “maior expressão” (Bustin et al., 2009, 2025).

A atualização MIQE 2.0, publicada em 2025, reforçou a necessidade de descrição transparente de desenho experimental, preparação das amostras, transcrição reversa, eficiência dos ensaios, controles, limites analíticos, tratamento de dados e estratégia de normalização. As recomendações também enfatizam que Cq não deve ser tratado como medida absoluta e universalmente comparável sem consideração da eficiência e do procedimento quantitativo utilizado (Bustin et al., 2025).

A expressão relativa costuma ser estimada por métodos baseados em diferenças de Cq, como ΔCq e $\Delta\Delta Cq$, ou por modelos que incorporam eficiência de amplificação. O método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ exige pressupostos específicos e uma referência estável; o modelo de Pfaffl incorpora a eficiência dos ensaios. Em ambos os casos, a qualidade da conclusão depende da adequação do normalizador e da comparabilidade das reações (Livak; Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001).

A escolha do alvo de referência é uma etapa crítica. Genes ou microRNAs utilizados como controles em um tecido, espécie ou condição podem variar em outro contexto. Estratégias como geNorm e NormFinder foram desenvolvidas para avaliar estabilidade de candidatos, e abordagens globais de normalização também foram propostas para painéis de microRNAs (Andersen; Jensen; Ørntoft, 2004; Mestdagh et al., 2009; Vandesompele et al., 2002).

Esse princípio é particularmente importante para miR-191 e miR-484. O fato de terem sido sugeridos como referências em soro humano em um estudo específico não os transforma em normalizadores validados para tecido mamário felino. Se esses próprios microRNAs

constituem alvos de interesse biológico e apresentam variação entre grupos, sua utilização como referência sem validação poderia distorcer a quantificação relativa (Bustin et al., 2025; Hu et al., 2012).

As réplicas técnicas são utilizadas para estimar a precisão da reação e não aumentam o número de unidades biológicas. Diferenças grandes entre réplicas podem resultar de pipetagem, baixa abundância, amplificação inespecífica ou outros eventos técnicos e devem ser avaliadas, quando possível, em conjunto com curvas de amplificação e dissociação. A exclusão de uma réplica precisa seguir critério definido e documentado, e não apenas melhorar a aparência da média (Bustin et al., 2025).

Em estudos exploratórios com poucos animais, a distinção entre replicação técnica e biológica é ainda mais importante. Três reações da mesma amostra não equivalem a três animais independentes. A unidade inferencial permanece a gata. Assim, médias de triplicatas podem resumir a medição de cada animal, mas testes ou conclusões biológicas devem refletir o número real de indivíduos em cada grupo.

3.14 Síntese do referencial e lacunas que sustentam o estudo

A literatura recente confirma que o carcinoma mamário felino é uma doença predominantemente maligna, histologicamente heterogênea e frequentemente agressiva. Estudos brasileiros de 2023 a 2025 reforçam a importância de produzir dados nacionais sobre epidemiologia, histopatologia e prognóstico, enquanto trabalhos internacionais de 2022 a 2026 têm refinado estadiamento, graduação, microambiente tumoral e biomarcadores moleculares (Cassali et al., 2025; Monteiro; Petrucci; Queiroga, 2025; Rodrigues-Jesus et al., 2026a, 2026b; Soares et al., 2023; Sousa et al., 2024; Souza et al., 2024).

No campo dos microRNAs, o avanço é real, porém desigual. Há evidência felina direta para comunicação por vesículas extracelulares e para miR-10b em doença metastática, mas a maior parte do conhecimento sobre let-7a, miR-29b, miR-191, miR-200b/200c, miR-484 e miR-21 ainda deriva de estudos humanos e caninos. Essa lacuna justifica investigar os candidatos em gatas, desde que os resultados sejam apresentados como exploratórios e não como validação clínica concluída (Howard et al., 2023; Savan et al., 2022).

A literatura também demonstra que material biológico, histotipo, grau, microambiente e método de quantificação podem modificar o padrão observado. Por essa razão, a contribuição desta dissertação não está em atribuir previamente função oncogênica ou supressora a cada Cq medido, mas em caracterizar a casuística, descrever o comportamento

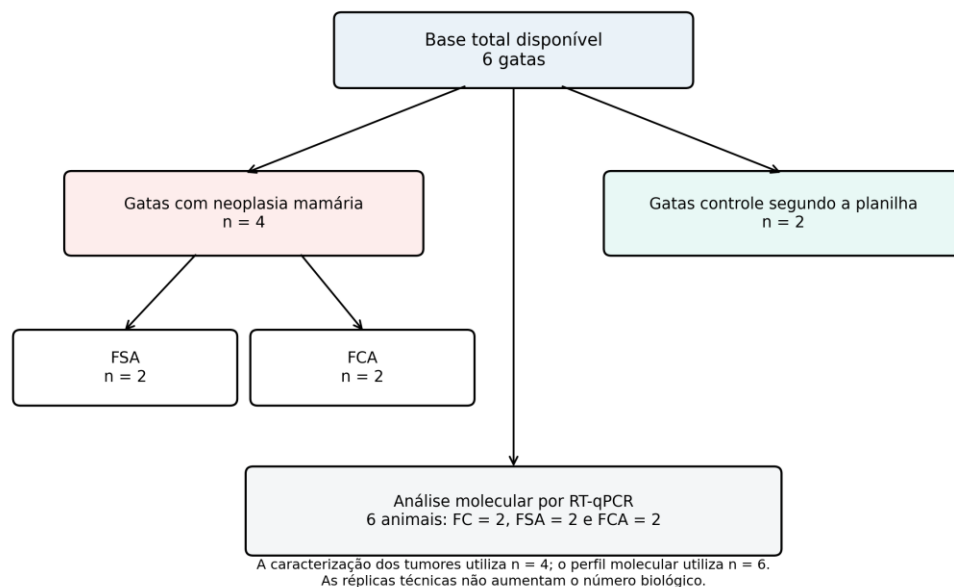
dos alvos no conjunto disponível e identificar hipóteses que possam ser testadas em coortes maiores, com normalização validada e controle analítico conforme as recomendações atuais de RT-qPCR (Bustin et al., 2025).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Na figura 1 é mostrado o estudo observacional, descritivo e exploratório, estruturado por denominadores analíticos. A amostra foi composta por seis gatas. A caracterização clínico-patológica geral incluiu os seis registros, enquanto a descrição das variáveis tumorais e histopatológicas foi restrita às quatro gatas com neoplasia mamária. A análise molecular por RT-qPCR incluiu os seis animais: FC (n=2), FSA (n=2) e FCA (n=2).

Figura 1 – Fluxo amostral e definição dos denominadores analíticos.



Fonte: Elaboração própria.

4.2 Local e período

As amostras foram obtidas no Hospital Veterinário Professor Mário Dias Teixeira, da Universidade Federal Rural da Amazônia (HOVET/ISPA/UFRA), e processadas no Laboratório de Biologia Molecular do ISPA/UFRA, no período de 2024 a 2025.

4.3 Aspectos éticos

As amostras foram oriundas da rotina clínico-cirúrgica do HOVET/ISPA/UFRA. Com número do protocolo de aprovação 6188300824 pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.

4.4 Base clínico-patológica e grupos

A amostra clínico-patológica foi composta por seis gatas. Quatro apresentavam neoplasia mamária e foram classificadas conforme o histórico de anticoncepcional hormonal: FSA, sem uso informado, com dois animais; e FCA, com uso informado, com dois animais. As duas gatas restantes foram classificadas como FC no banco de dados, por serem sadias não houve laudo histológico de tecido mamário,

Foram extraídas as variáveis disponíveis: identificação, idade, classificação do grupo, localização mamária, dimensões da lesão, ulceração, procedimento cirúrgico, estado de castração e diagnóstico histopatológico. A maior dimensão de cada lesão foi obtida a partir das medidas registradas em centímetros. Para a descrição dos tumores, foram considerados apenas FSA e FCA.

Os dados clínicos foram preservados conforme os registros da pesquisa, sem imputação de campos ausentes. A grafia “carcinoma cribriforme” foi padronizada para “carcinoma cribriforme”, sem alteração do diagnóstico histopatológico registrado.

Quadro 1 – Caracterização individual da base clínico-patológica

ID	Idade (anos)	Localização	Tamanho	Ulceração	Cirurgia	Histopatologia
FSA1	12	M3 esquerda	3,0 × 3,0 cm	Sim	OSH + nodulectomia	Carcinoma sólido
FSA2	15	M4 esquerda	3,5 × 3,0 cm	Sim	Nodulectomia	Carcinoma sólido grau II/III
FCA1	8	M3 e M4 direitas	2,2 × 2,0 cm	Não	Mastectomia bilateral + OSH	Carcinoma cribriforme
FCA2	8	M1 direita	7,0 × 6,5 cm	Não	Mastectomia bilateral + OSH	Carcinoma túbulo- papilífero grau II

Fonte: Elaboração própria.

4.5 Obtenção e conservação dos tecidos

Fragmentos de tecido mamário foram obtidos no período transoperatório e acondicionados em criotubos autoclavados contendo RNAlater®. Os fragmentos tinham aproximadamente 0,5 × 0,5 × 0,5 cm e armazenadas em criotubos autoclavados, contendo 250 µl de RNAlater. (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e refrigeradas a 8 graus.

4.6 Extração e avaliação do RNA

A extração de RNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do ISPA/UFRA com TRIzol LS® (Invitrogen). A concentração foi avaliada por espectrofotometria em 260 nm, e a pureza por razões A260/280 e A260/230.

Os valores individuais de concentração, pureza e integridade do RNA não foram disponibilizados. Assim, não foi possível relacionar a qualidade do material à variabilidade dos Cq nem verificar a equivalência da entrada de RNA entre as amostras.

