

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**EXPRESSÃO DE NRF2 NAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE  
CADELAS E SUA CORRELAÇÃO COM FATORES  
PROGNÓSTICOS E SOBREVIDA**

**VITOR DE MORAES PINA DE CARVALHO**

Salvador – BA

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**EXPRESSÃO DE NRF2 NAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE  
CADELAS E SUA CORRELAÇÃO COM FATORES  
PROGNÓSTICOS E SOBREVIDA**

**VITOR DE MORAES PINA DE CARVALHO**

Médico Veterinário

Salvador – BA

2023

**VITOR DE MORAES PINA DE CARVALHO**

**EXPRESSÃO DE NRF2 NAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE  
CADELAS E SUA CORRELAÇÃO COM FATORES  
PROGNÓSTICOS E SOBREVIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Animal nos Trópicos.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof. Dra. Alessandra Estrela-Lima

Co-orientadora: Dra. Karine Araújo Damasceno

Salvador – BA

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

de Moraes Pina de Carvalho, Vitor  
Expressão de NRF2 nas neoplasias mamárias de  
cadelas e sua correlação com fatores prognósticos e  
sobrevida / Vitor de Moraes Pina de Carvalho. --  
Salvador, 2023.  
78 f.

Orientador: Alessandra Estrela da Silva Lima.  
Coorientador: Karine Araújo Damasceno.  
Dissertação (Mestrado - Medicina Veterinária) --  
Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal  
da Bahia - Escola de Medicina Veterinária e  
Zootecnia, 2023.

1. Carcinomas mamários. 2. Estresse oxidativo. 3.  
H-score. 4. Biomarcador. 5. Fator de transcrição . I.  
Estrela da Silva Lima, Alessandra. II. Araújo  
Damasceno, Karine. III. Título.

**EXPRESSÃO DE NRF2 NAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE  
CADELAS E SUA CORRELAÇÃO COM FATORES  
PROGNÓSTICOS E SOBREVIDA**

**VITOR DE MORAES PINA DE CARVALHO**

Defesa defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal nos  
Trópicos.

Salvador, 27 de junho de 2023.

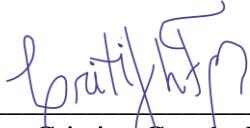
Comissão Examinadora:



---

Profa. Dra. Alessandra Estrela Lima  
Presidente - PPGCAT

---



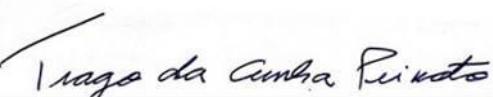
Profa. Dra. Cristina Gevehr Fernandes  
Universidade Federal de Pelotas

---



Dr. Diego Carlos dos Reis  
Institute of Cancer Research, London

---



Prof. Dr. Tiago da Cunha Peixoto  
Universidade Federal da Bahia

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”*  
*Cora Coralina*

## RESUMO

**CARVALHO, V. M. P. Expressão de NRF2 nas neoplasias mamárias de cadelas e sua correlação com fatores prognósticos e sobrevida.** 2023. 78p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2023.

Diante da alta frequência do câncer de mama em cadelas, é crescente a busca por melhores indicações prognósticas e terapêuticas na rotina oncológica veterinária. Desta forma, os fatores prognósticos em neoplasias mamárias são cada vez mais objeto de variados estudos. Dentre estes fatores, destaca-se na oncologia humana o fator de transcrição nuclear relacionado ao fator eritroide 2 (NRF2), regulador do sistema antioxidante celular e atuante como supressor, promotor ou ambos na carcinogênese. Porém, são escassos estudos relacionados a esse fator de transcrição na veterinária. Neste contexto, objetivou-se avaliar a expressão de NRF2 nas neoplasias mamárias de cadelas, sua correlação com progressão tumoral, fatores prognósticos clássicos (estadiamento clínico, tipo histológico, tamanho tumoral e graduação histopatológica) e sobrevida. Foram analisadas 44 amostras de glândulas mamárias de cadelas de diferentes raças e idades, classificadas em: grupo controle (n=6) (mamas sem alterações histológicas), neoplasias benignas (n=8) e neoplasias malignas (n=30). As amostras foram provenientes do Laboratório de Patologia Veterinária do HOSPMEV-UFBA e de um laboratório particular da cidade de Salvador no período de 2018 a 2022. As fichas clínicas e laudos histopatológicos foram revisados e coletados dados referentes ao tamanho tumoral, estadiamento clínico, diagnóstico, graduação histopatológica e tempo de sobrevida. Com base no diagnóstico histológico e clínico foram formados os seguintes subgrupos de tumores para avaliação qualitativa e quantitativa, a partir do *histochemical-score* (H-score) da expressão de NRF2 e índice de proliferação (Ki-67): tumores mistos benignos (TMB) (n=5) adenomas simples (n=2), adenomioepitelioma (n=1), carcinomas simples (n=6), carcinoma em tumores mistos (CMT) (n=14), estes subdivididos em grau I (n=7) e grau II e III (n=7), carcinossarcomas (n=4) e adenomioepiteliomas malignos (n= 6). Os resultados da expressão do NRF2 indicaram marcação predominantemente citoplasmática e diminuição do H-score com o aumento dos critérios de malignidade tumoral. O H-score do grupo dos tumores malignos diferiu apenas do grupo controle ( $p<0,001$ ). Ao comparar os subgrupos tumorais observou-se que os carcinomas simples possuíram maior expressão imuno-histoquímica do NRF2 que os adenomas simples, diferentemente dos tumores mistos, em que a expressão foi maior nos tumores benignos em comparação aos carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas. Os animais de maior H-score apresentaram maior sobrevida, enquanto a capacidade proliferativa foi maior em tumores cuja expressão de NRF2 era menor ou igual a 156,5, com forte correlação negativa e associação significativa ( $r=-0,698$ ;  $p=0,001$ ). A avaliação dos parâmetros clínico-patológicos das neoplasias malignas, na análise univariada indicou associação significativa e correlação negativa do H-score com Ki-67, estadiamento clínico e tamanho tumoral, já na análise multivariada apenas houve correlação com o Ki-67. Estes resultados avaliados, em conjunto, não conferiram um significativo valor clínico ao NRF2, desta forma ele não é um fator prognóstico independente em cadelas com tumores mamários.

**Palavras-chave:** carcinomas mamários, estresse oxidativo, H-score, biomarcador, fator de transcrição

## ABSTRACT

Given the high frequency of mammary cancer in female dogs, there is an increasing search for improved prognostic and therapeutic indications in veterinary oncology practice. Thus, prognostic factors in mammary neoplasms are the subject of various studies. Among these factors, the nuclear transcription factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) stands out in human oncology. It regulates the cellular antioxidant system and acts as a suppressor, promoter, or both in carcinogenesis. However, there is a scarcity of studies related to this transcription factor in veterinary medicine. In this context, the objective was to evaluate the expression of NRF2 in mammary neoplasms of female dogs, its correlation with tumor progression, classic prognostic factors (clinical staging, tumor size, and histopathological grade), and survival. Forty-four samples of mammary glands from female dogs of different breeds and ages were analyzed, classified into: control group (n=6) (mammary glands without histological alterations), benign neoplasms (n=8), and malignant neoplasms (n=30). The samples were obtained from the Veterinary Pathology Laboratory of HOSPMEV-UFBA and a private laboratory in the city of Salvador between 2018 and 2022. Clinical records and histopathological reports were reviewed, and data regarding tumor size, clinical staging, diagnosis, histopathological grade, and survival time were collected. Based on the histological and clinical diagnosis, the following tumor subgroups were formed for qualitative and quantitative evaluation, using the histochemical score (H-score) of NRF2 expression and the proliferation index (Ki-67): benign mixed tumors (BMT) (n=5), simple adenomas (n=2), adenomyoepithelioma (n=1), simple carcinomas (n=6), carcinoma in mixed tumors (CMT) (n=14), further subdivided into grade I (n=7) and grades II and III (n=7), carcinosarcomas (n=4), and malignant adenomyoepitheliomas (n=6). The results of NRF2 expression indicated predominantly cytoplasmic staining and a decrease in the H-score with an increase in the criteria of tumor malignancy. The H-score of the malignant tumor group differed only from the control group ( $p<0.001$ ). When comparing the tumor subgroups, it was observed that simple carcinomas had higher immunohistochemical expression than simple adenomas, unlike mixed tumors, where the expression was higher in benign tumors compared to carcinoma in mixed tumors and carcinosarcomas. Animals with higher H-scores showed longer survival, while proliferative capacity was higher in tumors with NRF2 expression equal to or less than 156.5, with a strong negative correlation and significant association ( $r= -0.698$ ;  $p=0.001$ ). The evaluation of clinical and pathological parameters in malignant neoplasms, in the univariate analysis, indicated a significant association and negative correlation of the H-score with Ki-67, clinical staging, and tumor size, whereas in the multivariate analysis, there was only a correlation with Ki-67. These collectively evaluated results did not confer significant clinical value to NRF2; thus, it is not an independent prognostic factor in female dogs with mammary tumors.

**Keywords:** mammary carcinomas, oxidative stress, H-score, biomarker, transcription factor

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Representação esquemática do desequilíbrio de ROS e inibição do apoptose celular.....	24
<b>Figura 2</b> Domínios proteicos do NRF2 e KEAP1.....	26
<b>Figura 3</b> Vias de sinalização de NRF2.....	28
<b>Figura 4</b> Representação esquemática das funções de NRF2 na carcinogênese.....	30
<b>Figura 5</b> Organograma dos grupos experimentais divididos de acordo com o comportamento biológico/graduação da neoplasia.....	39
<b>Figura 6</b> Macroscopia das neoplasias mamárias em cadelas.....	45
<b>Figura 7</b> Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica do marcador Ki-67 em amostras de neoplasias mamárias em cadelas.....	47
<b>Figura 8</b> Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica do marcador NRF2 em amostras controle e de neoplasias mamárias em cadelas.....	49
<b>Figura 9</b> Representação gráfica de H-score e tipos histológicos de tumores mamários em cadelas.....	52
<b>Figura 10</b> Representação gráfica do índice de desempenho do ponto de corte da expressão do NRF2.....	53
<b>Figura 11</b> Curva de sobrevida de Kaplan-Meier considerando todas as cadelas.....	55

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> Estadiamento clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM.....	20
<b>Tabela 2</b> Resumo do método semiquantitativo para avaliação do grau histológico em carcinomas mamários caninos .....	21
<b>Tabela 3</b> Comparação entre comportamento biológico tumoral de cadelas, epidemiologia e fatores prognósticos.....	46
<b>Tabela 4</b> Comparação entre comportamento biológico tumoral de cadelas, médias da expressão de NRF2 e Ki-67.....	47
<b>Tabela 5</b> Associação entre parâmetros clínico-patológicos e H-score .....	54
<b>Tabela 6</b> Análise univariada e multivariada dos parâmetros clínico-patológicos das neoplasias mamárias malignas relacionados com H-score $\geq 156,5$ .....	56
<b>Tabela 7</b> Análise univariada e multivariada dos parâmetros clínico-patológicos das neoplasias mamárias malignas relacionados com sobrevida .....	57

**LISTA DE ANEXOS**

	<b>Página</b>
<b>Anexo 1</b> Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

3-NITRO	3-nitrotirosina
4-HNE	4-Hidroxinonenal
8-OHdG	8-hidroxideoguanosina
AINES	Anti-inflamatório não esteroidais
ARE	Elemento de resposta antioxidante
BMPR1A	Receptor 1 A de proteína morfogenética óssea
BRCA1	Proteína/gene de susceptibilidade ao câncer de mama 1
BRCA2	Proteína/gene de susceptibilidade ao câncer de mama 2
BTB	Complexo amplo, tramtrack e bric-a-brac
C151	Cisteína 151
C273	Cisteína 273
C288	Cisteína 288
CMT	Carcinoma em tumor misto
CCS	Carcinossarcoma
CDK5RAP2	Proteína 2 associada à subunidade reguladora de CDK5
CHD6	Cromodomínio helicase proteína de ligação ao DNA 6
CIM	Carcinoma inflamatório mamário
CNC	<i>CapN'collar</i>
Cox-2	Ciclooxygenase 2
CREB	Cyclic adenosine monophosphate response element
CMT I	Carcinoma em tumor misto Grau I
CMT II	Carcinoma em tumor misto Grau II
CIM	Carcinoma inflamatório mamário
CRM1	Região manutenção cromossômica da carioferina 1
DAB	<i>DAB substrate system, Dakocytomation</i>
DGR	Repetição dupla de glicina
DLG	Motivo responsável pela ubiquitinação de NRF2
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ECH	Proteína derivada de células eritroides CNC
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico
ESR1	Receptor de estrógeno 1
ETGE	Tetrapeptídeo de ligação do domínio Neh 2 com o KEAP1

G6PD	Glicose 6 fosfatodesidrogenase
GCL	Glutamato cisteína ligase
GTPases	Enzima hidrolase de guanosina trifosfato
Her -2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
HIF-1 $\alpha$	Fator de hipóxia tumoral 1-alfa
HMOX1	Gene que codifica a enzima heme oxigenase 1
HO-1	Heme-oxigenase
HOSPMEV	Hospital de Medicina Veterinária da UFBA
HSPs	Proteínas de choque térmico
IFG1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
ITGB2	Subunidade Beta 2 integrina
IVR	Região interveniente do domínio de KEAP1
JAG1	Ligante Notch 1 canônico irregular
KEAP1	Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch
KI-67	Índice de proliferação
MAF	Fibroblastos do músculo aponeurótico
MAPKS	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCF7	Linhagem celular MCF7
MDA-MB2	Linhagem celular MDA-MB23
MMD2	<i>Murine double minutes</i> (supressor do gene p53)
NAD(P)H	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
Neh1	Domínio de N-terminal de NRF2 1
Neh4	Domínio de N-terminal de NRF2 4
Neh5	Domínio de N-terminal de NRF2 5
Neh6	Domínio de N-terminal de NRF2 6
NF-E2	Fator nuclear eritroide derivado 2
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NLS	Sinal de localização nuclear
NES	Sinal de exportação nuclear
NOTCH1	A proteína homóloga de entalhe do locus neurogênico 1
NPNT	Nefronectina
NPV	Valor preditivo negativo
NO	Óxido Nítrico

NQO1	NAD(P)H:quinona oxidase 1
Nrf2	Fator de transcrição nuclear relacionado ao fator eritroide 2
p53	Proteína/gene p53
p21	Proteína/gene p21, gene alvo p53
PALB2	Parceiro e localizador do BRCA2
PBS	Tampão fosfato salino
PDGFC	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinase
PPV	Valor preditivo positivo
PSDM4	Gene proteassômico
RAS	Proteínas de vírus de sarcoma de rato
Rbx1	<i>Ring Box proteína 1</i>
RE	Receptor de estrógeno
RhoC	<i>Gene Ras homolog gene family, member C</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RP	Receptor de progesterona
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
SOD	Super óxido dismutase
SRD	Sem raça definida
TCD4+	Linfócito T CD4
TCD8+	Linfócito T CD8
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UPS	Sistema de proteassoma de ubiquitina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFC	Fator de crescimento endotelial vascular C

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	16
2.1 NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS .....	16
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO E CÂNCER DE MAMA .....	22
2.3 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR RELACIONADO AO FATOR ERITROIDE 2 (NRF2) .....	25
<b>3. HIPÓTESE.....</b>	36
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	37
4.1 OBJETIVO GERAL.....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	38
5.1. ASPECTOS ÉTICOS E FINANCIAMENTO .....	38
5.2 LOCAIS DE EXECUÇÃO DA PESQUISA.....	38
5.3 AMOSTRAS .....	38
5.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	40
5.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	40
5.6 QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.	41
5.7. AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE DESEMPENHO DO NRF2.....	42
5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
<b>6. RESULTADOS.....</b>	44
6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICAS E PATOLÓGICAS .....	44
6.2 AVALIAÇÃO DO H-SCORE E KI-67	47
.....	.....
6.2.1 Expressão de NRF2 em glândulas mamárias sem alterações neoplásicas de cadelas .....	50
6.2.2 Expressão de NRF2 em neoplasias benignas de cadelas.....	50

<b>6.2.3 Expressão de NRF2 nos tumores malignos de cadelas .....</b>	<b>50</b>
6.3 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS: CONTROLE, NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS .....	50
<b>6.3.1 Comparação entre grupos: Neoplasias mamárias benignas versus neoplasias mamárias .....</b>	<b>51</b>
<b>6.3.2 Comparação entre grupos: Tumores mistos benignos, carcinoma em tumor misto e carcinossarcoma .....</b>	<b>51</b>
<b>6.3.3 Comparação entre grupos: Carcinomas em tumores mistos grau I, II e III.....</b>	<b>51</b>
6.4 ESTABELECIMENTO DE PONTO DE CORTE H-SCORE.....	52
6.5 ASSOCIAÇÃO PARÂMETROS CLÍNICOS PATOLÓGICOS E H- SCORE .....	53
6.6 COMPARAÇÃO DE CURVA DE SOBREVIDA .....	55
6.7 ANÁLISE UNIVARIADA E MULTIVARIADA.....	55
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O conhecimento de fatores prognósticos tem extrema importância, uma vez que pacientes com neoplasias morfológicamente semelhantes podem apresentar comportamentos biológicos distintos (ZUCCARI, et al., 2001). Nguyen e colaboradores (2017) relatam como fatores prognósticos dos tumores mamários na população canina, o tamanho do tumor, comprometimento nodal, grau histológico, positividade para receptor de estrógeno, além de invasão linfovascular.

O NRF2, fator de transcrição nuclear relacionado ao eritroide 2 (NRF2), tem sido estudado e aventada a sua utilização como fator prognóstico nos tumores de mama da mulher (ONODERA, et al., 2014; SIMPLICIO-REVOREDO, et al., 2020). Sabe-se que o NRF2 é um importante fator regulador para a manutenção do equilíbrio do estresse oxidativo em condições fisiológicas (WAKABAYASHI, et al., 2010) e está amplamente difundido nos órgãos. Esse fator é responsável pela regulação de algumas enzimas metabolizadoras de fase II e genes antioxidantes que contêm elementos de resposta antioxidante na região promotora, como NAD(P)H quinona oxidorredutase 1 (NQO1), glutationa S-transferases (GSTs), heme oxigenase-1 (HO-1) e outros genes que regulam a resposta ao estresse oxidativo (TAGUCHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2011).

Numerosos fatores por meio de diferentes mecanismos estão envolvidos no aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) das células neoplásicas. Em resposta a esse excesso de ROS, a via de sinalização apoptótica é ativada para promover a morte da célula não neoplásica. No entanto, por meio da desregulação de biomoléculas, a alta quantidade de ROS promove a carcinogênese em células com fatores de sinalização defeituosos (SAJADIMAJD; KHAZAEI, 2018). Karihtala e colaboradores (2006) ao avaliar a associação entre carcinomas mamários invasivos e estresse oxidativo, concluíram que os tumores de maior agressividade estão associados a maior dano oxidativo em lipídeos, proteínas e DNA. Esse estresse oxidativo é caracterizado pelas lesões celulares advindas do desequilíbrio entre condições pró-oxidantes e antioxidante das células (MACHADO, et al., 2006).

O NRF2 inibe a iniciação do tumor eliminando carcinógenos, ROS e outros agentes que danificam o DNA. Entretanto, durante a carcinogênese, o acúmulo de danos ao DNA leva à hiperatividade constitutiva do NRF2, que auxilia as células neoplásicas a suportar altos níveis de ROS endógenos e evitar a apoptose, o que pode resultar em proliferação celular aumentada (SPORN; LIBY, 2012).

Experimentos *in vitro* com células de câncer de mama, demonstraram a ação do NRF2 na proliferação e metástase de células neoplásicas, pois altos níveis deste fator de transcrição, também aumentaram a transdução de sinais da via de sinalização dos genes da família Ras GTPases, mais especificamente a Rhoa, que é fundamental na regulação da motilidade celular e invasão celular. Quando há inibição de NRF2, a migração e invasão celular diminui (VAN GOLEN, et al., 2000; ZHANG, et al., 2016).

A expressão deste fator de transcrição NRF2 já foi descrita em tumores de mama de mulheres e os resultados demonstraram maior expressão nuclear nos tumores malignos e relação direta com o aumento da agressividade e estadiamento tumoral (ONODERA, et al., 2014; SIMPLICIO-REVOREDO, et al., 2020). Contudo, até o presente momento, a expressão de NRF2 foi relatada apenas no osteossarcoma canino, com expressão em 100% dos casos e variação de intensidade de marcação em diferentes pacientes (RUTLAND, et al., 2021).

Desta forma, objetivou-se com a realização desse estudo, avaliar a expressão do NRF2 nos tumores mamários espontâneos de cadelas, segregados pelo comportamento biológico e grau de malignidade, sua correlação com fatores prognósticos clássicos (estadiamento clínico, tamanho tumoral e graduação histopatológica), bem como verificar seu potencial como fator prognóstico independente de sobrevida.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS

A alta frequência e as similaridades epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas existentes entre os tumores de mama de mulheres e cadelas, tornaram esta última espécie um modelo comparativo e translacional extremamente interessante para estudos relacionados à biologia tumoral, fatores de risco, indicações terapêuticas, fatores prognósticos e preditivos (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018; GUNDIM, et al., 2016; NGUYEN, et al., 2017).

A faixa etária de maior acometimento entre as cadelas é de 9 a 11 anos, com maior probabilidade de aparecer em idades mais avançadas (CAMPOS; LAVALLE, 2017). Aparentemente, não existe predisposição racial para o acometimento por tumores mamários na espécie canina (CAVALCANTI; CASSALI, 2006; EZERSKYTE, et al., 2011). Contudo, Santos (2020) ao analisar o perfil epidemiológico do câncer de mama em cadelas em Salvador, revelou maior frequência em cães da raça poodle, seguidos dos cães sem raça definida.

A etiologia do câncer de mama é multifatorial sendo correlacionados a fatores genéticos ambientais, nutricionais e hormonais (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, et al. 2004). Dentre os fatores genéticos, mutações e superexpressões de determinados genes podem predispor ao desenvolvimento de tumores mamários em cadelas e estão relacionadas com os diferentes prognósticos da doença, a exemplo das mutações em HER-2, p53, BRCA1 e BRCA2 (FAZEKAS, et. al., 2016; MUNDAY, et al., 2019; THUMSER-HENNER; NYTKO; BLEY, 2020).

Melin e colaboradores (2016) sugeriram que em cães Springer Spaniel inglês o gene CDK5RAP2 pode estar relacionado ao desenvolvimento de neoplasias mamárias por codificar uma proteína com função na regulação do ciclo celular e provável impacto na resposta ao tratamento quimioterápico. O gene ESR1 (receptor de estrógeno 1), também tem sido apontado como responsável pelo desenvolvimento de neoplasias mamárias caninas (BORGE, et al., 2013).

Os principais hormônios que estimulam a proliferação celular e promovem alterações genéticas que resultam em células neoplásicas mamárias em cães e humanos são o estrógeno, progesterona, andrógenos, hormônio do crescimento, hormônios tireoidianos e prolactina (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, et al. 2004; QUEIROGA, et al., 2011; MICHEL et al.,

2012). A progesterona exógena estimula a síntese de hormônio do crescimento nas mamas induzindo a proliferação lóbulo-alveolar e consequente hiperplasia de elementos mioepiteliais, o que resulta na gênese de neoformações de comportamento benigno, principalmente em animais jovens, já o estrógeno estimula o crescimento ductal (MOL, et al., 1997; RUTTEMAN, et al., 2001).

No entanto, o risco de desenvolvimento de câncer de mama é associado a administração contínua e em altas doses de estrógeno associado à progesterona (MORRISON, 1998; RUTTEMAN et al., 2001). O estrógeno auxilia no crescimento celular por estimular a liberação do fator de crescimento tumoral alfa e fator de crescimento semelhante à insulina (NORMAN; LITWACK, 1997). Diante da importante participação dos hormônios esteroides sexuais, especialmente o estrógeno, desempenharem papel fundamental no desenvolvimento dos tumores mamários em cadelas, a supressão hormonal pela ovário-histerectomia (OH) pode ser utilizada como tratamento desta neoplasia (FONSECA; DALECK, 2000).

A castração em cadelas para prevenção de tumores mamários, deve ter uma análise criteriosa do médico veterinário (KUSTRITZ, 2007). Idade, raça e peso, são fatores que podem influenciar na decisão da OH (HART, et al., 2020). As alterações osteoarticulares, como fraturas, displasia coxofemoral, rompimento do ligamento cruzado cranial são algumas das implicações da castração precoce, por isso, o procedimento de gonadectomia é indicado após o fechamento das placas epifisárias, geralmente após a maturidade sexual (BEAUV AIS; CARDWELL; BRODBELT, 2012; HART, et al., 2020; KUSTRITZ, 2007). Incontinência urinária, desenvolvimento de outras neoplasias, como hemangiosarcomas, linfomas, mastocitomas e osteossarcomas também são implicações importantes resultantes da OH antes do primeiro estro. Portanto, atualmente, a recomendação para esterilização em cadelas deve ser realizada entre o primeiro e segundo ciclo estral, quando o objetivo é a prevenção de tumores mamários (CASSALI, et al., 2020).

Quando a ovário-histerectomia é realizada antes do primeiro estro, o risco de desenvolvimento de tumores mamários é de 0,5%, e este risco aumenta significativamente nas fêmeas esterilizadas após o primeiro (8%) e o segundo ciclo estral (26%) (SCHNEIDER et al, 1969). Munson e Moresco (2007) não observaram capacidade protetora da OH com relação às neoplasias mamárias, quando realizada após o terceiro ciclo estral, independente da presença do processo neoplásico. Contudo, Sorenmo e colaboradores (2011) creditaram maior sobrevida

às cadelas submetidas à mastectomia associada à castração ou quando esta é realizada até 24 meses antes da exérese do nódulo primário.

O uso de progestágenos para o controle do estro, pseudociese, obesidade e dietas ricas em gorduras também têm sido citados como fatores de risco associados ao câncer de mama (ALENZA, et al., 2000; CLEARY, et al., 2010; COSTA-SANTOS, et al., 2019; YEON, et al., 2011; ZUCCARI, et al., 2008;). O excesso de tecido adiposo pode afetar o curso da doença por influenciar na secreção de importantes citocinas e hormônios (NICCHIO, et al., 2020).

Lim e colaboradores (2015) avaliaram cadelas com sobre peso e correlacionaram o aumento de peso com o surgimento precoce do câncer de mama, bem como maior proporção de tumores grau III e maior expressão de aromatase e receptores hormonais. Cadelas com carcinoma em tumor misto e sobre peso apresentam hiperresistinemia e maior proliferação celular (NICCHIO, et al., 2020).

As adiponectinas e adipocitocinas também podem estar envolvidas na carcinogênese mamária, dentre elas a leptina e resistina. Esta última possui capacidade de manter a glicemia em jejum e está potencialmente correlacionada com a obesidade e resistência insulínica (KURYSZKO, et al., 2016; SASSEK, et al., 2013). Já a leptina inibe a apoptose e estimula a proliferação celular, enquanto a adiponectina reduz a proliferação celular e promove apoptose (ARTWOHL, et al., 2002; DIEUDONNE, et al., 2006; FUJITA, et al., 2002).