4.7 RT-qPCR

Os registros de RT-qPCR continham triplicatas técnicas para oito microRNAs: let-7a, miR-29b, miR-191, miR-200b, miR-200c, miR-484, miR-10b e miR-21. O protocolo experimental registrou o uso de Power SYBR® Green Master Mix e do termociclador CFX96 Touch™ Real-Time Detection System (Bio-Rad), com primers desenhados no software miRprimer (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequências de nucleotídeos dos microRNAs.

microRNA	Sequência de nucleotídeos (5' – 3')		
	miRNAs	Primers	
		Forward	Reverse
let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	GCAGTGAGGTAGTAGGTTG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTAACTATAC
miR-10b	CCCUGUAGAACCGAAUUUGUGU	CAGCCCTGTAGAACCGA	GGTCCAGTTTTTTTTTTTACAC
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	GCAGTAGCTTATCAGACTGATG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTCAAC
miR-29b	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	CAGTAGCACCATTGAAATCAG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTAAACAC
miR-191	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCU	CAACGGAATCCCAAAGCA	GGTCCAGTTTTTTTTTTTAGC
miR-200b	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA	GCATCTTACTGGGCAGCA	GGTCCAGTTTTTTTTTTTCCAA
miR-200c	UAAUACUGCCGGGUAUGAUGGA	AGTAATACTGCCGGTAATGA	GGTCCAGTTTTTTTTTTTCCA
miR-484	GGGUGACCCUGGCUUUUUGGCG	GGGTGACCCTGGCT	CAGTTTTTTTTTTTTCGCCAA

Fonte: Elaboração própria

Não estavam disponíveis as curvas de amplificação e dissociação, as eficiências dos ensaios, os controles sem molde e os controles de transcrição reversa. Em razão dessas ausências, a análise molecular foi restrita à descrição dos valores de Cq.

4.8 Consolidação das réplicas e controle de qualidade

Cada animal foi tratado como unidade biológica. As três medidas do mesmo animal foram consideradas réplicas técnicas. Valores iguais a zero foram classificados como ausência de Cq válido, pois não representam ciclo de quantificação interpretável. A média por animal foi calculada com os Cq positivos e inferiores ou iguais a 40.

Para cada triplicata, foram calculados o número de réplicas válidas, a média, o desvio-padrão e a amplitude. Para fins exclusivamente descritivos, o desvio-padrão foi organizado em três faixas: baixa variabilidade entre réplicas ($<0,5$ Cq), variabilidade intermediária ($0,5$ a $1,0$ Cq) e elevada variabilidade ($>1,0$ Cq). Essas faixas não constituíram critérios automáticos de exclusão, e nenhum Cq positivo foi removido apenas por discrepância entre réplicas.

Foram observadas duas inconsistências de identificação no banco molecular. O rótulo “ESA2” foi harmonizado como FSA2 pela correspondência com os demais alvos. No bloco de miR-484, FC1 aparecia duas vezes e FC2 não estava explicitado; o segundo registro foi mantido como segundo controle apenas para a síntese grupal, sem atribuição individual definitiva.

4.9 Estratégia de análise

As variáveis clínicas foram resumidas por frequências absolutas e relativas e, para medidas numéricas, média, desvio-padrão, mediana e amplitude. A apresentação priorizou valores individuais porque a amostra era pequena e heterogênea.

Para a parte molecular, as médias de grupo foram calculadas a partir das médias de Cq de cada animal. As réplicas técnicas não foram somadas como se fossem novos indivíduos. Não foram aplicados testes de hipótese, pois o pequeno número de animais por grupo produziria estimativas instáveis e falsa impressão de precisão.

Não foi calculado ΔCq , $\Delta\Delta Cq$ ou fold change. Os arquivos não identificavam um normalizador endógeno previamente validado em tecido mamário felino e não forneciam eficiência de amplificação. Desse modo, os resultados são denominados “perfil de Cq” ou “quantidade aparente do alvo”, evitando a expressão “superexpressão” ou “subexpressão” sem suporte analítico.

5 RESULTADOS

5.1 Composição das bases

A amostra reuniu seis gatas. Quatro apresentavam neoplasia mamária, distribuídas em FSA (n=2) e FCA (n=2), e duas foram classificadas como FC. A descrição de idade incluiu os seis animais; tamanho, ulceração, cirurgia e histopatologia foram analisados nos quatro casos tumorais. A análise molecular incluiu os seis animais com resultados de RT-qPCR.

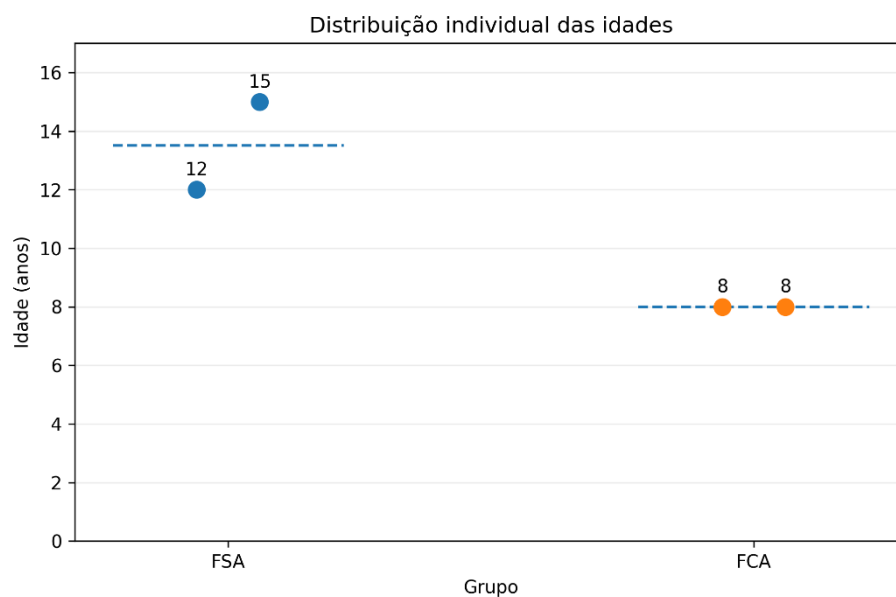
A unidade amostral da análise molecular foi o animal. Embora a planilha registrasse até três Cq por alvo, essas medidas correspondiam a repetições da mesma amostra e foram consolidadas antes das médias grupais.

5.2 Idade

A idade esteve disponível para todas as seis gatas. Entre os quatro animais com neoplasia mamária, a média foi de 10,75 anos, a mediana de 10 anos e a amplitude de 8 a 15 anos. No FSA, as idades foram 12 e 15 anos, com média e mediana de 13,5 anos. No FCA, ambas as gatas tinham 8 anos. Os controles tinham 7 e 3 anos, com média de 5 anos.

A distribuição individual demonstrou sobreposição ou diferença entre grupos conforme os registros, mas não foi submetida a teste inferencial. A idade foi mantida como possível fator de confundimento nas comparações moleculares. (Figura 2).

Figura 2 – Distribuição individual das idades das gatas com neoplasia mamária



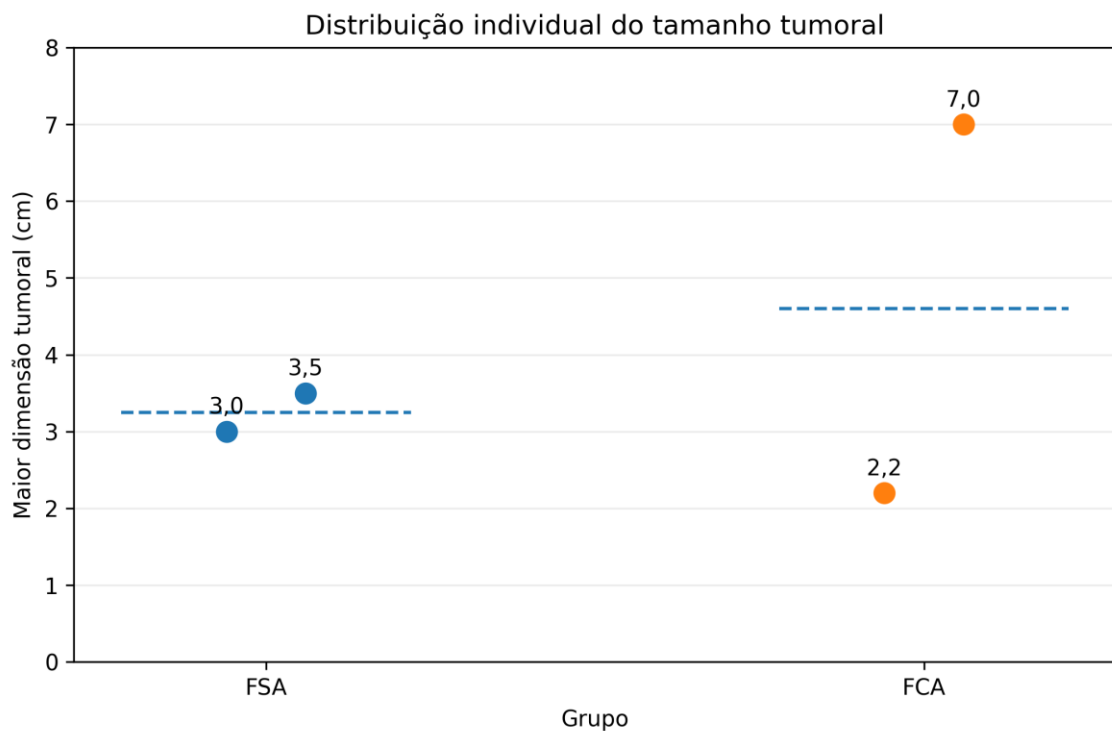
Fonte: Elaboração própria.

5.3 Localização e tamanho tumoral

A localização tumoral foi informada em 4 casos. Foram identificadas 2 menções à cadeia esquerda, 2 à cadeia direita e 0 descrições bilaterais ou envolvendo ambos os lados. Lesões em mais de uma glândula foram preservadas conforme a redação original da planilha.

A maior dimensão esteve disponível para 4 tumores. A média foi de 3,92 cm, a mediana de 3,25 cm e a amplitude de 2,20 a 7,00 cm. No FSA, a mediana foi de 3,25 cm; no FCA, de 4,60 cm. (Figura 3).

Figura 3 – Distribuição individual da maior dimensão tumoral por grupo



Fonte: Elaboração própria.