Estes hormônios podem ser produzidos no tecido adiposo, cujas concentrações se alteram mediante o peso corporal, com influência no desenvolvimento e na progressão destas neoplasias, portanto, quando o peso e o índice de massa corporal aumentam, os níveis séricos de leptina aumentam e de adiponectina diminuem (ROSE; KOMNINOU; STEPHENSON, et al., 2004).

Dentre os fatores ambientais, concentrações significativas de inseticidas piretróides, como aletrina, cialotrina, cipermetrina, deltametrina e a tetrametrina, já foram encontradas no tecido adiposo adjacente aos tumores mamários de cadelas, principalmente, nos tumores mais agressivos, sugerindo o possível envolvimento de contaminantes ambientais na carcinogênese mamária (ANDRADE, et al., 2010).

Os tumores de mama em cadelas apresentam-se, na maioria das vezes, como nódulos circunscritos detectáveis clinicamente à inspeção e/ou palpação, com dimensões, consistência

e mobilidade à pele e musculatura variáveis, por vezes associados à ulceração cutânea e reações inflamatórias locais. Frequentemente observam-se múltiplos tumores em uma mesma mama ou envolvendo simultaneamente várias mamas (tumores multicêntricos), os quais podem apresentar diferentes tipos histológicos, no qual o tumor de pior prognóstico determinará a evolução clínica do paciente (CASSALI, et al., 2020; SORENMO, et al., 2011).

As glândulas inguinais e abdominais caudais são os sítios mais frequentes de desenvolvimento tumoral, devido a uma maior quantidade de parênquima mamário, portanto, maior resposta proliferativa à ação de hormônios (MISDORP, 2002). A detecção precoce dos nódulos por avaliação física e uma avaliação clínica detalhada por meio de exames laboratoriais, diagnóstico por imagem e avaliação histopatológica são essenciais para o estabelecimento da conduta terapêutica mais adequada a proporcionar a cura ou a prevenção de recidivas ou metástases (CASSALI, et al., 2020).

O estadiamento é um parâmetro muito importante para definir a abordagem clínica dos tumores malignos. É baseado nas variáveis de tamanho tumoral (T), acometimento de linfonodo regionais (N) e presença de metástase à distância (M), com variação de estadios de I a V (Tabela 1), e quanto maior o estadio pior será o prognóstico (OWEN, 1980).

Via de regra, tumores menores que três centímetros possuem melhor prognóstico em relação a tumores maiores, estes últimos apresentam elevado índice proliferativo e menor expressão para marcadores hormonais (FERREIRA, et al., 2009). A invasão linfática também confere uma menor expectativa de sobrevida global ao paciente (YAMAGAMI, et al., 1996). Araújo e colaboradores (2015) concluíram que quanto maior o número de linfonodos acometidos menor é a sobrevida da paciente. Da mesma forma, que a presença de metástase à distância tem pior prognóstico, quando comparado com cadelas que apresentam apenas os linfonodos regionais acometidos (SORENMO, 2003).

**Tabela 1.** Estadiamento Clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM.

T <sub>1</sub>	< 3 cm de diâmetro
T <sub>2</sub>	3 – 5 cm de diâmetro
T <sub>3</sub>	> 5 cm de diâmetro
<b>N – Linfonodo regional</b>	
N <sub>0</sub>	Sem metástases (histologia ou citologia)
N <sub>1</sub>	Presença de metástase (histologia ou citologia)
<b>M – Metástase a distância</b>	
M <sub>0</sub>	Sem metástases à distância detectadas
M <sub>1</sub>	Metástase a distância detectada
<b>Estadiamento</b>	
I	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
II	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
III	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
IV	Qualquer T N <sub>0-1</sub> M <sub>0</sub>
V	Qualquer T Qualquer NM <sub>1</sub>

Fonte: Adaptado de Owen, (1980), modificado por Cassali, et al., (2020)

O procedimento cirúrgico consiste, ainda hoje, no tratamento de eleição e que confere maior taxa de sobrevida, incluindo a cura desde que seja realizado precocemente (HEDLUND, 2008; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Também está disponível na rotina oncológica veterinária a quimioterapia antineoplásica, que é um método de tratamento neoadjuvante ou adjuvante à cirurgia (BROWDER, et al., 2000; ROSENTHAL, 2004).

Os objetivos da quimioterapia incluem a citorredução do tumor, destruição das micrometástases e consequentemente redução do potencial de recidiva dos tumores mamários (QUEIROGA; LOPES, 2002). Atualmente, para o tratamento de cadelas com tumores de mama submetidas ou não a mastectomia, a droga mais utilizada é a carboplatina no regime convencional (LAVALLE, et al., 2012; MACHADO, et al., 2018) e a ciclofosfamida no regime metronômico, ou seja, utilização do quimioterápico por via oral, em baixas doses diariamente (MACHADO, et al., 2018; MACHADO, et al., 2022; MUTSAERS, 2009).

As classificações dos tumores mamários em cães são elaboradas considerando a origem das células (epitelial, mioepitelial ou mesenquimal), suas características morfológicas e seu prognóstico (MISDORP, et al., 1999). Enquanto a classificação histológica visa analisar a arquitetura e a morfologia do tumor, a graduação apresenta uma correlação significativa com a agressividade tumoral (ELSTON; ELLIS, 1998).

Algumas características são consideradas para estabelecer o grau de diferenciação do tumor, como o índice de formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e índice mitótico, são atribuídos escores de I a III para cada uma das características, no final da análise, os valores são

somados e classifica-se em grau I (3 – 5 pontos), grau II (6 – 7 pontos) e grau III (8 – 9 pontos) (Tabela 2) (CASSALI, et al., 2020).

**Tabela 2.** Resumo do método semiquantitativo para avaliação do grau histológico em carcinomas mamários caninos

<b>Fatores</b>	<b>Escore</b>
<b>Formação tubular</b>	
Maioria no tumor (> 75%)	1
Grau moderado (10 – 75%)	2
Pouco ou nenhum	3
<b>Pleomorfismo nuclear</b>	
Pequeno, células regulares e uniformes	1
Tamanho moderado	2
Marcada variação	3
<b>Contagens mitóticas</b>	
0 – 7	1
8 – 16	2
> 17	3

Fonte: Elston; Ellis, 1998 adaptado por Cassali, et al., 2020

Dentre os tumores mamários malignos, o carcinoma em tumor misto (CMT) é o subtipo mais frequente, representando 40% a 75% das neoplasias mamárias malignas de cadelas (NUNES, et al., 2018; SANTOS, 2020; TORÍBIO, et al., 2012). Os carcinomas em tumores mistos são provenientes da transformação maligna apenas do componente epitelial de tumores mistos benignos, o que difere dos carcinossarcomas, que apresentam malignidade nos componentes epitelial e mesenquimal apresentam pior prognóstico (MISDORP, et al., 1999).

Com relação à sobrevida, cadelas com carcinoma sólido tendem apresentar curso da doença mais agressivo do que cadelas com carcinoma originado em tumor misto benigno, a depender da graduação e estadiamento tumoral (CASSALI, et al., 2020; SEUNG, et al., 2021). Os carcinomas *in situ* e os carcinomas simples apresentam prognóstico mais favorável, enquanto os carcinomas anaplásicos e carcinossarcomas (SORENMO, 2003).

Os fatores prognósticos são definidos como uma ou várias características clínicas, patológicas e biológicas específicas dos indivíduos e de seus tumores que permitem a evolução clínica e o tempo de sobrevida do paciente sem que o mesmo tenha sido submetido a terapias adicionais ou adjuvantes após a cirurgias iniciais (CAVALCANTI; CASSALI, 2006). Por outro lado, os fatores preditivos permitem selecionar pacientes para tratamento específicos e individualizados, e predizer o comportamento dos tumores é especialmente importante para o câncer de mama, devido à variabilidade na progressão clínica da doença (ESTRELA-LIMA, et al., 2012).

Esses marcadores são úteis na rotina oncológica veterinária, pois auxiliam o estadiamento, a resposta ao tratamento, desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas e principalmente o prognóstico (ZUCCARI, et al., 2001). Contudo, devido à diversidade dos tumores de mama a análise com um único marcador molecular não tem demonstrado respostas mais assertivas, sendo necessário um painel imuno-histoquímico para correlacioná-los (PAREJA, et al., 2016).

Dentre eles estão os receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP); o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), também denominado c-erbB-1 ou HER1; o HER-2 (ou c-erbB-2) e as citoqueratinas (CK), como a CK 5/6, cuja expressão em neoplasias mamárias está associada ao comportamento biológico mais agressivo (CHANG, et al., 2009; MOHR, et al., 2016; SASSI, et al., 2010; SPOERRI, et al., 2015), a ciclooxygenase 2 (COX-2) que atualmente é correlacionada com alto grau histológico e menor sobrevida (LAVALLE, et al., 2009; ARAÚJO, et al., 2015; VIEIRA, et al., 2022) e o índice de proliferação celular obtido por marcadores envolvidos no ciclo celular como o Ki-67 (CASSALI, et al., 2020).

O Ki-67 é uma proteína nuclear expressa no ciclo celular nas fases G1, S, G2 e de mitose (KADTHUR, et al., 2011; TERZIAN, et al., 2007). A expressão desse imunomarcador permite uma avaliação mais criteriosa por meio da análise da razão de células em proliferação em relação as células totais (SARLI, et al., 2002). O aumento da expressão deste marcador está relacionado ao grau de diferenciação, classificação histopatológica e comportamento da neoplasia (AMORIM, et al., 2008; MATOS, et al., 2006). Portanto, o índice de proliferação celular, estimado pela análise da expressão da proteína Ki-67, é um fator prognóstico independente para metástases, sobrevida global e tempo livre de doença, assim, quanto maior a expressão, menor a sobrevida da paciente com neoplasia mamária (DUTRA, et al., 2008).

## 2.2 ESTRESSE OXIDATIVO E CÂNCER DE MAMA

O estresse oxidativo é caracterizado pelas lesões celulares advindas do desequilíbrio entre condições pró-oxidantes e antioxidantes das células (MACHADO, et al, 2006). Diversas causas favorecem este desequilíbrio, desde fatores exógenos, como exposição ambiental a oxidantes e ingestão inadequada de antioxidantes, a fatores endógenos, como alterações enzimáticas e processos patológicos (PANDE, et al., 2012). A inflamação contínua, por exemplo, pode levar a um evento pré-neoplásico, pois a secreção de uma grande quantidade de

espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ROS/RNS) recrutam células imunes mais ativadas, o que leva à amplificação de processos desregulados (GUINA, et al., 2015).

Se a produção de ROS/RNS celular for alta o suficiente para superar a resposta antioxidante endógena, danos oxidativos irreversíveis a ácidos nucleicos, lipídios e proteínas podem causar alterações genéticas e/ou epigenéticas com desregulação de oncogenes e genes supressores tumorais. Portanto, o estresse oxidativo e os processos de inflamação crônica relacionam-se entre si e a falha no bloqueio desses processos resulta em modificações genéticas ou epigenéticas responsáveis pela carcinogênese (MURATA, et al., 2012).

O aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), o alto estresse oxidativo e o dano ao DNA desempenham um papel importante na gênese do câncer (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2010). No câncer de mama da mulher, os mecanismos de estresse oxidativo estão envolvidos na ativação das vias de sinalização celular, proliferação, apoptose, migração celulares fatores pró-angiogênicos que podem impactar tanto na progressão quanto no potencial de malignidade do tumor (DAIRKEE, et al., 2007).

Durante o processo de carcinogênese, os níveis de espécies reativas de oxigênio nas células neoplásicas aumentam e os níveis de antioxidantes diminuem. As ROS em excesso nessas células resultam em mutações genéticas de indução e alterações nos processos de transcrição, bem como alterações nas vias de sinalização e, finalmente, a ocorrência de câncer (GAO, et al., 2004; HWANG, et al., 2007).

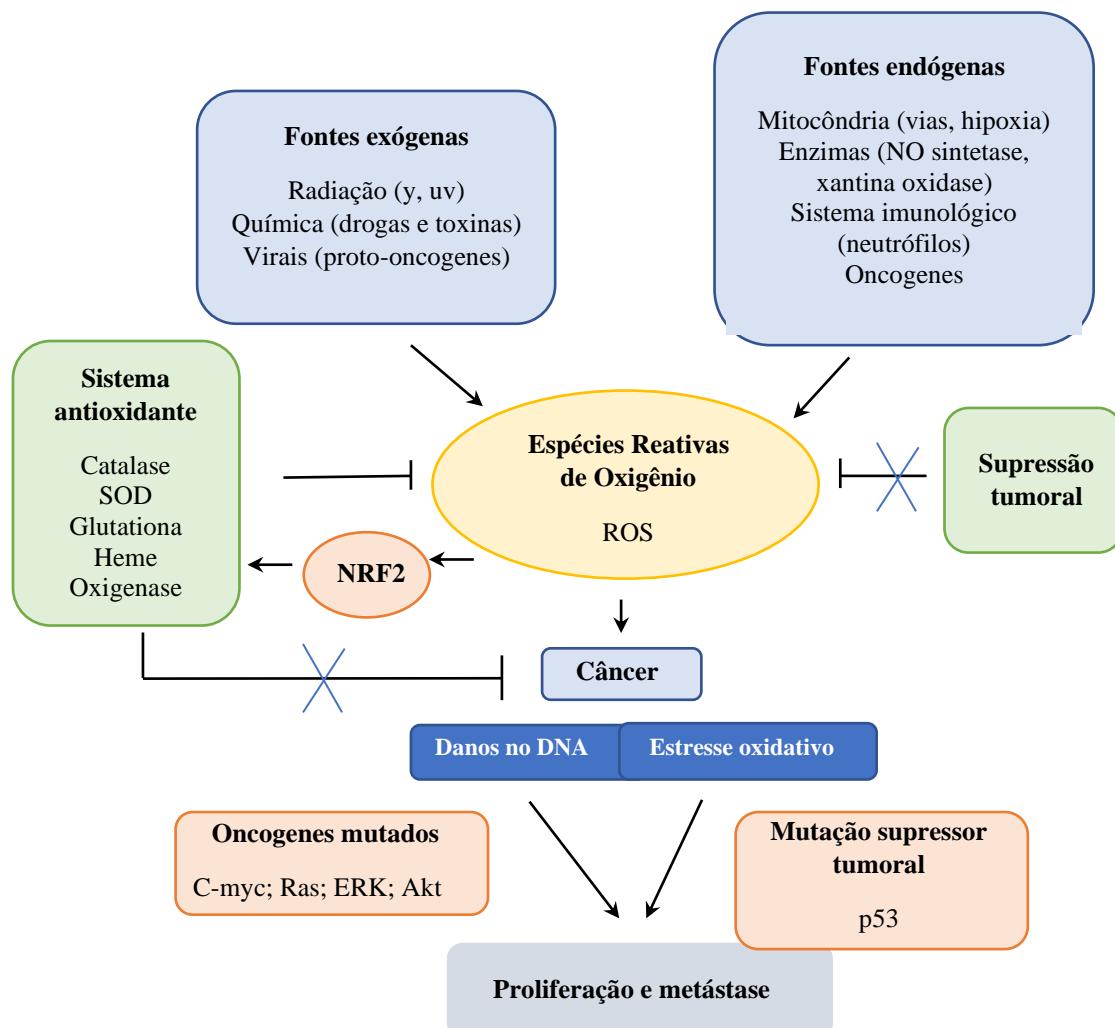
O estresse oxidativo afeta várias vias de sinalização associadas à proliferação celular (SOLIMAN, et al., 2014). Dentre elas, pode-se citar a via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico, na qual estão envolvidas proteínas como o NRF2 e Maf. Além disso, as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K), fosfolipase C, proteína quinase C e a expressão do gene supressor p53, relacionado diretamente ao processo de apoptose (Figura 1) (NOURAZARIAN; KANGARI; SALMANINEJAD, 2014).

Nessas situações, pode ocorrer importante dano oxidativo a lipídios, proteínas ou diretamente ao DNA (MAYNE, 2003). Karihtala e colaboradores (2006) avaliaram a associação entre o estresse oxidativo e a carcinogênese mamária, por meio da expressão de marcadores de 4-hidroxinonenal (4-HNE), 3-nitrotirosina (3-NITRO) e 8-hidroxideoguanosina (8-OHdG) em diferentes tipos histológicos e de estadiamento de tumores de mama da mulher

e concluíram que na progressão da carcinogênese mamária há aumento de dano oxidativo tanto nos lipídeos, proteína e DNA nos tumores mais agressivos. Em outro estudo foi observado menor expressão de 8-OHdG em tumores invasivos e aumento na peroxidação lipídica durante a carcinogênese observado pelo 4-HNE (KARIHTALA, et al., 2011).

Nesta linha, o NRF2 é regulador mestre, que protege as células do estresse oxidativo com o objetivo de regular a expressão de vários genes para codificar enzimas antioxidantes, fatores desintoxicantes, proteínas antiapoptóticas e transportadores de drogas. Portanto, devido à interação das vias de sinalização de ROS e NRF2 com a carcinogênese, a modulação de NRF2 parece ser importante na terapia do câncer (SAJADIMAJD; KHAZAEI, 2018).

**Figura 1.** Representação esquemática do desequilíbrio de ROS e inibição da apoptose celular. A superprodução de ROS e a incapacidade de combater o aumento do estresse oxidativo podem causar câncer. Células neoplásicas, com fatores defeituosos, promovem carcinogênese em resposta ao estresse oxidativo.



Fonte: Adaptado de Sajadimajd; Khazei, (2018). SOD: Superóxido dismutase. ROS: Espécies Reativas de oxigênio. NRF2: Fator de transcrição nuclear relacionado ao eritroide 2. NO: Óxido nítrico.

### 2.3 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR RELACIONADO AO FATOR ERITROIDE 2 (NRF2)

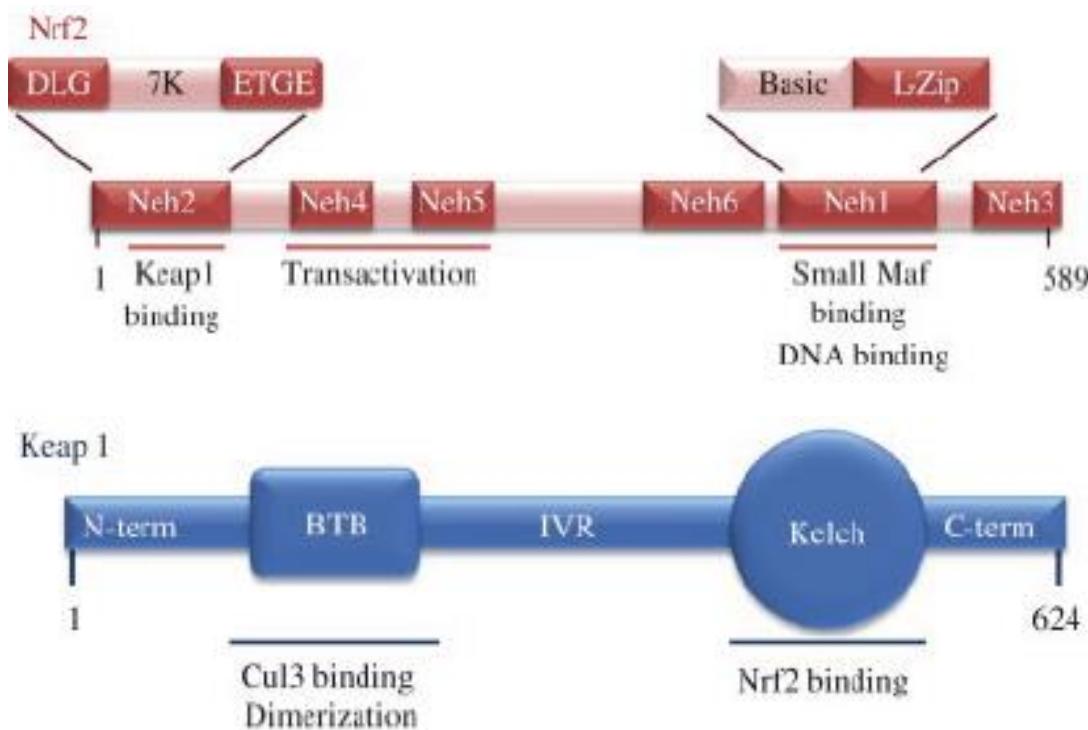
O NRF2 é um importante fator regulador para a manutenção do equilíbrio do estresse oxidativo em condições fisiológicas (WAKABAYASHI et al., 2010) e está amplamente difundido nos órgãos. Esse fator é responsável pela regulação de algumas enzimas metabolizadoras de fase II e genes antioxidantes que contêm elementos de resposta antioxidante na região promotora, como NAD(P)H quinona oxidorredutase 1 (NQO1), glutationa S-transferases (GSTs), heme oxigenase-1 (HO-1) e outros genes que regulam a resposta ao estresse oxidativo (TAGUCHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2011).

Moi e colaboradores (1994) caracterizaram o NRF2 com base em sua capacidade de se ligar à repetição NFE2/AP-1 no promotor do gene da beta-globina. E assim como o fator nuclear eritroide derivado 2 (NF-E2), o NRF2 também é membro da subfamília cap n' colar (CNC) de fatores de transcrição, contém um domínio básico de ligação ao DNA de zíper de leucina no terminal C e consiste em 589 aminoácidos com sete domínios altamente conservados, Neh1-7 (Figura 2) (KANSANEN; JYRKKÄNEN; LEVONEN, 2012; TAGUCHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2011).

Neh1 é responsável pelo reconhecimento do DNA e medeia a dimerização com outros fatores de transcrição como pequenas proteínas Maf (ITOH, et al., 1999). Neh2 é necessário para a interação com KEAP1 e possui uma região hidrofílica dos sete resíduos de lisina, que são indispensáveis para poliubiquitinação e degradação de NRF2 dependente de KEAP1 (Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch) (ZHANG, et al, 2004; ITOH, et al., 1999). O Neh3 é necessário para ativação transcricional por meio do recrutamento de um coativador, CHD6; no entanto, poucos são os estudos o sobre o papel específico desse coativador (NIOI, et al., 2005).

O Neh4 e Neh5 são dois domínios de transativação independentes que atuam sinergicamente e interagem com a proteína de ligação a CREB (CBP). O domínio Neh6 é fortemente concentrado com resíduos de serina e é responsável pela degradação de NRF2 no núcleo, entretanto, também não se sabe muito sobre o seu papel (KATOH, et al., 2001; LAU, et al., 2008). Por fim, o domínio Neh7, responsável pela interação de inibidores do NRF2, como o receptor retinóico X alfa (RXR $\alpha$ ) (Figura 2) (WANG, et al., 2013).

**Figura 2.** Domínios proteicos do NRF2 e KEAP1



Fonte: KANSANEN, et al., 2013

Sob condições fisiológicas, em humanos, o NRF2, localiza-se no citoplasma em níveis muito baixos, onde está ligado à proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (KEAP1) (ITOH, et al., 1999). A proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch forma um complexo com Culina 3 (Cul3) e *Ring Box proteína 1* (Rbx1), e esse complexo de ubiquitina ligase E3 pode se ligar e ubiquitinar NRF2, resultando em degradação proteassômica de NRF2. Quando sob estresse oxidativo, o NRF2, se desliga da KEAP1, e estabilizado, acumula-se nos núcleos e forma heterodímeros com pequenas proteínas Maf e ativa genes-alvo para citoproteção através do elemento de resposta antioxidante (ARE) (DINKOVA-KOSTOVA, et al., 2002; PANDEY et al., 2017).

A KEAP1 é constituída de três domínios principais, o BTB responsável pela homodimerização de KEAP1 e associação com a Cul3. O domínio IVR que contém resíduos de cisteína críticos e conecta o domínio BTB com o domínio C terminal (CTR) Kelch/DGR e o domínio Kelch/DGR responsável pela ligação com o domínio Neh2 de NRF2, além de uma região amino-terminal (NTR) (Figura 2) (JARAMILLO; ZHANG, 2013). É uma proteína muito rica em cisteína, em camundongos por exemplo, possui um total de 25 cisteínas enquanto a de humanos 27 resíduos, porém em cães gatos não existem estudos da sua composição

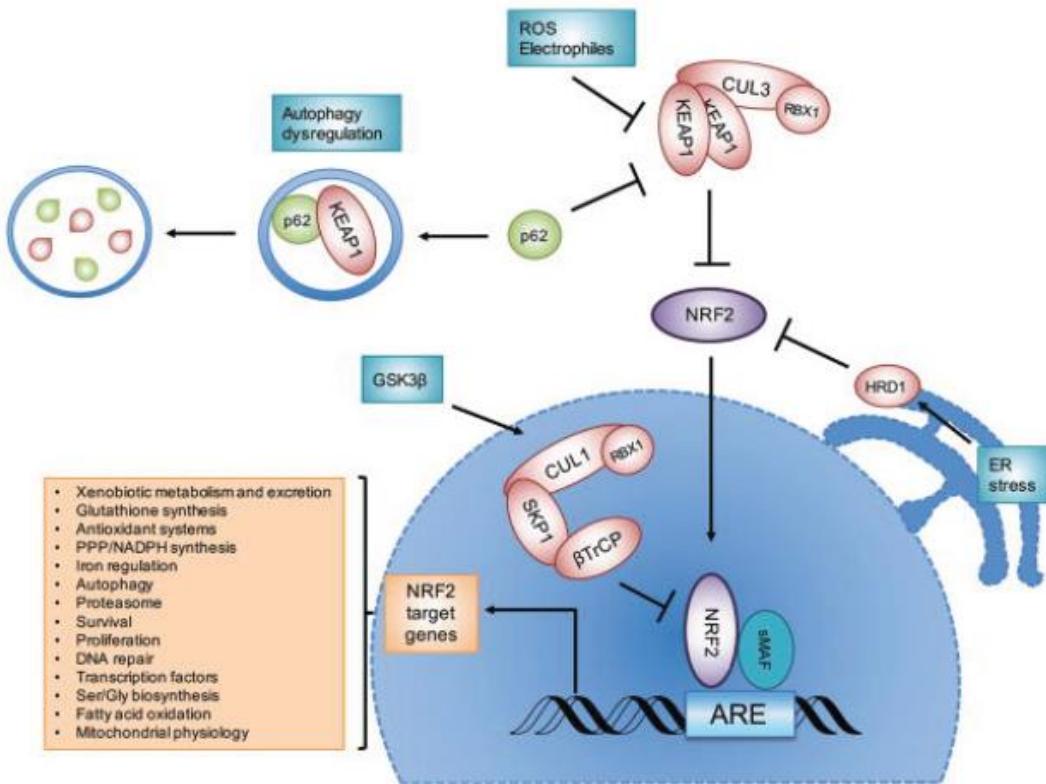
(KANSANEN; KIVELÄÄ; LEVONEN, 2009). Três desses resíduos de cisteínas, C151, C273 e C288, são responsáveis por alterar a conformação de KEAP1, levando à translocação nuclear de NRF2 e subsequente expressão do gene alvo. As Cys273 e Cys288 são necessários para a supressão de NRF2 e Cys151 para ativação de NRF2 por indutores (TAGUCHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2011).