5.4 Ulceração, cirurgia e histopatologia

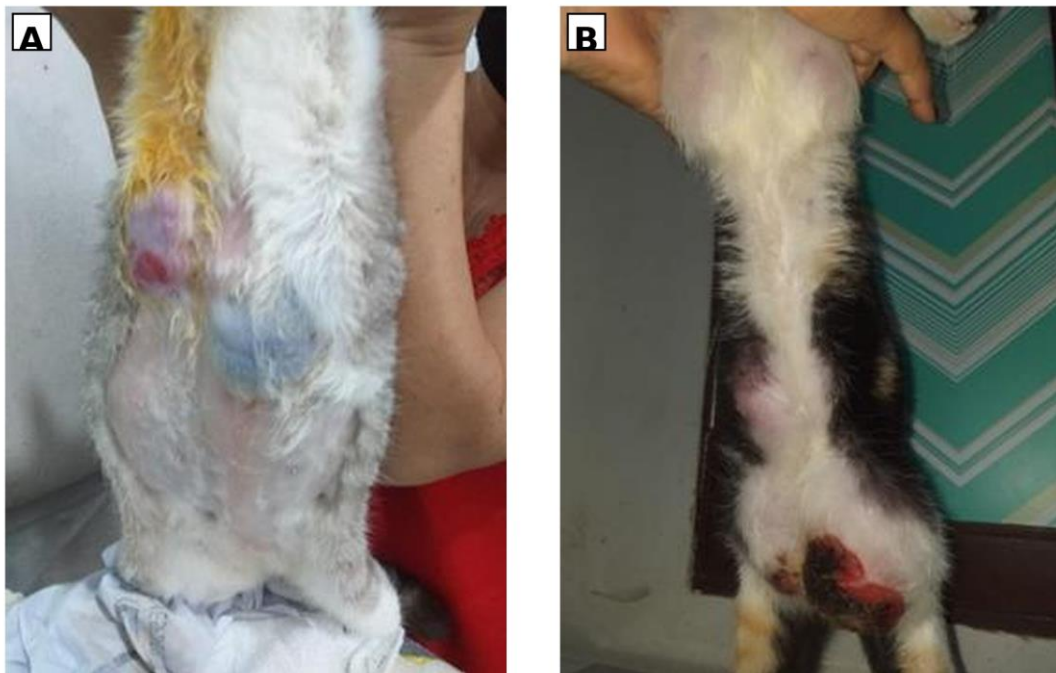
A ulceração foi registrada em duas das quatro gatas com neoplasia mamária (50,0%). Os dois casos ocorreram no FSA; nenhuma das gatas FCA apresentava ulceração. A distribuição foi descrita sem atribuir causalidade ao histórico de anticoncepcional, porque idade, tamanho, histotipo e tempo de evolução não estavam equilibrados entre os grupos.

Os procedimentos cirúrgicos foram heterogêneos: mastectomia bilateral associada à OSH em duas gatas, OSH associada à nodulectomia em uma e nodulectomia em uma. A

variação acompanhou diferenças de localização e extensão das lesões, mas a planilha não continha margens cirúrgicas, linfonodos removidos ou acompanhamento de recorrência.

A histopatologia demonstrou quatro descrições distintas: carcinoma sólido, carcinoma sólido grau II/III, carcinoma cribriforme e carcinoma túbulo-papilífero grau II. A heterogeneidade de histotipo e grau deve ser considerada na interpretação dos microRNAs, porque diferenças moleculares podem refletir a composição tumoral e não apenas o histórico hormonal. (figuras 4 e 5).

Figura 4 – Aspectos clínicos das alterações mamárias observadas. A) Neoplasia mamária; B) hiperplasia e neoplasia mamárias



Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 5 – Procedimento cirúrgico de mastectomia em gata

Fonte: A autoria própria (2024).

5.5 Composição da base molecular

Tabela 3 – Composição da base molecular de RT-qPCR

Grupo	n biológico	Identificações
FC	2	FC1, FC2
FSA	2	FSA1, FSA2
FCA	2	FCA1, FCA2

Fonte: Elaboração própria.

A base molecular incluiu os seis animais representados na planilha de RT-qPCR. O denominador, entretanto, variou conforme o desfecho: características tumorais e histopatológicas foram descritas apenas nas quatro gatas FSA/FCA, enquanto o perfil de Cq foi apresentado para FC, FSA e FCA. Essa distinção evita atribuir características tumorais aos controles e impede que as triplicatas técnicas sejam contadas como observações biológicas independentes. (Tabela 3).

5.6 Variabilidade entre réplicas técnicas

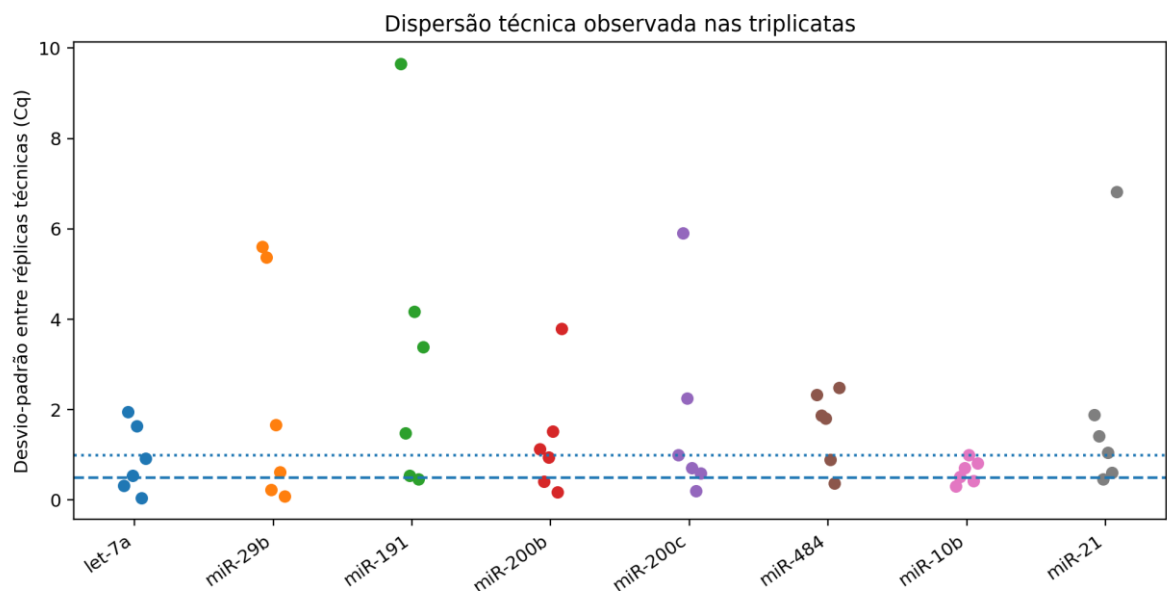
Foram avaliadas 48 combinações entre animal e microRNA. Do total, 12 apresentaram baixa variabilidade entre réplicas (DP <0,5 Cq), 14 apresentaram variabilidade intermediária (DP de 0,5 a 1,0 Cq) e 22 apresentaram elevada variabilidade (DP >1,0 Cq). Todas as

combinações mantiveram pelo menos duas leituras positivas. Oito registros iguais a zero foram considerados ausentes nos cálculos.

A variabilidade técnica não foi uniforme entre os alvos. Algumas réplicas apresentaram valores próximos, enquanto outras exibiram diferenças de vários ciclos. As combinações com maior desvio-padrão foram mantidas na apresentação dos dados, mas receberam menor peso interpretativo nas comparações entre os grupos. (Figura 6 e tabela 4).

Figura 6 – Variabilidade entre réplicas técnicas dos microRNAs

. As linhas tracejadas em 0,5 e 1,0 Cq delimitam as faixas descritivas adotadas nesta análise; não representam limites universais de aceitação ou exclusão.



Fonte: Elaboração própria

Tabela 4 – Combinações com elevada variabilidade entre réplicas técnicas. São apresentadas as 15 combinações com os maiores desvios-padrão técnicos, todas superiores a 1,0 Cq.

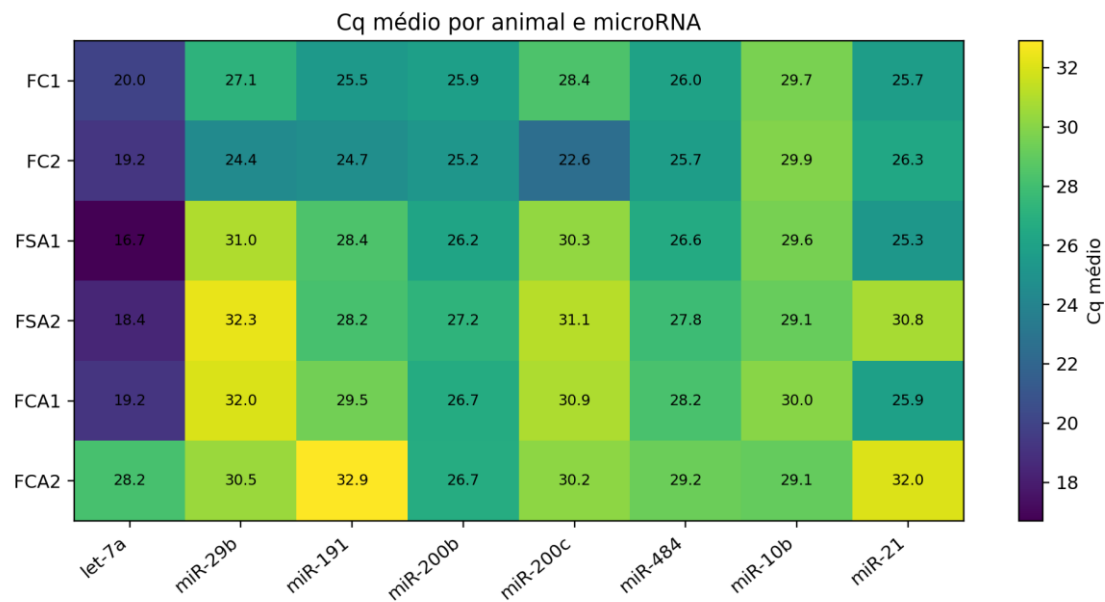
microRNA	Amostra	Réplicas válidas	Cq médio	DP	Amplitude
miR-191	FC1	2	25,50	9,65	13,65
miR-21	FCA2	3	32,03	6,82	12,32
miR-200c	FC2	3	22,58	5,91	10,49
miR-29b	FC1	3	27,15	5,61	9,89
miR-29b	FC2	3	24,42	5,38	10,45
miR-191	FSA2	3	28,21	4,17	8,02
miR-200b	FCA2	3	26,72	3,79	6,93
miR-191	FCA2	2	32,91	3,39	4,79
miR-484	FCA2	3	29,24	2,49	4,61
miR-484	FC1	3	26,02	2,33	4,66
miR-200c	FSA1	3	30,30	2,25	4,02
let-7a	FC2	3	19,24	1,95	3,79
miR-21	FC1	3	25,74	1,88	3,55
miR-484	FC2	3	25,72	1,87	3,44
miR-484	FSA1	3	26,59	1,81	3,16

Fonte: Elaboração própria.