A regulação de NRF2 dependente de KEAP1 na célula pode acontecer por duas vias: a via canônica, dependente da interação dessas cisteínas (BAIRD, et al., 2013; DINKOVA-KOSTOVA, et al., 2002) e a via não canônica que necessita do gene p62, regulador da autofagia (Figura 3) (KOMATSU, et al., 2010; LAU, et al., 2010). Nesta última via, o p62 associa-se a KEAP1 após a fosforilação de um resíduo de serina de sua composição, que se assemelha ao tetrapeptídeo ETGE, assim compete a ligação da KEAP1 com NRF2, o que gera acúmulo deste fator de transcrição (ICHIMURA, et al., 2013; KOMATSU, et al., 2010; LAU, et al., 2010).

Na via canônica as cisteínas da KEAP1, principalmente a C151, localizadas próximas a resíduos básicos, são excelentes alvos de oxidantes, o que confere um padrão de modificação desses resíduos de cisteína. Isso ocorre pela ação de agentes ativadores de NRF2, estruturalmente diferentes que podem afetar quaisquer cisteínas da KEAP1. As modificações dessas cisteínas levam a mudanças conformacionais no KEAP1, o que interrompe a interação entre os domínios NRF2 DLG e KEAP1 Kelch, inibindo assim a poliubiquitinação do NRF2 (KANSANEN; JYRKÄNEN; LEVONEN, 2012).

Existe dois modelos que tentam justificar os mecanismos pelo qual as modificações de cisteína em KEAP1 levam à ativação de NRF2 (TAGUCHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2011). As modificações de KEAP1 nos resíduos de tiol, que residem no IVR de KEAP1, podem interromper a interação com NRF2 causando um desalinhamento dos resíduos de lisina dentro de NRF2, que não podem mais ser poliubiquitinilados, ou essa alteração resulta na imediata dissociação de Cul3 de KEAP1 (TAGUCHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2011).

**Figura 3.** Vias de Sinalização de NRF2



Em ambos os modelos, o KEAP1 modificado por indutor e ligado a NRF2 é inativado e, consequentemente, proteínas NRF2 recém sintetizadas contornam KEAP1 translocam-se ao núcleo e se ligam ao ARE para conduzir a expressão de genes alvo de NRF2 (Figura 3). Após o fim do estresse oxidativo, há a translocação nuclear de KEAP1, por meio de proteínas de importação nuclear, que se liga ao NRF2, com a finalidade de levá-lo ao citoplasma para ser degradado pelo proteassoma 26s (ITOH, et al., 2003; SUN, 2011).

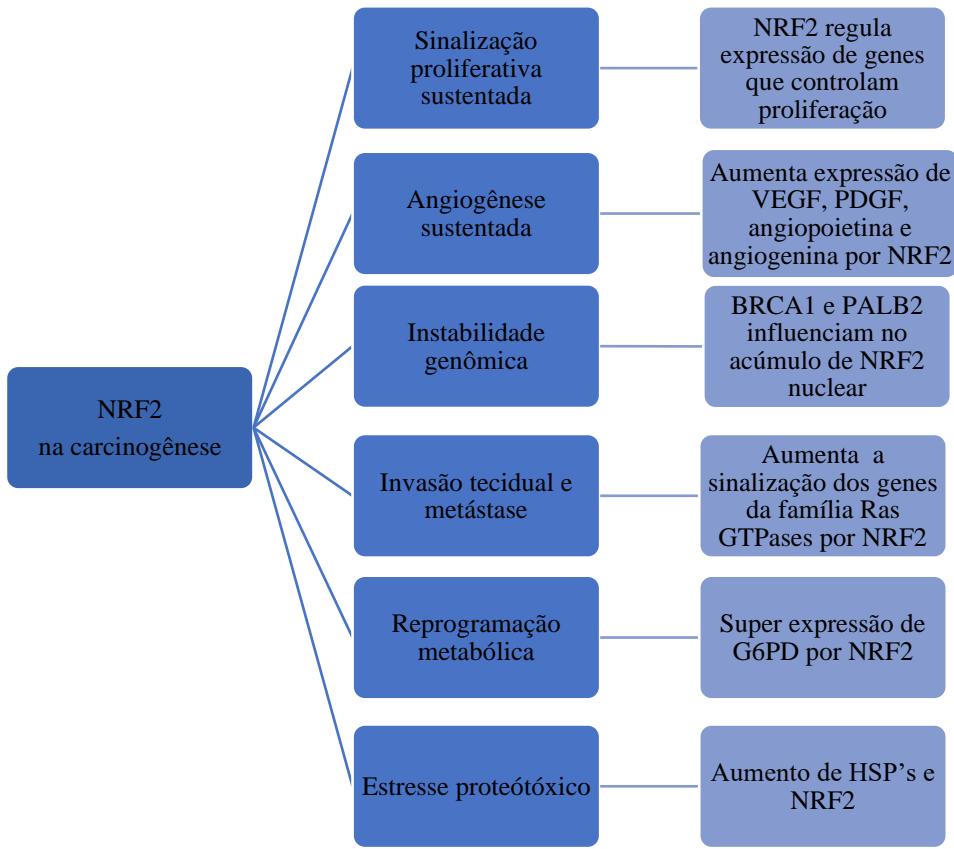
Contudo, existem outras vias que regulam o NRF2 independente de KEAP1, como a via dependente de β-TrCP que se liga ao complexo de ligase de ubiquitina SKP1-CUL1-RBX1 E3 e leva a degradação de NRF2 (Figura 3) (CHOWDHRY, et al., 2013) e a via dependente de proteína sinoviolina (HRD1), que sob estresse oxidativo, interage com os domínios Neh4-5 de NRF2 e medeia a degradação de NRF2 para evitar seu acúmulo nuclear (Figura 3) (WU, et al., 2014).

As células neoplásicas possuem altas taxas de NRF2 devido ao alto estresse oxidativo que lhe é proporcionado (LEINONEN, et al., 2015; OHTA, et al., 2008). Contudo, sabe-se que o NRF2 demonstra dois efeitos na carcinogênese: supressão tumoral e promoção tumoral. O

NRF2 previne a carcinogênese e garante rápida modificação enzimática, excreção de carcinógenos químicos e elimina ROS ou repara danos oxidativos por meio da expressão de seus genes alvo (DE LA VEGA; CHAPMAN; ZHANG, 2018). Portanto, a ativação temporária de NRF2 poderia proteger as células normais de toxinas ou carcinógenos, mas a ativação sustentada de NRF2 aumenta a expressão de genes, o que proporciona um ambiente propício para células neoplásicas e facilita a progressão do câncer (LAU, et al, 2008).

Na promoção da carcinogênese, o NRF2 tem diversos papéis, tais como a sinalização proliferativa sustentada (Figura 4), pois regula a expressão basal e induzível de genes que controlam a proliferação, como proteína homóloga de entalhe do locus neurogênico 1 (NOTCH1), nefronectina (NPNT), receptor 1 A de proteína morfogenética óssea (BMPR1A), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1), dubunidade Beta 2 integrina (ITGB2), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFC), fator de crescimento endotelial vascular C(VEGFC) e o ligante Notch 1 canônico irregular (JAG1) (WAKABAYASHI, et al., 2010). Já a sua supressão reduz a proliferação e está associado à expressão reduzida de Ki67 (MURAKAMIE; MOTOHASHI, 2015). A resistência a apoptose também é uma característica importante relacionada ao aumento de NRF2 e proliferação tumoral. As células cancerígenas ativam a sinalização NRF2 em resposta à radioterapia e alguns quimioterápicos que geram ROS (WANG, et al., 2006), tornando-as intrinsecamente resistentes à apoptose.

**Figura 4.** Representação esquemática das funções de NRF2 na carcinogênese.



A angiogênese é um fator que está relacionado também ao NRF2, já que a supressão de NRF2 reduz a formação de vasos sanguíneos, com subsequente redução do crescimento tumoral, em modelos de xenoenxerto (LI, et al., 2016). Assim, essa supressão de NRF2 reduz os níveis de proteína HIF-1 $\alpha$  (fator de hipóxia tumoral 1 alfa) e, consequentemente, a expressão de VEGF, PDGF, angiopoietina e angiogenina (Figura 4).

A instabilidade genômica é influenciada pelo NRF2, já que o gene BRCA1 regula ROS ligando-se a NRF2 para prevenir sua degradação dependente de KEAP1, permite a transcrição de genes antioxidantes (Figura 4) (BAE, et al., 2004). Assim, o silenciamento de BRCA1 aumenta a suscetibilidade de inúmeras linhagens celulares ao estresse oxidativo, que se correlaciona com a redução da expressão basal ou induzida de genes antioxidantes regulados por NRF2 (GORRINI et al., 2013). Além disso, as linhas celulares de câncer mutantes BRCA1 têm ROS mais altas, sugerindo que as proteínas mutantes podem não interagir com NRF2 (GORRINI, et al., 2013).

Outra proteína envolvida no núcleo da célula, a PALB2 (parceiro e localizador do BRCA2) que se liga à KEAP1 através de um tetrapeptídeo ETGE, promove o acúmulo nuclear de NRF2 e atividade transcrecional, o que evita sua exportação nuclear mediada por KEAP1,

logo mutação nestas proteínas e genes, induzem a neoplasias geralmente de mama, e aumento de NRF2 (MA, et al., 2012).

Outras características que influenciam na carcinogênese são invasão tecidual e metástase, estresse proteotóxico e reprogramação metabólica (Figura 4) (DE LA VEGA; CHAPMAN; ZHANG, 2018). Experimentos *in vitro* com células de câncer de mama, relatam que NRF2 promove a proliferação de metástase, pois aumenta a transdução de sinais da via de sinalização dos genes da família Ras GTPases, mais especificamente a Rhoa, que é fundamental na regulação da motilidade celular e invasão celular. Quando há inibição de NRF2 diminui a migração e invasão celular (VAN GOLEN, et al., 2000; ZHANG, et al., 2016).

Este fator de transcrição também pode levar ao aumento da proliferação, migração e invasão das células de câncer de mama, por meio da via das pentoses. A superexpressão de NRF2, aumenta a expressão de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), fator de indutor de hipóxia 1 $\alpha$  em linhagens celulares de câncer de mama MCF7 e MDA-MB23, o que favorece a migração e proliferação tumoral, já o seu silenciamento suprime o desenvolvimento do câncer de mama (ZHANG, et al., 2019).

No entanto, em adenomas polimórficos de glândula salivar, já foi descrito o aumento de NRF2, peroxirredoxina-I (PRX-1) e diminuição de metaloproteinases 2 (MMP-2) no microambiente tumoral hipóxico, o que pode sugerir que a ativação de NRF2 mediada por ROS e regulação positiva de PRX-1 nas células neoplásicas podem fornecer proteção antioxidante em tumores com microambiente de oxigenação instável sem interferir no estado de malignidade, metástase ou invasão celular (BROD, et al., 2017). Esta relação diretamente proporcional de hipóxia, PRX-1 e NRF2 também já foi avaliada por KIM e colaboradores (2007), o que ratifica a participação do eixo NRF2/HO-1 nas vias moleculares que contribuem para o comportamento biológico das neoplasias.

No carcinoma mucoepidermoide pulmonar em humanos, tumor pulmonar raro e de bom prognóstico, foi descrito a correlação positiva entre a expressão de NRF2 e microRNAs (mirRNAs) supressores de tumor, como miR-181a, miR-193b e miR-424 e negativa com miR-378 onco-gênica, assim como acontece em superexpressões de genes codificadores de heme-oxigenase 1(HMOX1). O que fez sugerir que HO-1 poderia ser um importante mediador da ação NRF2 como supressor de tumor desta neoplasia pulmonar (TERTIL, et al., 2015).

Em tumores recorrentes a sinalização de NRF2 induz uma reprogramação metabólica transcripcional, para restabelecer a síntese de novo nucleotídeos, o estado metabólico

impulsionado pelo fator de transcrição, torna as células neoplásicas mais sensíveis a inibição da glutaminase (FOX, et al., 2020). Wu e colaboradores (2015) relataram que nas linhagens de células de câncer de mama a expressão de NRF2 estava maior quando comparada com células aderentes correspondentes, já em linhagens celulares de câncer de mama MCF7 e MDA-MB23 a resposta protetora celular mediada por NRF2 é significativamente elevada, o que sugere maior quimioresistência.

O NRF2 influencia no potencial de replicação celular tornando-o ilimitado, evita danos no DNA, e diminui o número de células senescentes. Semelhantemente ao que ocorre nas células neoplásicas senescentes, que quando não podem ser eliminadas pelo sistema imunológico resulta na regressão do tumor, permanecem metabolicamente ativas e liberam citocinas pró-inflamatórias e fatores de remodelação tecidual que podem estimular a progressão do tumor (COLLADO; SERRANO, 2010).

Outra influência do fator de transcrição NRF2 na carcinogênese encontra-se na promoção do estresse proteotóxico das células (Figura 4). A homeostase proteica, ou proteostase é alcançada e garante tradução, dobramento, localização e degradação adequada das proteínas (MOSSER; MORIMOTO, 2004). Entretanto, as células neoplásicas apresentam produção excessiva de proteínas resultante de alterações epigenéticas, fusão ou amplificação gênica e aumento das taxas metabólicas (DONNELLY; STORCHOVA, 2015).