5.7 Perfil global de Cq

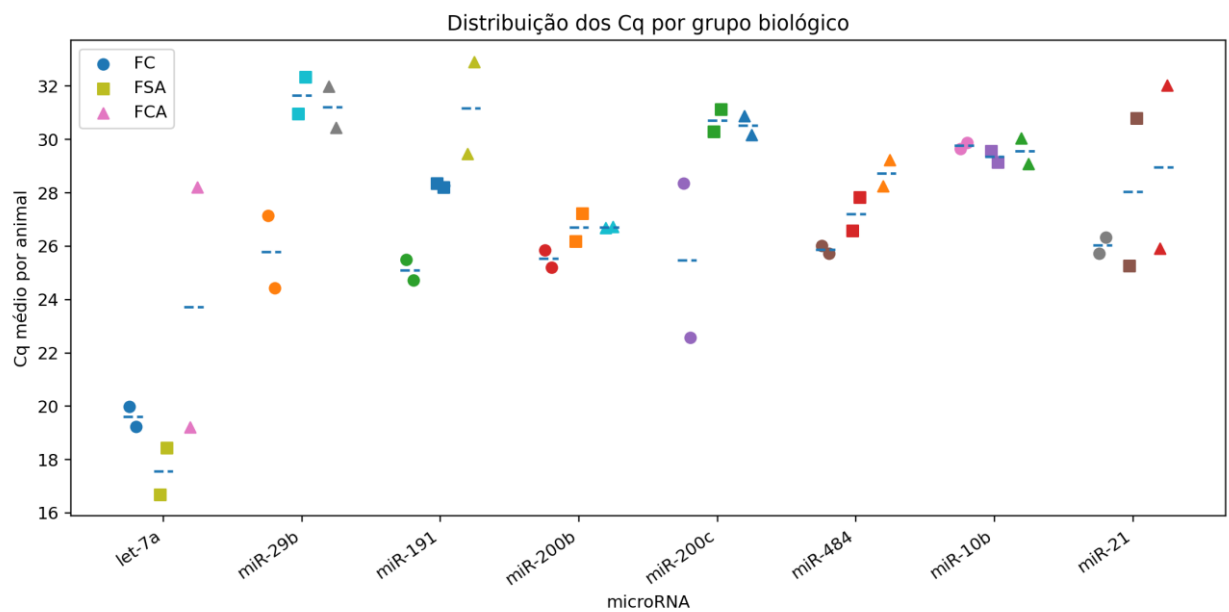
Os Cq médios por animal variaram entre microRNAs e grupos. Como o valor é inversamente relacionado à quantidade inicial do alvo, regiões de Cq mais baixo no mapa correspondem a maior quantidade aparente sob condições comparáveis. O gráfico não representa expressão relativa normalizada. (Figuras 7 e 8).

Figura 7 – Mapa de Cq médio por animal e microRNA



Fonte: elaboração própria.

Figura 8 – Distribuição dos Cq por grupo biológico.



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 5 – Cq médio por grupo, calculado a partir das médias individuais. O desvio-padrão refere-se à variação entre animais, não às réplicas técnicas.

microRNA	FC	FSA	FCA
let-7a	19,61 ± 0,53 (n=2)	17,57 ± 1,24 (n=2)	23,71 ± 6,36 (n=2)
miR-29b	25,79 ± 1,93 (n=2)	31,65 ± 0,97 (n=2)	31,22 ± 1,09 (n=2)
miR-191	25,11 ± 0,55 (n=2)	28,28 ± 0,10 (n=2)	31,18 ± 2,44 (n=2)
miR-200b	25,53 ± 0,45 (n=2)	26,71 ± 0,74 (n=2)	26,70 ± 0,03 (n=2)
miR-200c	25,47 ± 4,09 (n=2)	30,72 ± 0,59 (n=2)	30,54 ± 0,50 (n=2)
miR-484	25,87 ± 0,21 (n=2)	27,21 ± 0,88 (n=2)	28,74 ± 0,70 (n=2)
miR-10b	29,77 ± 0,16 (n=2)	29,35 ± 0,30 (n=2)	29,57 ± 0,67 (n=2)
miR-21	26,03 ± 0,42 (n=2)	28,04 ± 3,91 (n=2)	28,97 ± 4,33 (n=2)

Fonte: Elaboração própria.

5.8 Resultados por microRNA

5.8.1 let-7a

As médias descritivas de Cq foram FC: 19,61, FSA: 17,57 e FCA: 23,71. O let-7a apresentou o perfil mais diretamente relacionado à família supressora let-7, mas a direção observada variou entre os animais. A heterogeneidade individual foi mais informativa que a média isolada. (Tabela 8).

5.8.2 miR-29b

As médias descritivas de Cq foram FC: 25,79, FSA: 31,65 e FCA: 31,22. O miR-29b apresentou diferenças entre controles e grupos tumorais; entretanto, a elevada variabilidade observada nas réplicas dos dois controles reduz a segurança da magnitude desse contraste e impede que ele seja interpretado isoladamente como diferença biológica. (Tabela 5).

5.8.3 miR-191

As médias descritivas de Cq foram FC: 25,11, FSA: 28,28 e FCA: 31,18. O miR-191 foi de interesse por sua relação descrita com sinalização hormonal em câncer de mama humano. O padrão observado não foi interpretado como resposta ao anticoncepcional, pois não houve normalização e os grupos diferiram clinicamente. (Tabela 5).

5.8.4 miR-200b

As médias descritivas de Cq foram FC: 25,53, FSA: 26,71 e FCA: 26,70. O miR-200b mostrou perfil relativamente próximo entre os grupos em comparação com outros alvos, sugerindo menor separação descritiva na amostra. (Tabela 5).

5.8.5 miR-200c

As médias descritivas de Cq foram FC: 25,47, FSA: 30,72 e FCA: 30,54. O miR-200c apresentou comportamento distinto do miR-200b, reforçando que membros da mesma família não devem ser agrupados sem análise individual. (Tabela 8).

5.8.6 miR-484

As médias descritivas de Cq foram FC: 25,87, FSA: 27,21 e FCA: 28,74. O miR-484 variou entre grupos e animais. Essa variabilidade desaconselha utilizá-lo retrospectivamente como normalizador sem estudo formal de estabilidade. (Tabela 5).

5.8.7 miR-10b

As médias descritivas de Cq foram FC: 29,77, FSA: 29,35 e FCA: 29,57. O miR-10b exibiu Cq semelhante entre os grupos. A ausência de diferença marcada em tumor primário não exclui papel em metástase, contexto no qual foi estudado em felinos. (Tabela 5).

5.8.8 miR-21

As médias descritivas de Cq foram FC: 26,03, FSA: 28,04 e FCA: 28,97. O miR-21 mostrou heterogeneidade individual e técnica. A média de dois animais por grupo pode ocultar perfis opostos e não deve ser equiparada aos achados séricos ou teciduais humanos. (Tabela 5).

6 DISCUSSÃO

6.1 Populações analíticas e unidade amostral

A organização dos dados exige distinguir o número total de animais do denominador aplicável a cada resultado. Os seis registros possuíam idade e identificação de grupo, mas somente quatro correspondiam a gatas com neoplasia mamária. Por isso, a descrição de tamanho, ulceração, cirurgia e histopatologia utiliza $n=4$, enquanto o perfil molecular utiliza $n=6$, com dois animais em FC, dois em FSA e dois em FCA. Não se trata de excluir casos da análise molecular: trata-se de reconhecer que os controles não possuem as mesmas variáveis tumorais dos casos.

A mesma cautela foi aplicada às triplicatas de RT-qPCR. Cada animal representa uma unidade biológica; as três leituras da mesma amostra avaliam repetibilidade técnica e não aumentam o tamanho amostral. Com dois indivíduos por grupo, qualquer média é muito influenciada por valores individuais. Assim, os resultados foram apresentados juntamente com a dispersão técnica e com as características clínicas de cada caso, sem testes de hipótese que produziriam falsa impressão de precisão.

6.2 Perfil clínico-patológico e fatores prognósticos

As quatro gatas com neoplasia mamária tinham entre 8 e 15 anos, com média de 10,75 anos. Esse perfil é compatível com a maior ocorrência de carcinomas mamários em gatas adultas e idosas. Entretanto, os grupos não eram equivalentes: FSA apresentou média de 13,5 anos, enquanto as duas gatas FCA tinham 8 anos. A idade, portanto, pode acompanhar diferenças de duração da doença, alterações do tecido mamário e exposição acumulada a outros fatores, devendo ser considerada como possível confundidor.

A maior dimensão tumoral variou de 2,20 a 7,00 cm. Duas lesões ultrapassaram 3 cm e o maior tumor, de 7 cm, ocorreu em FCA2. A literatura felina demonstra que a interpretação prognóstica não deve se apoiar em uma única variável. Em 107 gatas com adenocarcinoma mamário, Gemignani et al. (2018) observaram maior tempo mediano livre de progressão após mastectomia bilateral do que após mastectomia unilateral, além de identificarem ulceração, metástase linfonodal e tumores na quarta glândula mamária como fatores associados à progressão. Na presente casuística, houve tumores em M4, dois casos ulcerados e procedimentos cirúrgicos distintos, mas não estavam disponíveis estadiamento, avaliação linfonodal, margens ou seguimento clínico; por isso, não foi possível transformar essas características em estimativas de prognóstico.

A ulceração ocorreu em 50% dos casos e concentrou-se nas duas gatas FSA. Esse percentual é descritivo e não demonstra efeito protetor ou nocivo do anticoncepcional, pois FSA também reuniu os animais mais velhos. A distribuição dos histotipos amplia essa cautela: foram observados carcinoma sólido, carcinoma sólido grau II/III, carcinoma cribriforme e carcinoma túbulo-papilífero grau II. Estudos com marcadores teciduais mostram que a integração de variáveis é mais informativa do que classificações isoladas. Dagher et al. (2019), em ampla série de carcinomas mamários felinos invasivos, demonstraram que a expressão de Bcl-2 acrescentou informação prognóstica independente do estágio. Embora Bcl-2 não tenha sido avaliado aqui, o estudo ilustra por que futuras análises de microRNAs devem ser ligadas a grau, invasão, linfonodo, receptores e sobrevida.

6.3 Exposição a anticoncepcionais e fatores de confusão

O agrupamento FCA/FSA possui plausibilidade biológica e epidemiológica. Misdorp, Romijn e Hart (1992) relacionaram a administração regular de progestágenos ao aumento do risco de carcinoma mamário, enquanto Overley et al. (2005) demonstraram efeito protetor da esterilização precoce. Esses estudos sustentam a relevância de registrar exposição hormonal, mas não autorizam concluir que toda diferença encontrada entre dois pequenos grupos de tumores tenha sido causada pelo contraceptivo.

O delineamento atual selecionou animais depois do aparecimento da neoplasia; portanto, não estima incidência nem risco. Também não estavam disponíveis princípio ativo, dose, frequência, idade da primeira aplicação, duração do uso ou intervalo desde a última administração. Além disso, os grupos diferiam em idade, ulceração, tamanho e histotipo. Sem controle dessas variáveis e sem caracterização de receptores hormonais, o anticoncepcional deve ser interpretado como variável de estratificação e não como explicação causal para os Cq observados.

6.4 Interpretação dos Cq e qualidade analítica

A primeira exigência para interpretar os dados moleculares é reconhecer a relação inversa entre Cq e quantidade inicial do alvo: mantidas as demais condições, Cq menor indica detecção mais precoce e maior quantidade aparente. Entretanto, comparar Cq bruto entre grupos não equivale a demonstrar expressão diferencial. Variações na massa de RNA, pureza, transcrição reversa, eficiência dos primers e composição do fragmento podem deslocar os resultados. As diretrizes MIQE e MIQE 2.0 recomendam documentar eficiência,

especificidade, controles, limites analíticos e estratégia de normalização antes de calcular expressão relativa (Bustin et al., 2009, 2025).

Foram identificados oito valores iguais a zero, considerados ausentes nos cálculos, além de combinações com elevada variabilidade entre réplicas. Todas mantiveram pelo menos duas leituras positivas, mas diferenças de vários ciclos dentro da mesma amostra reduzem a precisão das médias. Entre as possíveis fontes estão variações de pipetagem, baixa concentração do alvo, inibição, amplificação inespecífica, formação de dímeros ou erro de identificação. Como as curvas brutas não estavam disponíveis, essas combinações foram mantidas, porém interpretadas com menor peso e sem exclusão arbitrária de réplicas.

A comparação com estudos recentes evidencia o nível de controle necessário. Ferreira et al. (2025) avaliaram miRNAs em tecido mamário canino, utilizaram um normalizador endógeno previamente selecionado e aplicaram critérios explícitos de aceitação das duplicatas. Howard et al. (2023), em gatas, analisaram tecido tumoral, margens e vesículas extracelulares plasmáticas e encontraram direções diferentes para os mesmos miRNAs conforme o material biológico. Esses exemplos mostram que matriz, normalização e controle técnico são partes da interpretação, e não detalhes acessórios.

6.5 Comparabilidade entre estudos de microRNAs mamários

Os resultados publicados em tumores mamários de cães, gatos e mulheres nem sempre apontam na mesma direção. A divergência pode decorrer de espécie, tecido fresco ou parafinado, soro, plasma ou vesículas extracelulares, histotipo, grau, presença de metástase, gene de referência, plataforma e critérios de exclusão. O quadro a seguir resume estudos primários úteis para contextualizar os oito alvos avaliados nesta dissertação.

Quadro 2 – Síntese de estudos primários utilizados na comparação dos achados moleculares.

Estudo	Espécie e material	Resultado principal	Relação com o presente estudo
Boggs et al. (2008)	Cães; tecido mamário maligno (n=6) e normal (n=10)	miR-29b e miR-21 aumentaram nos tumores; o perfil variou conforme o fenótipo histológico.	Mostra que histotipo e normalização podem produzir padrão distinto do observado no Cq bruto desta amostra felina.
Bulkowska et al. (2017)	Cães; tumores primários, metastáticos e não metastáticos	As maiores diferenças ocorreram segundo o estado metastático; miR-29b diminuiu em metástases em relação ao tumor primário, e miR-10b não diferiu entre os grupos.	Sustenta a necessidade de separar tumor primário de metástase e de registrar estágio.
Jain et al. (2021)	Cães; marcador circulante em 60 animais	miR-21 aumentou e miR-29b diminuiu em tumores mamários, com associação ao estágio clínico.	A direção de miR-29b é compatível com o contraste bruto; miR-21 diverge, possivelmente por matriz e qualidade técnica.

Estudo	Espécie e material	Resultado principal	Relação com o presente estudo
Abbate et al. (2022)	Cães; tecido FFPE, 22 tumores e 4 controles	miR-21 foi maior em tumores malignos do que em controles.	Reforça o contraste com o Cq bruto felino e a necessidade de repetir miR-21.
Ramadan et al. (2022)	Cães; soro, 10 casos e 7 controles	miR-21 apresentou aumento de 12,84 vezes nos animais com tumor.	Demonstra potencial circulante, mas não é diretamente comparável a tecido mamário felino.
Savan et al. (2022)	Gatas; tumor primário e metástase linfonodal	Em 55,5% dos tumores, miR-10b foi maior na metástase do que no tumor primário.	É a comparação felina mais próxima e indica que o contraste relevante pode ser primário versus metástase.
Howard et al. (2023)	Gatas; tecido, margens e vesículas extracelulares	miR-20a e miR-15b aumentaram no tumor versus margem, mas diminuíram em vesículas de casos versus controles.	Mostra que a direção depende do compartimento biológico analisado.
Ferreira et al. (2025)	Cães; tecido normal, benigno e maligno	let-7b diminuiu em lesões malignas; miR-29b diminuiu em tumores versus controle, mas variou entre benignos, malignos e histotipos.	Apoia a interpretação dependente de histotipo para membros de let-7 e miR-29.
Huniadi et al. (2026)	Cães; adenocarcinoma mamário e tecido saudável	let-7c, miR-10b e miR-191 diminuíram no adenocarcinoma; outros miRNAs mostraram aumento.	Fornece comparação recente para let-7, miR-10b e miR-191 e evidencia que miRNAs oncogênicos em humanos podem diminuir no tecido canino.

Fonte: Elaboração própria a partir dos estudos citados (2008–2026).

6.6 let-7a

O let-7a apresentou Cq médio de 19,61 em FC, 17,57 em FSA e 23,71 em FCA. A diferença entre FSA e FCA foi a maior entre os alvos avaliados, mas o valor de FCA foi fortemente influenciado por FCA2, cujo Cq médio foi 28,21. Em condições analíticas equivalentes, esse padrão seria compatível com menor quantidade aparente de let-7a em FCA, especialmente em FCA2; sem normalização, porém, não se pode afirmar regulação negativa.

A família let-7 é frequentemente relacionada à supressão tumoral, mas seus membros e contextos não são intercambiáveis. Ferreira et al. (2025) observaram redução de let-7b em carcinomas mamários caninos malignos, e Huniadi et al. (2026) identificaram redução de let-7c em adenocarcinoma canino. Em contraste, Boggs et al. (2008) encontraram aumento de let-7f em carcinomas tubulopapilíferos caninos. Essas diferenças reforçam que espécie, membro da família e histotipo importam. A hipótese de menor let-7a em FCA2 é biologicamente interessante porque esse animal possuía o maior tumor e carcinoma túbulo-papilífero grau II, mas um único caso não permite relacionar tamanho ou histotipo ao microRNA.

6.7 miR-29b

O miR-29b apresentou Cq médio de 25,79 em FC, 31,65 em FSA e 31,22 em FCA. O contraste bruto, de aproximadamente cinco a seis ciclos entre controles e tumores, seria

compatível com menor quantidade aparente do alvo nos grupos neoplásicos. Essa direção se aproxima dos achados circulantes de Jain et al. (2021), da redução tecidual descrita por Ferreira et al. (2025) e da redução em metástases em relação ao tumor primário observada por Bulkowska et al. (2017).

Entretanto, Boggs et al. (2008) encontraram aumento de miR-29b em tumores mamários caninos e, dentro do estudo de Ferreira et al. (2025), o comportamento também variou entre lesões benignas, malignas e histotipos. Além da diferença entre espécies e amostras, as triplicatas controle de miR-29b nesta pesquisa apresentaram ampla dispersão. Portanto, miR-29b é um alvo prioritário para repetição técnica, determinação de eficiência e análise normalizada antes de qualquer inferência biológica.

6.8 miR-191

O miR-191 apresentou aumento progressivo do Cq médio de FC (25,11) para FSA (28,28) e FCA (31,18), compatível, em leitura bruta, com menor quantidade aparente nos tumores e particularmente no FCA. Huniadi et al. (2026) também observaram redução de miR-191 em adenocarcinoma mamário canino em comparação ao tecido saudável, o que oferece um paralelo entre espécies.

Esse resultado difere do modelo humano de Nagpal et al. (2013), no qual miR-191 foi induzido por estrogênio e favoreceu proliferação, migração e sobrevivência celular. A comparação não é direta: anticoncepcionais felinos são frequentemente progestacionais, os receptores hormonais dos tumores não foram avaliados e o Cq de miR-191 apresentou elevada dispersão em algumas amostras. Assim, a diferença FCA/FSA não demonstra indução ou repressão hormonal; ela define uma hipótese para estudo com exposição detalhada e imunohistoquímica de receptores.