Além disso, a instabilidade genômica aumenta as chances de geração de proteínas mutadas e um ambiente redox alterado causa dobramento incorreto de proteínas, e aumenta o estresse proteotóxico nas células tumorais (KIMMELMAN; WHITE, 2017). Para isso, com a finalidade de inibir o estresse proteotóxico, existem as proteínas de choque térmico (HSPs) que auxiliam no dobramento de proteínas, sistemas de degradação, como o sistema de proteassoma de ubiquitina (UPS) e a autofagia (BUKAU, et al., 2006), e não surpreendentemente, NRF2 exerce influência em todos esses três alvos inibitórios.

As proteínas de choque térmico podem ativar NRF2 para manter a homeostase redox e a integridade mitocondrial (DAYALAN NAIDU, et al., 2015), enquanto o sistema UPS é regulado fortemente nas células cancerígenas, pelo NRF2, pois este fator de transcrição expressa e induz genes de múltiplas subunidades do proteassoma (KWAK, et al., 2003; ARLT, et al., 2009). Já a influência do NRF2 na autofagia reside na importância da própria célula neoplásica de lidar com o estresse oxidativo, proteotóxico e metabólico celular, pois leva a

expressão de genes relacionados a autofagia pelo NRF2 com o objetivo de controlar essas alterações (PAJARES, et al., 2016).

A expressão do NRF2 pode ser tanto citoplasmática quanto nuclear, com variação na intensidade da marcação representada pelo método H-score. A expressão citoplasmática de NRF2 com intensidades de marcações maiores de acordo com o grau de malignidade de lesões gástricas benignas e malignas já foram identificadas (WANG, et al., 2011). Em carcinomas ovarianos de mulheres, Cho e colaboradores (2017) observaram maior expressão citoplasmática (95%) em contraste a nenhuma marcação nuclear de NRF2. Neste mesmo estudo, foi avaliada a expressão de Keap 1 e correlações significativas e positivas foram observadas entre as intensidades de expressão citoplasmática de NRF2 e KEAP1, representadas por marcação citoplasmática variável para NRF2 e intensa para KEAP1

Apesar de permanecerem desconhecidos, os mecanismos de regulação da localização subcelular do NRF2 (núcleo ou citoplasma) são diversos. Sabe-se, que além da via KEAP1-NRF2, sinais de localização (NLSs), exportação nuclear (NESs), importinas, exportinas e alguns genes, como o p53, podem ser responsáveis também por essa translocação (WANG, et al., 2009; LI; KHONG, 2009; FARAOONIO, et al. 2006). O transporte núcleo-citoplasmático de proteínas, dentre elas os fatores de transcrição, é realizado por meio de importinas e exportinas, que através do complexo de poros nucleares (NPC), reconhecem os NLS ou NES e facilitam seu transporte (GÖRLICH; KUTAY, 1999; JANS; HÜBNER, 1996). Estes sinais, que podem ser insensíveis ao estresse oxidativo, já foram descritos na composição de NRF2 (LI, et al., 2005; THEODORE, et al., 2008).

A região cromossômica da carioferina de manutenção 1 (CRM1) é o principal receptor para a exportação de proteínas nucleares clássicas (DONG, et al., 2009; FORNEROD; OHNO; YOSHIDA, 1997). Também chamada de exportina 1, tem seu destaque no câncer de mama tripla negativa em mulheres, pois sua inibição pode suprimir a via do fator nuclear kappa B (NF-κB), pelo acúmulo de seu inibidor IκBα (GAO, et al., 2021). O gene PSMD4 influencia no aumento de CRM1, e consequentemente, leva a maior expressão de NRF2 citoplasmático, resultando em tumores de maior agressividade (LIN, et al., 206). O CRM1 irá se ligar no NES do NRF2 e facilitar a sua exportação, entretanto, quando inativado facilita o acúmulo nuclear de NRF2 e a ativação transcripcional de genes controlados por ele, como o gene p53 (LI, et al., 2005; WANG, et al., 2009).

Apesar do gene p53 e o NRF2 possuírem funções semelhantes, como estimulação de genes que contribuem para a proteção contra o estresse oxidativo diretamente, síntese de glutationa e auxilia na produção de NADPH, eles podem se correlacionar negativamente (ROTBALAT; MELINO; KNIGHT, 2012). Já foi descrito, que o gene p21, gene alvo do p53, possui capacidade de influenciar na interação do Keap 1 com NRF2, inibindo a ubiquitinação e degradação de NRF2, assim como o alvo NFR2, NQO1, interage com p53 e o protege da degradação. Entretanto, outro gene alvo do NRF2, MDM2, pode promover a ubiquitinação do p53 e a sua degradação pelo proteassoma (CHEN, et al., 2009; ROTBLAT; MELINO; KNIGHT, 2012). A coexistência de NRF2 e p53 reside também em danos oxidativos ao DNA, pois p53 inibe a transcrição de genes antioxidantes transcritos por NRF2 para resultar na apoptose celular induzida por ROS (FARAONIO, et al., 2006).

Soini e colaboradores (2014) encontraram menor expressão citoplasmática e maior expressão nuclear de NRF2 em tumores pancreáticos humanos mais agressivos (estadio IV). Assim a positividade nuclear em tumores de pâncreas foi associada a pior prognóstico do paciente. A expressão de NRF2 também é relacionada a resistência quimioterápica a base de cisplatina em tumores primários de pulmão, conforme observaram Chen e colaboradores (2020). Estes autores encontraram que a expressão citoplasmática positiva e nuclear negativa, são resultado de mutações em KEAP1 e NRF2 e significa uma resposta desfavorável a quimioterapia com cisplatina. A quimioresistência, se dá, pois, a atividade constitutiva de NRF2 protege também as células neoplásicas do estresse oxidativo, principalmente, dos quimioterápicos, visto que esses medicamentos estimulam o aumento de ROS com consequência ativação de genes, e modificações epigenéticas, que auxiliam na transcrição de NRF2 (KANG; HYUN, 2017; ZHONG, et al., 2013).

Em estudo recente foi avaliada a expressão do fator de transcrição NRF2 no câncer de mama e fibroadenoma de 66 mulheres, e encontraram como resultados que a porcentagem de núcleos marcados para NRF2 foram significativamente maiores no grupo de mulheres com câncer de mama que no grupo fibroadenoma, e em maior quantidade nos tumores mais agressivos (SIMPLICIO-REVOREDO, et al., 2020). Onodera e colaboradores (2014), imunolocalizaram o NRF2 em 106 casos de câncer de mama e encontraram maior expressão nuclear. A marcação de NRF2 teve associação positiva com o grau histológico, expressão KI-67, imunorreatividade com p62 e NAD (P) H:quinona oxidorredutase 1 (NQO1), além de relacionar-se com o estadiamento tumoral.

Em cães, a expressão de NRF2, até o momento só foi relatada em osteossarcomas, com expressão em 100% dos casos, porém houve variação na intensidade da marcação entre os diferentes pacientes. E por meio da quantificação da marcação imuno-histoquímica (H-score) de NRF2 nessas amostras os autores sugeriram que o este fator de transcrição tem potencial tanto como marcador prognóstico quanto como alvo terapêutico (RUTLAND, et al., 2021).

### **3. HIPÓTESE**

A expressão do NRF2 é um fator prognóstico independente nos tumores mamários malignos da cadela, apresentando correlação positiva com índice de proliferação celular e negativa com a taxa de sobrevida.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a expressão de NRF2 nos tumores mamários de cadelas e sua possível correlação com progressão tumoral, fatores prognósticos e sobrevida.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar a imunoexpressão do marcador de NRF2 nas células de tumores mamários de cadelas;
- Avaliar a expressão do marcador de proliferação Ki-67 em relação a expressão do NRF2 nos diferentes grupos;
- Verificar possíveis correlações entre a expressão do NRF2, estadiamento clínico, tamanho tumoral, tipo histológico, graduação histopatológica e proliferação celular (Ki-67);
- Avaliar a influência da expressão de NRF2 na taxa de sobrevida de cadelas com tumores mama;
- Verificar o potencial do NRF2 como fator prognóstico independente nos tumores mamários da cadela.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ASPECTOS ÉTICOS E FINANCIAMENTO

Esse projeto foi submetido a avaliação do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), e aprovado sob a certificação de número 61/2022. (ANEXO 1).

### 5.2 LOCAIS DE EXECUÇÃO DA PESQUISA

Foram utilizadas as bases físicas e a infraestrutura do Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Rodemburg de Medeiros Neto da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (HOSPMEV/EMEVZ-UFBA) e do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) do Instituto Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz-Bahia (IGM/FIOCRUZ-BA).

### 5.3 AMOSTRAS

Foram avaliados no total 150 laudos histopatológicos com diagnóstico de neoplasias mamárias proveniente de cadelas, de diversas raças e idades, assistidas pelo Núcleo de Pesquisa em Oncologia Mamária na Universidade Federal da Bahia, Brasil, cujas amostras foram enviadas ao Laboratório de Patologia Veterinária do HOSPMEV-UFBA e a um Laboratório Particular da cidade de Salvador, Bahia, no período de 2018 a 2022. Deste total foram selecionados 38 casos de tumores mamários, para compor o grupo experimental, recrutados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

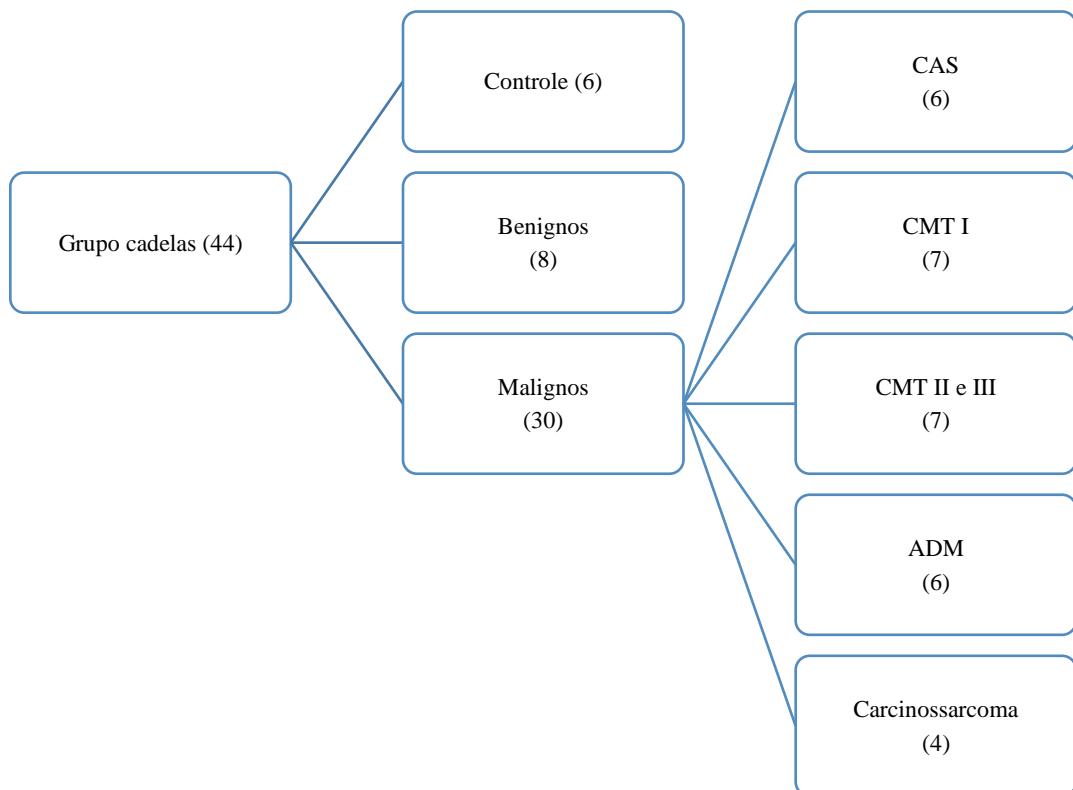
Os critérios de inclusão adotados foram: material proveniente de mastectomia; no caso de tumores múltiplos foi considerado o de pior prognóstico (maior graduação e tipo histológico mais agressivo); fichas contendo preenchimento de pelo menos 50% das características clínico-patológicas e casos com material de reserva suficiente para reprocessamento histológico e análise imuno-histoquímica. Para os carcinomas simples, os critérios foram incluídos apenas carcinomas papilares e tubulares. Já os critérios de exclusão foram: diagnósticos diferentes no mesmo fragmento de nódulo mamário, mastites associadas, presença de outras neoplasias concomitantes com o tumor de mama na paciente e animal ter sido submetido a práticas integrativas (ozonioterapia ou cannabis medicinal) ou quimioterapia anterior a mastectomia.

O tempo de sobrevida global, expresso em dias, foi definido como o tempo entre a excisão cirúrgica do tumor primário e a data da morte ou fim desse estudo. A taxa de sobrevivência foi

classificada como baixa quando os valores de sobrevivência foram  $\leq 365$  dias e alta quando os valores de sobrevivência foram  $> 365$  dias (NICCHIO, et al., 2020)

O grupo controle foi composto por seis amostras de parênquima mamário obtidas de cadelas sem histórico prévio de patologias mamárias, que evoluíram ao óbito e deram entrada no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) do HOSPMEV-UFBA. Desta forma, no total o estudo foi composto por 44 casos divididos em três grupos: grupo controle compostos por amostras de parênquima mamário sem alterações histológicas ( $n=6$ ); grupo de tumores benignos constituído por tumor misto benigno  $n=(5)$ , adenomas simples ( $n=2$ ) e adenomioepitelioma ( $n=1$ ) ; grupo de tumores malignos constituído pelos carcinomas simples ( $n=6$ ), carcinomas em tumores mistos ( $n=14$ ), subdividido em grau I ( $n=7$ ) e grau II e III ( $n=7$ ), adenomioepiteliomas malignos ( $n=6$ ) e carcinossarcomas ( $n=4$ ) (Figura 5).