6.9 miR-200b e miR-200c

Os dois membros da família miR-200 apresentaram comportamentos distintos. miR-200b variou pouco entre FC (25,53), FSA (26,71) e FCA (26,70), enquanto miR-200c apresentou Cq médio aproximadamente cinco ciclos maior nos grupos tumorais do que em FC. A família miR-200 regula a plasticidade epitelial e a transição epitélio-mesenquimal por interação com ZEB1 e ZEB2 (Gregory et al., 2008), mas seus membros não precisam variar de forma paralela em todo tumor.

A composição do fragmento pode contribuir para a diferença: proporções distintas de células epiteliais, estroma, inflamação e necrose alteram o RNA medido. Além disso, uma

amostra controle de miR-200c apresentou grande dispersão entre réplicas. A estabilidade aparente de miR-200b não significa ausência de função, e o contraste de miR-200c não pode ser classificado como redução de expressão sem normalização. Os resultados justificam avaliar os dois alvos separadamente em uma coorte maior.

6.10 miR-484

O miR-484 apresentou Cq médio de 25,87 em FC, 27,21 em FSA e 28,74 em FCA, formando um gradiente de aumento do Cq. Hu et al. (2012) utilizaram miR-484, em conjunto com miR-191, como candidato a controle endógeno em soro humano. Esse uso não pode ser transferido automaticamente para tecido mamário felino: a própria variação observada aqui e a ausência de validação de estabilidade impedem adotá-lo como normalizador.

Além de sua utilização metodológica em alguns estudos, miR-484 pode exercer funções biológicas dependentes do contexto. Ye et al. (2015) demonstraram que o eixo miR-484/CDA modulou proliferação e resistência à gemcitabina em células de câncer de mama. Essa dualidade reforça que um alvo não deve ser classificado como estável, oncogênico ou supressor apenas por resultados obtidos em outro material ou espécie. A duplicação do rótulo FC1 no bloco de miR-484 introduz incerteza na identificação individual do segundo controle; por esse motivo, o registro foi utilizado apenas na síntese grupal e interpretado com cautela.

6.11 miR-10b

O miR-10b apresentou os Cq médios mais semelhantes entre os grupos: 29,77 em FC, 29,35 em FSA e 29,57 em FCA. Esse achado não exclui sua participação em invasão ou metástase. Savan et al. (2022), em carcinoma mamário felino, compararam tumores primários e metástases linfonodais e observaram maior miR-10b na metástase em 55,5% dos casos, além de relação inversa com HOXD10. O contraste relevante naquele estudo era espacial e evolutivo, não simplesmente tumor primário versus controle.

Resultados caninos também não são uniformes. Bulkowska et al. (2017) não identificaram diferença significativa de miR-10b entre seus grupos, enquanto Huniadi et al. (2026) observaram redução no adenocarcinoma em relação ao tecido saudável. A presente pesquisa analisou apenas fragmentos primários e não possuía pares de linfonodo ou metástase. Uma etapa futura deve comparar o interior do tumor, a frente invasiva, o linfonodo e a metástase, preferencialmente no mesmo animal.

6.12 miR-21

O miR-21 apresentou Cq médio de 26,03 em FC, 28,04 em FSA e 28,97 em FCA. Em leitura bruta, os tumores teriam menor quantidade aparente do alvo, direção oposta à encontrada em diferentes estudos caninos. Boggs et al. (2008) observaram aumento em tecido mamário maligno; Jain et al. (2021) encontraram aumento circulante associado ao estágio; Abbate et al. (2022) demonstraram maior miR-21 em tumores malignos FFPE; e Ramadan et al. (2022) registraram aumento de 12,84 vezes no soro de cães com tumor.

A divergência não deve ser resolvida escolhendo a literatura ou o presente conjunto de dados como referência absoluta. O material pertence a outra espécie, os estudos utilizaram tecidos e fluidos diferentes e a amostra atual possui apenas dois animais por grupo. Além disso, FCA2 incluiu uma réplica tardia de 39,87, que ampliou substancialmente o desvio-padrão. Dessa forma, o perfil de miR-21 não sustenta inferência sobre aumento ou redução de expressão e deve ser entendido como resultado exploratório particularmente sensível à variabilidade técnica.

6.13 Integração dos achados e potencial como biomarcadores

O conjunto dos oito alvos não forma uma assinatura validada, mas revela padrões úteis para planejar a etapa seguinte. let-7a, miR-29b, miR-191 e miR-200c apresentaram contrastes brutos relevantes entre grupos; miR-21 mostrou forte divergência em relação à literatura canina; miR-10b permaneceu semelhante em tecido primário, embora estudos felinos indiquem importância na metástase. A interpretação conjunta é mais informativa do que declarar cada molécula isoladamente aumentada ou reduzida.

Um biomarcador diagnóstico ou prognóstico exige diferença reprodutível, normalização validada, coorte independente e avaliação de desempenho, como sensibilidade, especificidade, curva ROC e associação com desfechos. Howard et al. (2023) demonstraram a viabilidade de detectar miRNAs em vesículas plasmáticas de gatas com adenocarcinoma, enquanto Savan et al. (2022) relacionaram miR-10b a metástases felinas. Esses estudos confirmam o potencial da oncologia comparada, mas também mostram que o valor translacional depende de desenho clínico e qualidade analítica equivalentes aos exigidos em pesquisa humana.

6.14 Limitações

As limitações clínicas incluem dois animais por grupo, diferença etária entre FC, FSA e FCA, heterogeneidade de tamanho e histotipo, exposição anticoncepcional incompletamente caracterizada e ausência de estadiamento, linfonodos, margens, imunohistoquímica, recorrência e sobrevida. Esses fatores impedem separar o possível efeito hormonal do efeito da própria composição tumoral.

As limitações moleculares incluem valores de Cq iguais a zero, elevada variabilidade em parte das triplicatas, inconsistências de identificação, ausência de curvas brutas, eficiências, limites analíticos, dados completos de qualidade do RNA, normalizador validado e sequências documentadas para três conjuntos de primers. Por essas razões, a dissertação descreve o perfil de Cq e não calcula expressão relativa ou significância inferencial.

6.15 Pontos fortes e contribuição do estudo

O estudo reúne informações clínicas, histopatológicas e moleculares de uma neoplasia ainda pouco investigada na espécie felina. A organização integrada dos dados preservou o animal como unidade biológica, distinguiu os denominadores clínico e molecular e tornou explícita a variabilidade das réplicas técnicas. Essa abordagem evita apresentar Cq bruto como expressão relativa e aumenta a transparência da interpretação.

A discussão comparativa com estudos felinos e caninos permitiu identificar convergências, divergências e fatores metodológicos capazes de modificar os resultados, como espécie, matriz biológica, histotipo, estágio e estratégia de normalização. A principal contribuição consiste em delimitar quais padrões são sustentados pelos dados e quais permanecem como hipóteses para investigação confirmatória.

7 CONCLUSÃO

A amostra reuniu seis gatas: quatro com neoplasia mamária e duas classificadas como controles. As quatro gatas com tumor apresentaram média de idade de 10,75 anos, lesões de 2,20 a 7,00 cm, ulceração em dois casos e quatro descrições histopatológicas diferentes. FSA reuniu animais mais velhos e os dois casos ulcerados; FCA incluiu o maior tumor. Essa heterogeneidade impede atribuir diferenças clínicas ao anticoncepcional de forma isolada.

A análise molecular incluiu os seis animais e demonstrou perfis distintos de Cq para let-7a, miR-29b, miR-191, miR-200b, miR-200c, miR-484, miR-10b e miR-21. let-7a, miR-29b, miR-191 e miR-200c apresentaram os contrastes brutos mais marcantes entre grupos; miR-10b mostrou médias semelhantes em tecido primário; e miR-21 apresentou direção diferente da relatada em diversos estudos caninos. A variabilidade observada em parte das réplicas limita, contudo, a precisão desses contrastes.

Os resultados não demonstram expressão diferencial nem efeito causal do anticoncepcional. Sem normalizador endógeno validado, eficiências dos ensaios e dados brutos das curvas, o Cq não deve ser convertido em $\Delta\Delta Cq$ ou fold change. As comparações com outros estudos mostram que espécie, material biológico, histotipo, estágio e normalização podem modificar a direção e a magnitude dos achados.

Conclui-se que a pesquisa fornece uma caracterização clínico-patológica da amostra e um perfil molecular exploratório capaz de orientar estudos subsequentes. A validação dos achados requer maior número de animais, grupos clinicamente mais comparáveis, documentação detalhada da exposição hormonal, integração com estadiamento e seguimento e quantificação molecular normalizada. Nessas condições, os microRNAs avaliados poderão ser investigados quanto ao seu desempenho diagnóstico e prognóstico no carcinoma mamário felino.

8 DIRETRIZES PARA PESQUISAS FUTURAS

A continuidade desta linha de investigação requer uma coorte maior e grupos equilibrados quanto à idade, ao tamanho tumoral, ao histotipo e ao grau. O histórico de anticoncepcional deve ser documentado por princípio ativo, dose, frequência, duração, idade de início e intervalo entre a última administração e o diagnóstico, permitindo avaliar a exposição de forma mais precisa.

Na etapa molecular, a quantificação relativa deve ser precedida pela validação de alvos de referência estáveis em tecido mamário felino, pela determinação da eficiência de cada ensaio e pela documentação de controles negativos, limites analíticos e curvas de amplificação e dissociação. Réplicas com elevada variabilidade devem ser analisadas no contexto das curvas brutas e dos critérios laboratoriais previamente definidos.

A interpretação biológica poderá ser fortalecida pela integração dos microRNAs com grau histológico, invasão linfovascular, comprometimento linfonodal, metástases, margens cirúrgicas, receptores hormonais, recidiva e sobrevida. A avaliação de pares de tumor primário e metástase é particularmente relevante para miR-10b, enquanto a inclusão de margens e tecido mamário histologicamente normal poderá esclarecer os contrastes de let-7a, miR-29b, miR-200c e miR-21.

Após a padronização analítica e a ampliação amostral, o desempenho dos candidatos deverá ser examinado em coorte independente, com estimativas de sensibilidade, especificidade, curvas ROC e associação com desfechos clínicos. Essa estratégia permitirá distinguir marcadores de interesse mecanístico daqueles com potencial efetivo para aplicação diagnóstica ou prognóstica.

REFERÊNCIAS

- ABBATE, J. M.; GIANNETTO, A.; ARFUSO, F.; BRUNETTI, B.; LANTERI, G. RT-qPCR expression profiles of selected oncogenic and oncosuppressor miRNAs in formalin-fixed, paraffin-embedded canine mammary tumors. *Animals*, v. 12, n. 21, art. 2898, 2022. DOI: 10.3390/ani12212898.
- ALI, P. S. S.; AHMAD, M. P.; PARVEEN, K. M. H. Lin28/let-7 axis in breast cancer. *Molecular Biology Reports*, v. 52, n. 1, art. 311, 2025. DOI: 10.1007/s11033-025-10413-6.
- AMIRIAN, M.; JAFARI-NOZAD, A. M.; DARROUDI, M.; FARKHONDEH, T.; SAMARGHANDIAN, S. Overview of the miR-29 family members' function in breast cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 230, art. 123280, 2023. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123280.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization. *Cancer Research*, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- ARUVORNLOP, P. et al. Phosphoproteomic profiling of feline mammary carcinoma: insights into tumor grading and potential therapeutic targets. *PLOS ONE*, v. 20, n. 8, e0330520, 2025. DOI: 10.1371/journal.pone.0330520.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- BERTOLI, G.; CAVA, C.; CASTIGLIONI, I. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*, v. 5, n. 10, p. 1122-1143, 2015. DOI: 10.7150/thno.11543.
- BOGGS, R. M.; WRIGHT, Z. M.; STICKNEY, M. J.; PORTER, W. W.; MURPHY, K. E. MicroRNA expression in canine mammary cancer. *Mammalian Genome*, v. 19, n. 7-8, p. 561-569, 2008. DOI: 10.1007/s00335-008-9128-7.
- BULKOWSKA, M. et al. MicroRNA expression patterns in canine mammary cancer show significant differences between metastatic and non-metastatic tumours. *BMC Cancer*, v. 17, art. 728, 2017. DOI: 10.1186/s12885-017-3751-1.
- BUSTIN, S. A. et al. MIQE 2.0: revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments guidelines. *Clinical Chemistry*, v. 71, n. 6, p. 634-651, 2025. DOI: 10.1093/clinchem/hvaf043.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- CASSALI, G. D. et al. Canine, feline, and murine mammary tumors as a model for translational research in breast cancer. *Veterinary Sciences*, v. 12, n. 2, art. 189, 2025. DOI: 10.3390/vetsci12020189.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus on the diagnosis, prognosis, and treatment of canine and feline mammary tumors: solid arrangement - 2023. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 17, n. 3, p. 152-163, 2024. DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v17i3p152-163.

- CHANG, Y.-C. et al. Feline mammary carcinoma-derived extracellular vesicle promotes liver metastasis via sphingosine kinase-1-mediated premetastatic niche formation. *Laboratory Animal Research*, v. 39, art. 27, 2023. DOI: 10.1186/s42826-023-00180-5.
- CHOU, J. et al. GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. *Nature Cell Biology*, v. 15, n. 2, p. 201-213, 2013. DOI: 10.1038/ncb2672.
- CONTE, L. et al. The prognostic power of miR-21 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, n. 19, art. 9713, 2025. DOI: 10.3390/ijms26199713.
- DAGHER, E. et al. Bcl-2 expression and prognostic significance in feline invasive mammary carcinomas: a retrospective observational study. *BMC Veterinary Research*, v. 15, art. 25, 2019. DOI: 10.1186/s12917-018-1772-x.
- FERREIRA, T.; DIAS, F.; ALVES, Â.; GAMA, A.; MANO, J. F.; OLIVEIRA, P. A.; MEDEIROS, R. Let-7b, miR-29b, and miR-125b as potential biomarkers for differentiating canine mammary carcinoma histological types. *Animals*, v. 15, n. 1, art. 20, 2025. DOI: 10.3390/ani15010020.
- FERRÉ DOLCET, L. Advancing and historical reversible contraceptive solutions for feline reproductive control. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 60, suppl. 3, e70107, 2025. DOI: 10.1111/rda.70107.
- FLEISCHHACKER, S. N. et al. Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats. *The Veterinary Journal*, v. 197, n. 3, p. 688-693, 2013. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.03.009.
- GAMEIRO, A.; URBANO, A. C.; FERREIRA, F. Emerging biomarkers and targeted therapies in feline mammary carcinoma. *Veterinary Sciences*, v. 8, n. 8, art. 164, 2021. DOI: 10.3390/vetsci8080164.
- GARZON, R.; MARCUCCI, G.; CROCE, C. M. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 9, n. 10, p. 775-789, 2010. DOI: 10.1038/nrd3179.
- GEMIGNANI, F. et al. Association of surgical approach with complication rate, progression-free survival time, and disease-specific survival time in cats with mammary adenocarcinoma: 107 cases (1991-2014). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 252, n. 11, p. 1393-1402, 2018. DOI: 10.2460/javma.252.11.1393.
- GIMÉNEZ, F. et al. Early detection, aggressive therapy: optimizing the management of feline mammary masses. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 12, n. 3, p. 214-224, 2010. DOI: 10.1016/j.jfms.2010.01.004.
- GREGORY, P. A. et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology*, v. 10, n. 5, p. 593-601, 2008. DOI: 10.1038/ncb1722.
- HALIM, A.; KIM, B.; KENYON, E.; MOORE, A. miR-10b as a clinical marker and a therapeutic target for metastatic breast cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, v. 24, p. 1-7, 2025. DOI: 10.1177/15330338251339256.
- HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

- HAYES, J.; PERUZZI, P. P.; LAWLER, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine*, v. 20, n. 8, p. 460-469, 2014. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.06.005.
- HOWARD, J. et al. The protein and miRNA profile of plasma extracellular vesicles can distinguish feline mammary adenocarcinoma patients from healthy feline controls. *Scientific Reports*, v. 13, art. 9178, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-36110-7.
- HU, Z. et al. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis*, v. 33, n. 4, p. 828-834, 2012. DOI: 10.1093/carcin/bgs030.
- HUNIADI, M. et al. Altered microRNA profiles and associated pathways in canine mammary adenocarcinoma. *Scientific Reports*, v. 16, art. 978, 2026. DOI: 10.1038/s41598-025-30579-0.
- IORIO, M. V.; CROCE, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer Journal*, v. 18, n. 3, p. 215-222, 2012. DOI: 10.1097/PPO.0b013e318250c001.
- JAIN, M. et al. CEA, CA 15-3, and miRNA expression as potential biomarkers in canine mammary tumors. *Chromosome Research*, v. 29, n. 2, p. 175-188, 2021. DOI: 10.1007/s10577-021-09652-7.
- JURJ, A. et al. Discovering the biological significance and therapeutic potential of miR-29b-3p in triple-negative breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 5, art. 5048, 2023. DOI: 10.3390/ijms24055048.
- LAGANÀ, A. et al. Discovery and characterization of the feline miRNAome. *Scientific Reports*, v. 7, art. 9263, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-10164-w.
- 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, n. 5, p. 843-854, 1993. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
- LIN, Z. et al. MiR-200c reprograms fibroblasts to recapitulate the phenotype of CAFs in breast cancer progression. *Cell Stress*, v. 8, p. 1-20, 2024. DOI: 10.15698/cst2024.03.293.
- LIU, K. et al. Let-7a inhibits growth and migration of breast cancer cells by targeting HMGA1. *International Journal of Oncology*, v. 46, n. 6, p. 2526-2534, 2015. DOI: 10.3892/ijo.2015.2949.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- MA, L.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WEINBERG, R. A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, v. 449, p. 682-688, 2007. DOI: 10.1038/nature06174.
- MESTDAGH, P. et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biology*, v. 10, art. R64, 2009. DOI: 10.1186/gb-2009-10-6-r64.
- MISDORP, W.; ROMIJN, A.; HART, A. A. M. The significance of ovariectomy and progestagens in the development of mammary carcinoma in cats. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, v. 117, n. 1, p. 2-4, 1992.
- MONTEIRO, M.; PETRUCCI, G.; QUEIROGA, F. L. Prognostic insights in feline mammary carcinomas: clinicopathological factors and the proposal of a new staging system. *Animals*, v. 15, n. 6, art. 779, 2025. DOI: 10.3390/ani15060779.