**Figura 5.** Organograma dos grupos experimentais divididos de acordo com o comportamento biológico/graduação da neoplasia.



CAS: Carcinoma simples; CMT: Carcinoma em tumor misto; ADM: Adenomioepitelioma maligno.

#### 5.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As secções histológicas das 6 amostras de glândulas mamárias sem alterações e dos 38 casos selecionados contendo nódulo mamário, incluindo pele, tecido subcutâneo e linfonodos regionais, foram reavaliadas em microscopia óptica. Sempre que necessário foi realizado o

reprocessamento histológico das amostras reservas, pela técnica rotineira de inclusão em parafina (PROPHET, et al., 1992). Concluída a etapa de processamento da amostra, os cortes histológicos de 4 $\mu$ m foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (H.E) e analisados em microscópio óptico convencional. A revisão dos casos foi realizada por dois patologistas veterinários de forma individualizada, sem o conhecimento do diagnóstico anterior e a classificação histopatológica utilizada seguiu os critérios propostos por Goldschmidt, Peña e Zappulli (2011) e CASSALI, et al., (2020).

Para a graduação histopatológica foi utilizado o grau histológico de *Nottingham* (ELSTON; ELLIS, 1998), que inclui: percentual de diferenciação tubular, avaliação do pleomorfismo nuclear e índice mitótico. Foram utilizadas as áreas de invasividade dos CMTs para classificá-los em Grau I, Grau II e Grau III, em dez campos de maior aumento. Apenas os casos com diagnóstico e graduação confirmados pelos dois avaliadores foram inseridos no estudo.

## 5.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Após a revisão dos casos, secções histológicas de 4  $\mu$ m em lâminas silanizadas (StarFrost) das 44 amostras foram coradas pela técnica de imuno-histoquímica. Os anticorpos primários previstos estão descritos no Quadro 1, com suas respectivas fontes e diluições. As secções foram desparafinizadas em xilol e re-hidratadas em álcool absoluto, 90% e 80%. A recuperação antigênica foi realizada em calor úmido (panela de pressão elétrica a 115°C por 20 minutos) com tampão citrato 10mM, ph6. Os cortes foram lavados em PBS, posteriormente, foi adicionado bloqueio peroxidase endógena com água oxigenada por 10 min, repetido por 4 vezes. Os cortes foram novamente lavados em PBS e incubados com Protein Block (NovolinkTM Max Polymer Detection System) por 30 min. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo anti-NRF2 na diluição de 1:200, na concentração 0,21mg/ml, em temperatura ambiente por 1h.

A revelação polimérica foi realizada conforme instruções do fabricante (NovolinkTM Max Polymer Detection System) – tempo de revelação 3 minutos. As secções foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina (NovolinkTM Max Polymer Detection System) por 3 minutos e contra-coradas com hematoxilina, por 5 minutos. Ao final, as lâminas foram desidratadas com álcool e xilol, montadas em Entellan e visibilizadas ao microscópio óptico. Os controles consistiram na ausência do anticorpo primário, sendo invariavelmente negativos.

Os controles positivos foram feitos em secções de rim de cadela conforme instruções do fabricante.

Para as marcações com Ki-67 foi realizada a recuperação do antígeno pelo tampão citrato (pH 6,0) utilizando banho-maria a 96 °C por 30 minutos. Após esse processo foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena e resfriamento por 10 minutos antes da imunocoloração. Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 1 hora com exceção do cromógeno DAB (DAB substrate system, Dakocytomation), de cinco minutos. Após a marcação com o cromógeno, as lâminas foram contra coradas com a hematoxilina de Mayer para a marcação nuclear. Em cada seção, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada (PBS). Como controles positivos foram usadas amostras de glândula mamária de cadela previamente testadas e os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário por PBS.

**Quadro 1** - Painel de anticorpos monoclonais previstos para avaliação dos tumores mamários de cadelas, com respectivos fabricantes, clones e diluições

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição	Marcação
NRF2	ABCAM	Ab31163	1:100	Nuclear e citoplasmática
Ki-67	INVITROGEN	SP6	1:200	Nuclear

## 5.6 QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

As lâminas da imunomarcação para KI-67 foram fotografadas em câmera digital Zeiss Axiocam/cc5 adaptada a um Microscópio Carl Zeiss Scope.A1, utilizando-se o software de captura Versão Zen 2012 (Blue Edition – Service Pack 1) ®. Para cada caso/lâmina foram fotografadas 10 áreas aleatórias sendo evitadas as áreas de necrose ou de intensa densidade celular, e identificado o quantitativo de núcleos marcados por caso para o anticorpo Ki-67, seu valor foi expresso como a porcentagem de células marcadas positivamente em um total de 1000 células epiteliais tumorais. O ponto de corte  $\geq 14\%$  dos núcleos corados foram considerados para classificar em alta a taxa de proliferação celular (NICCHIO, et al., 2020).

O método utilizado para avaliar a marcação imuno-histoquímica do NRF2 foi o H-score, considerado padrão ouro segundo metodologia descrita por Detre, Jotti, Dowsett, (1995) e Fedchenko e Reifenrath,(2014). Inicialmente, um pesquisador estabeleceu uma definição de pontuação e, em seguida, realizou a pontuação de cada caso, finalizando a avaliação de todos

os casos em duas semanas para garantir a consistência da interpretação. Em seguida, mais dois patologistas avaliaram as lâminas individualmente e classificaram as intensidades da marcação, de forma subjetiva, determinando em porcentagem as áreas para cada classificação. Foram designadas pontuações de 0, 1+, 2+ ou 3+ (nenhum, sinal de marcação fraco, moderado, forte) para o anticorpo NRF2. Em cada caso foi aplicado a fórmula  $H\text{-score} = (1 \times \% \text{ células } 1+) + (2 \times \% \text{ células } 2+) + (3 \times \% \text{ células } 3+)$  para marcação citoplasmática. Ao final, o H-score da amostra foi obtido por meio da média aritmética dos valores atribuídos por cada patologista, o que garantiu um bom grau de concordância.

## 5.7 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE DESEMPENHO DO NRF2

O desempenho da imunoexpressão do NRF2 foi avaliado segundo diferentes índices expressos em percentual, incluindo: co-positividade = [verdadeiros positivos/verdadeiros positivos + falsos negativos] x 100; co-negatividade = [verdadeiros negativos/verdadeiros negativos + falsos positivos] x 100; valor preditivo positivo –VPP = [verdadeiros positivos/total de positivos] x 100; valor preditivo negativo –VPN = [verdadeiros negativos/total de negativos] x 100; *positive likelihood ratio* (LR+) = *co-positivity* / (1 – *co-negativity*); *negative likelihood ratio* (LR+) = (1 – *co-positivity*) / *co-negativity*.

A *receiver operating characteristic curve* (curva ROC) foi construída aplicando-se na ordenada os valores de co-positividade e na abscissa o complemento da co-negatividade. Utilizou-se esta curva para a seleção do ponto de corte, como o valor que discrimina os resultados em positivos ou negativos. A análise da curva ROC permitiu ainda o cálculo da acurácia global dos parâmetros, avaliada através da área sob a curva ROC-ASC20. Para construir as curvas ROC para os parâmetros avaliados, utilizou-se o programa estatístico MedCalc *Statistical*. Os intervalos de confiança de 95% foram calculados, utilizando o programa *Confidence Interval Analysis* (CIA) for *Windows*. O desempenho da imunoexpressão do NRF2 no ponto de corte proposto, foi ainda avaliado através do índice expresso em chances denominado razão de verossimilhança (RV), calculados através das fórmulas: RV para o resultado positivo = [verdadeiro positivo/(verdadeiro positivo + falso-negativo)]/[falso positivo/(falso positivo + verdadeiro negativo)] e RV para o resultado negativo = [falso negativo/(verdadeiro positivo + falso-negativo)] / [verdadeiro negativo/(falso positivo + verdadeiro negativo)].

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após tabulação dos dados, foram realizadas análises descritivas e gráficas dos dados obtidos. A escolha entre testes paramétricos e não paramétricos foi baseado no teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. O teste exato de Fisher serviu para comparações das proporções entre os grupos. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's foi usado para comparação do H-score entre os grupos. O teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes foi usado na comparação entre apenas dois grupos. A análise de regressão logística binária serviu para comparação entre os parâmetros avaliados e o H-score. Análise de correlação de Spearman foi aplicada para avaliar as possíveis correlações entre os parâmetros avaliados e o H-score. O coeficiente de correlação (r) foi classificada como fraco ( $r = 0,10$  a  $0,30$ ), moderado ( $r = 0,4$  a  $0,6$ ) e forte ( $r = 0,7$  a  $1$ ) (DANCEY; REIDY, 2006). A análise de Kaplan-Meier foi usada para construção da função de sobrevida e o teste do log-rank serviu para a comparação entre os diferentes grupos. Na avaliação multivariada da sobrevida foi utilizado a regressão de Cox. Para estabelecer o ponto de corte do Hscore foi utilizado a análise da curva ROC utilizando o software MedCalc versão 19.1.7. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ , para intervalo de confiança de 95%, com análise bicaudal. Os programas estatísticos SPSS® 26.0 para Windows e GraphPad Prism 8.0.2 foram utilizados para análises estatísticas.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICAS E PATOLÓGICAS

Dentre os animais do grupo experimental estudado (38), as cadelas sem raça definida (15/38, 39,4%) foram as mais acometidas por neoplasias mamárias seguidas da raça Poodle (11/38, 28,9%), com a idade média de 11 anos (faixa etária de 08 - 15 anos), sendo a maioria das cadelas não castradas (29/38, 76%).

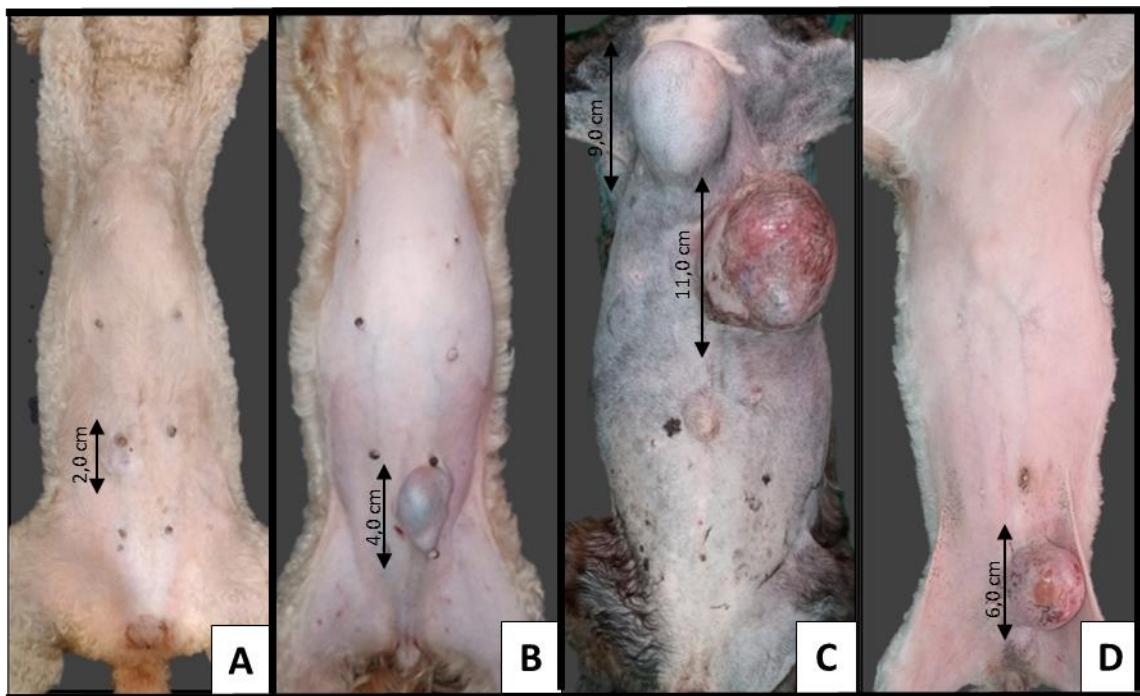
O grupo das neoplasias benignas (8/38, 21%), foi constituído de tumores mistos benignos, (5/8, 62,5%), adenomas simples (2/8, 25%), e adenomioepitelioma (1/8, 12,5%). Os tumores malignos (30/38, 78,9%), foram representados pelos carcinomas simples (carcinoma papilar ou tubular com graduações I ou II) (6/30, 20%), carcinoma em tumor misto grau I (7/30, 23,3%), carcinoma em tumor misto grau II e III (7/30, 23,3%), adenomioepitelioma maligno (6/30, 20%) e carcinossarcomas (4/30, 13,3%) (Figura 6).

Os tumores maiores que cinco centímetros foram mais frequentes (21/38, 55%) e as mamas inguinais (21/38, 55,2%), independente da lateralidade, foram mais acometidas. A ulceração foi frequente em 47,3% (18/38) dos tumores mamários de cadelas desse estudo (Figura 6).

Oito animais foram alocados no estadio IV por apresentarem metástase apenas para linfonodo e quatro cadelas foram alocadas no estadio V por apresentarem metástase a distância. O estadiamento clínico III, caracterizado por tumores maiores que 5cm e sem metástase, foi mais frequente (12/30, 40%). Quanto a graduação histológica, houve predomínio do grau I (11/20, 55%) dentre os tumores passíveis de graduação.