- NAGPAL, N.; AHMAD, H. M.; MOLPARIA, B.; KULSHRESHTHA, R. MicroRNA-191, an estrogen-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human breast cancer. *Carcinogenesis*, v. 34, n. 8, p. 1889-1899, 2013. DOI: 10.1093/carcin/bgt107.
- NASCIMENTO, C.; GAMEIRO, A.; CORREIA, J.; FERREIRA, J.; FERREIRA, F. The landscape of tumor-infiltrating immune cells in feline mammary carcinoma: pathological and clinical implications. *Cells*, v. 11, n. 16, art. 2578, 2022. DOI: 10.3390/cells11162578.
- NI, J.; XI, X.; XIAO, S.; XIAO, X. Tumor cell-derived exosomal miR-191-5p activates M2-subtype macrophages through SOCS3 to facilitate breast cancer. *Molecular Biotechnology*, v. 66, n. 5, p. 1314-1325, 2024. DOI: 10.1007/s12033-023-01034-0.
- OVERLEY, B. et al. Association between ovariohysterectomy and feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 19, n. 4, p. 560-563, 2005. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2005.tb02727.x.
- PELTIER, H. J.; LATHAM, G. J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*, v. 14, n. 5, p. 844-852, 2008. DOI: 10.1261/rna.939908.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 9, art. e45, 2001. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.
- QIAO, P.; DU, H.; GUO, X.; YU, M.; ZHANG, C.; SHI, Y. Serum exosomal miR-200c is a potential diagnostic biomarker for breast cancer. *Biomarkers*, v. 29, n. 7, p. 419-426, 2024. DOI: 10.1080/1354750X.2024.2406520.
- RAMADAN, E. S.; SALEM, N. Y.; EMAM, I. A.; ABDELKADER, N. A.; FARGHALI, H. A.; KHATTAB, M. S. MicroRNA-21 expression, serum tumor markers, and immunohistochemistry in canine mammary tumors. *Veterinary Research Communications*, v. 46, n. 2, p. 377-388, 2022. DOI: 10.1007/s11259-021-09861-9.
- RODRIGUES-JESUS, J. et al. Distribution of inflammatory infiltrate in feline mammary lesions: relationship with clinicopathological features. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 22, n. 3, p. 398-409, 2024. DOI: 10.1111/vco.12987.
- RODRIGUES-JESUS, J. et al. Feline mammary tumors: comparison of histological classifications and prognostic factors in a 3-year survival study (Part I). *The Veterinary Journal*, v. 317, art. 106638, 2026a. DOI: 10.1016/j.tvjl.2026.106638.
- RODRIGUES-JESUS, J. et al. Feline mammary tumors: comparison of histological grading systems and Nottingham prognostic index in a 3-year survival study (Part II). *The Veterinary Journal*, v. 317, art. 106640, 2026b. DOI: 10.1016/j.tvjl.2026.106640.
- RODRIGUES-JESUS, J.; CANADAS-SOUSA, A.; VILHENA, H.; DIAS-PEREIRA, P. Inside the tumor: decoding the feline mammary tumor microenvironment and its prognostic value - a review. *Veterinary Sciences*, v. 12, n. 10, art. 959, 2025b. DOI: 10.3390/vetsci12100959.
- RODRIGUES-JESUS, J.; VILHENA, H.; CANADAS-SOUSA, A.; DIAS-PEREIRA, P. Feline mammary tumors: a comprehensive review of histological classification schemes, grading systems, and prognostic factors. *Veterinary Sciences*, v. 12, n. 8, art. 736, 2025a. DOI: 10.3390/vetsci12080736.
- SAVAN, N. A. et al. MicroRNA-10b as a therapeutic target in feline metastatic mammary carcinoma and its implications for human clinical trials. *Frontiers in Oncology*, v. 12, art. 959630, 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.959630.

SLACK, F. J.; WEIDHAAS, J. B. MicroRNA in cancer prognosis. *The New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 25, p. 2720-2722, 2008. DOI: 10.1056/NEJMe0808667.

SOARES, E. S. et al. Platelet count and MCHC as independent prognostic markers for feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science*, v. 164, art. 105024, 2023. DOI: 10.1016/j.rvsc.2023.105024.

SOUSA, T. H. M.; ERMEL, T. B.; SAMPAIO, T. B.; LOPES NETO, B. E.; CASSALI, G. D. Epidemiologia e histopatologia de lesões mamárias em cadelas e gatas de Fortaleza (2022 a 2023). *Ciência Animal*, v. 34, n. 4, p. 14-24, 2024.

SOUZA, F. R.; MOREIRA, I. S.; DARIVA, A. A.; NAKAGAKI, K. Y. R.; ABREU, C. C.; BALABRAM, D.; CASSALI, G. D. Epidemiologic and clinicopathological characterization of feline mammary lesions. *Veterinary Sciences*, v. 11, n. 11, art. 549, 2024. DOI: 10.3390/vetsci11110549.

SYED, R. U. et al. MicroRNA-21 (miR-21) in breast cancer: from apoptosis dysregulation to therapeutic opportunities. *Pathology - Research and Practice*, v. 262, art. 155572, 2024. DOI: 10.1016/j.prp.2024.155572.

TAHTASAKAL, R. et al. miR-484 as an “OncomiR” in breast cancer promotes tumorigenesis by suppressing apoptosis genes. *Annals of Surgical Oncology*, v. 32, n. 4, p. 2994-3008, 2025. DOI: 10.1245/s10434-024-16656-0.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, v. 3, n. 7, art. research0034, 2002. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

VILELA, T.; VALENTE, S.; CORREIA, J.; FERREIRA, F. Advances in immunotherapy for breast cancer and feline mammary carcinoma: from molecular basis to novel therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, v. 1879, n. 5, art. 189144, 2024. DOI: 10.1016/j.bbcan.2024.189144.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 5. ed. St. Louis: Elsevier, 2013.

YE, F. G. et al. Cytidine deaminase axis modulated by miR-484 differentially regulates cell proliferation and chemoresistance in breast cancer. *Cancer Research*, v. 75, n. 7, p. 1504-1515, 2015. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2341.

ZAPPULLI, V. et al. Prognostic evaluation of feline mammary carcinomas: a review of the literature. *Veterinary Pathology*, v. 52, n. 1, p. 46-60, 2015. DOI: 10.1177/0300985814528221.

APÊNDICE A – CONSOLIDAÇÃO DOS C_q POR ANIMAL

microRNA	Amostra	Grupo	C _q 1	C _q 2	C _q 3	n válido	Média	DP	Variabilidade técnica
let-7a	FC1	FC	19,98	20,31	19,67	3	19,99	0,32	Baixa
let-7a	FC2	FC	20,87	17,08	19,77	3	19,24	1,95	Elevada
let-7a	FSA1	FSA	17,02	17,00	16,07	3	16,70	0,54	Intermediária
let-7a	FSA2	FSA	20,23	18,07	17,03	3	18,44	1,63	Elevada
let-7a	FCA1	FCA	19,18	0,00	19,25	2	19,21	0,05	Baixa
let-7a	FCA2	FCA	27,56	28,87	0,00	2	28,21	0,93	Intermediária
miR-29b	FC1	FC	30,21	30,56	20,67	3	27,15	5,61	Elevada
miR-29b	FC2	FC	28,92	25,88	18,47	3	24,42	5,38	Elevada
miR-29b	FSA1	FSA	31,16	30,72	31,00	3	30,96	0,22	Baixa
miR-29b	FSA2	FSA	31,34	34,25	31,42	3	32,34	1,66	Elevada
miR-29b	FCA1	FCA	31,28	32,23	32,45	3	31,99	0,62	Intermediária
miR-29b	FCA2	FCA	30,39	30,51	0,00	2	30,45	0,08	Baixa
miR-191	FC1	FC	0,00	32,32	18,67	2	25,50	9,65	Elevada
miR-191	FC2	FC	23,67	25,76	0,00	2	24,72	1,48	Elevada
miR-191	FSA1	FSA	0,00	27,97	28,73	2	28,35	0,54	Intermediária
miR-191	FSA2	FSA	31,56	29,52	23,54	3	28,21	4,17	Elevada
miR-191	FCA1	FCA	29,11	29,98	29,27	3	29,45	0,46	Baixa
miR-191	FCA2	FCA	30,51	35,30	0,00	2	32,91	3,39	Elevada
miR-200b	FC1	FC	26,67	26,32	24,56	3	25,85	1,13	Elevada
miR-200b	FC2	FC	25,34	24,76	25,54	3	25,21	0,41	Baixa
miR-200b	FSA1	FSA	26,85	25,52	0,00	2	26,19	0,94	Intermediária
miR-200b	FSA2	FSA	27,43	25,63	28,64	3	27,23	1,51	Elevada
miR-200b	FCA1	FCA	26,88	26,53	26,62	3	26,68	0,18	Baixa
miR-200b	FCA2	FCA	29,30	22,37	28,50	3	26,72	3,79	Elevada
miR-200c	FC1	FC	27,32	29,31	28,45	3	28,36	1,00	Intermediária
miR-200c	FC2	FC	26,25	15,76	25,73	3	22,58	5,91	Elevada
miR-200c	FSA1	FSA	28,88	29,12	32,90	3	30,30	2,25	Elevada
miR-200c	FSA2	FSA	30,62	30,85	31,94	3	31,14	0,71	Intermediária
miR-200c	FCA1	FCA	31,08	30,68	30,91	3	30,89	0,20	Baixa
miR-200c	FCA2	FCA	30,70	30,30	29,54	3	30,18	0,59	Intermediária
miR-484	FC1	FC	23,77	25,87	28,43	3	26,02	2,33	Elevada
miR-484	FC2	FC	27,87	24,87	24,43	3	25,72	1,87	Elevada
miR-484	FSA1	FSA	25,57	28,68	25,52	3	26,59	1,81	Elevada
miR-484	FSA2	FSA	26,87	28,65	27,98	3	27,83	0,90	Intermediária
miR-484	FCA1	FCA	27,97	28,66	28,10	3	28,24	0,37	Baixa
miR-484	FCA2	FCA	28,15	27,48	32,09	3	29,24	2,49	Elevada
miR-10b	FC1	FC	29,43	29,54	30,00	3	29,66	0,30	Baixa
miR-10b	FC2	FC	30,34	29,32	30,01	3	29,89	0,52	Intermediária
miR-10b	FSA1	FSA	30,30	28,89	29,50	3	29,56	0,71	Intermediária
miR-10b	FSA2	FSA	29,54	29,87	28,01	3	29,14	0,99	Intermediária
miR-10b	FCA1	FCA	30,45	29,60	30,07	3	30,04	0,43	Baixa
miR-10b	FCA2	FCA	30,02	28,50	28,76	3	29,09	0,81	Intermediária
miR-21	FC1	FC	25,02	27,87	24,32	3	25,74	1,88	Elevada
miR-21	FC2	FC	27,88	25,09	26,01	3	26,33	1,42	Elevada
miR-21	FSA1	FSA	25,78	25,17	24,88	3	25,28	0,46	Baixa
miR-21	FSA2	FSA	29,76	31,87	30,77	3	30,80	1,06	Elevada
miR-21	FCA1	FCA	25,51	26,60	25,61	3	25,91	0,60	Intermediária
miR-21	FCA2	FCA	28,66	39,87	27,55	3	32,03	6,82	Elevada

Fonte: elaboração própria. Valores de C_q iguais a zero foram considerados ausentes nos cálculos. As faixas de variabilidade entre réplicas foram descritivas: baixa (<0,5 C_q), intermediária (0,5 a 1,0 C_q) e elevada (>1,0 C_q).