As cadelas com indicação de quimioterapia corresponderam a 52,6% (20/38). Estes animais, apresentaram tumores com graduação histológica maior que II (9/20, 45%), tipos histológicos agressivos (10/20, 50%) (carcinossarcoma ou adenomioepitelioma maligno) ou metástase regional e/ou a distância no momento do diagnóstico. As cadelas que evoluíram ao óbito por causas relacionadas ao tumor corresponderam a 36,8% (14/38) dos casos.

**Figura 6.** Macroscopia das neoplasias mamárias cadelas. **A.** Tumor misto benigno. **B.** Carcinoma em tumor misto grau II. **C.** Carcinossarcomas. **D.** Adenomioepitelioma maligno.



**Tabela 3.** Comparação entre comportamento biológico tumoral de cadelas, epidemiologia e fatores prognósticos

Parâmetros	Tumores benignos n = 8	Tumores malignos n = 30	Controles n = 6	Total n = 44	p-valor
<b>Quantitativos</b>					
	<b>Média (±dp)</b>	<b>Média (±dp)</b>	<b>Média (±dp)</b>	<b>Média (±dp)</b>	
<b>Idade (anos)</b>	10,6 (±0,9)	11,2 (±0,5)	-	11,0 (±0,4)	0,598
<b>Sobrevida (dias)</b>	296,6 (±41,8)AB	580,1 (±89,9)B	29,7 (±11,7)A	453,5 (68,5)	0,011*
<b>Qualitativos</b>					
<b>Tamanho</b>					0,004*
< 3 cm	100% (8/8)	16,7% (5/30)	-		
3 – 5 cm	0 (0/8)	13,3% (4/30)	-		
> 5cm	0 (0/8)	70,0% (21/30)	-		
<b>Metástase nodal</b>					
N0	-	66,7% (20/30)	-		
N1	-	33,3% (10/30)	-		
<b>Metástase à distância</b>					-
M0	-	86,8% (26/30)	-		
M1	-	13,2% (4/30)	-		
<b>Estadiamento</b>					< 0,001*
I	-	13,3% (4/30)	-		
II	-	6,7% (2/30)	-		
III	-	40,0% (12/30)	-		
IV	-	26,7% (8/30)	-		
V	-	13,3% (4/30)	-		
<b>Graduação</b>					-
I	-	55,0% (11/20)	-		
II	-	35,0% (7/20)	-		
III	-	10,0% (2/20)	-		
<b>Ulceração</b>					-
Não	100% (8/8)	40,0% (12/30)	-		
Sim	0 (0/8)	60,0% (18/30)	-		
<b>Sobrevida (condição)</b>					0,003*
Vivo	100% (8/8)	53,3% (16/30)	-		
Óbito	0 (0/6)	46,7% (14/30)	-		0,003*

\* Diferenças significativas ( $p < 0,005$ )

Testes estatísticos: Teste U de Mann-Whitney; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's; Teste exato de Fisher.

- Sem informação

Médias ± desvio padrão seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ ).

## 6.2 AVALIAÇÃO DO H-SCORE E KI-67

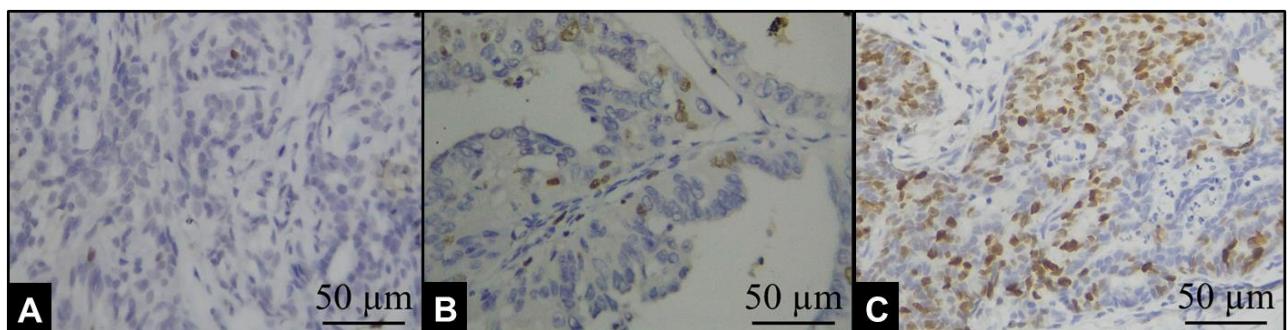
O exame imuno-histoquímico dos tumores mamários de cadelas com o anticorpo NRF2 evidenciou marcação citoplasmática, em sua maioria, difusa com variação de intensidade. Desta forma, a intensidade da marcação foi classificada como ausente (0+), discreta (1+), moderada (2+) ou intensa (3+). Com exceção do grupo controle, na qual foi observada marcação nuclear e intensa e difusa marcação citoplasmática. De forma interessante, nos demais grupos, apenas algumas células mioepiteliais e raras células epiteliais apresentaram marcação nuclear do NRF2. Desta forma, diante da escassa marcação nuclear observada, neste estudo, foi considerada apenas a marcação citoplasmática nas células epiteliais (Figura 8).

Em relação a expressão do Ki-67, esta foi maior nos tumores agressivos e significativamente menor nas neoplasias benignas. A expressão do Ki-67 comparada ao NRF2 em todos os grupos demonstrou que o aumento da expressão do Ki-67 é inversamente proporcional à expressão do NRF2 (Figura 7).

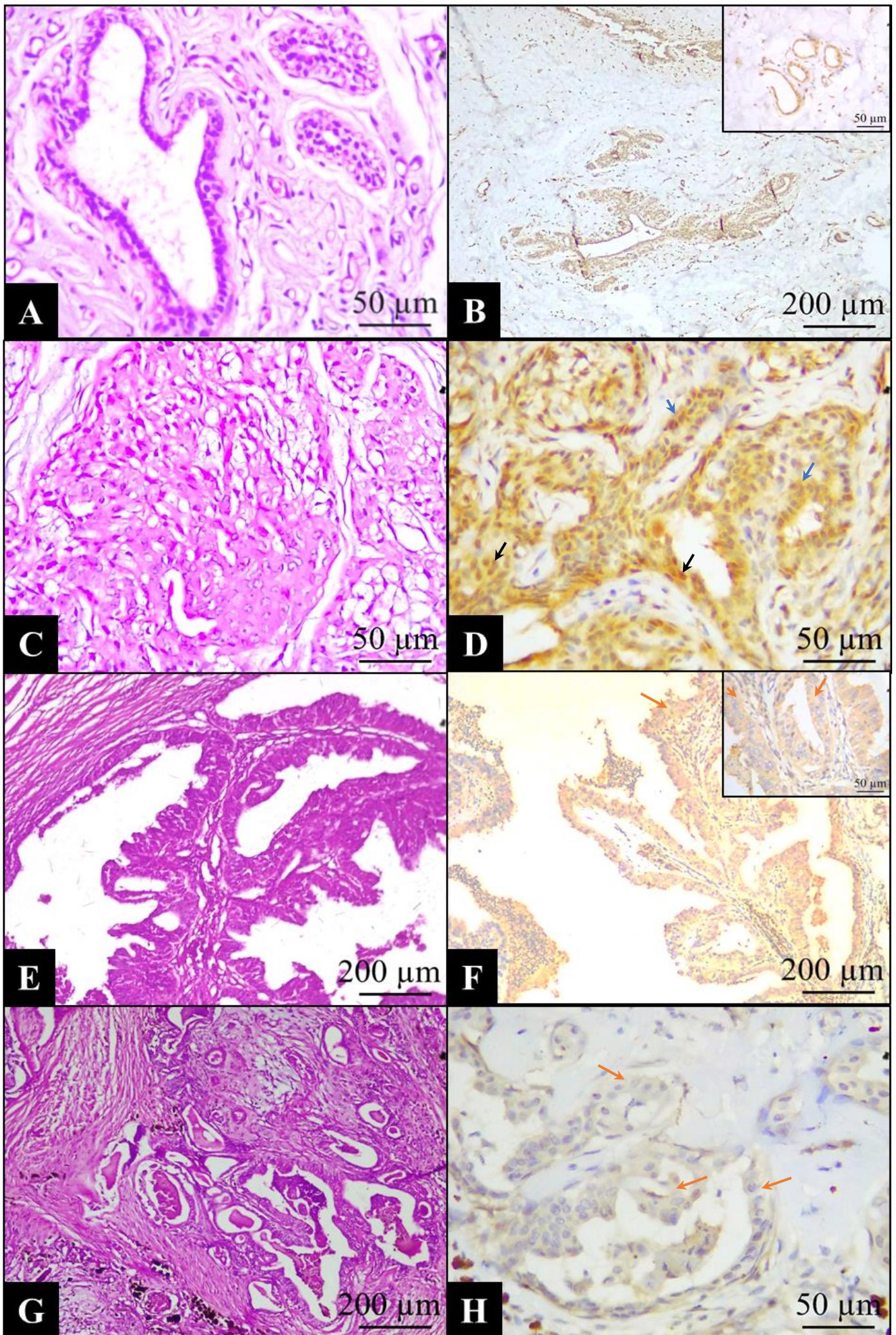
**Tabela 4:** Comparação entre comportamento biológico tumoral de cadelas e médias da expressão de NRF2 e Ki-67.

Parâmetros	Tumores benignos n = 8	Tumores malignos n = 30	Controles n = 6	Total n = 44	p-valor
<b>Quantitativos</b>					
	<b>Média (±dp)</b>	<b>Média (±dp)</b>	<b>Média (±dp)</b>	<b>Média (±dp)</b>	
<b>Ki-67 (%)</b>	5,8 (±0,7)A	17,8 (±1,9)B	-	15,3 (±1,7)	<0,001
<b>Hscore</b>	190,7 (±21,1)A	138,5 (±10,4)A	265,8 (±4,5)B	165,4 (±10,5)	0,003*

**Figura 7.** Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica do marcador Ki-67 em amostras de neoplasias mamárias em cadelas. Obj. 40x. **A.** Tumor misto benigno. **B.** Carcinoma papilar **C.** Carcinoma em tumor misto grau.



**Figura 8.** Expressão imuno-histoquímica do marcador NRF2 em amostras controle e de neoplasias mamárias em cadelas. **A.** Glândula mamária sem alteração neoplásica (HE). **B.** Glândula mamária sem alteração neoplásica em (NRF2). Destaque dos túbulos com epitélio intensa e difusamente marcado por NRF2 em objetiva de 40 x (NRF2). **C.** Tumor misto benigno em (HE). **D.** Tumor misto benigno (NRF2). Marcação nuclear (setas pretas) e predominantemente citoplasmática (setas azuis) **E.** Carcinoma papilar (HE). **F.** Carcinoma papilar (NRF2). Destaque ao arranjo papilar em objetiva de 40x (NRF2). Marcação citoplasmática moderada e difusa (setas vermelhas) **G.** Carcinoma em tumor misto grau II (HE). **H.** Carcinoma em tumor misto grau II (NRF2). Marcação predominantemente citoplasmática fraca (setas vermelhas). **B, D, F e H** – Contra-coloração com hematoxilina de Meyer. **A, C, D, e H** – Objetivas de 40 x. **B, E, F, G** – Objetivas de 10 x.



### **6.2.1 Expressão de NRF2 em glândulas mamárias sem alterações neoplásicas de cadelas**

Em todas as amostras do grupo controle, constituído por parênquima mamário sem alteração histológica, foi observada marcação predominante citoplasmática e difusa. A marcação nuclear estava presente, mais intensa e frequente quando comparado aos demais grupos. A média de H-score dos grupos controles foi 265,8.

### **6.2.2 Expressão de NRF2 em neoplasias benignas de cadelas**

As neoplasias benignas (8/38), apresentaram H-scores intermediários, com média de 190,7. A expressão citoplasmática continuou sendo difusa, porém com intensidade menor quando comparada ao grupo controle (Figura 8D). As neoplasias benignas apresentaram H-scores distintos quando segregadas pelo diagnóstico histológico. Os tumores mistos benignos apresentaram maior H-score (215) seguido do adenomioepitelioma (180) e adenomas simples (135,5).

### **6.2.3 Expressão de NRF2 nos tumores malignos de cadelas**

O grupo de tumores malignos (30/38) foi constituído por seis tipos histológicos distintos. De forma geral, a marcação no grupo foi citoplasmática, difusa e discreta com média de H-score de 138,5. Em poucos tumores foram observadas áreas sem marcação (0) mas, na maioria das amostras, a imunoexpressão foi positiva e classificada como fraca (1+), com exceção dos carcinomas simples, em que a maioria a intensidade foi classificada como (2+). As médias de H-score do grupo dos carcinomas simples, foram as maiores (213,3) seguida dos carcinomas em tumor misto grau I (140,2). As médias dos tumores mais agressivos como carcinossarcoma e adenomioepitelioma maligno foram 116,3 e 114,4. As menores médias registradas foram nos carcinomas em tumores mistos grau II e III (106). Entretanto, não houve diferença estatística entre os H-scores dos tipos histológicos malignos.

## **6.3 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS: CONTROLE, NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS**

Foram identificados H-score de 265,8; 190,7; e 138,5 nos grupos controle, neoplasias benignas e malignas, respectivamente. Foi observada diferença estatística no H-score entre os grupos controles e tumores malignos (Figura 9A). Cabe ressaltar que, há diminuição do H-score conforme o tumor apresenta características de malignidade.

### **6.3.1 Comparação entre grupos: neoplasias mamárias benignas versus neoplasias mamárias malignas**

Ao avaliar as neoplasias mistas benignas com sua contraparte maligna, observou-se que os carcinossarcomas e carcinomas em tumores mistos, independente da graduação, possuíam menores H-scores que os tumores mistos benignos. Entretanto, para os carcinomas simples de diferentes graduações (grau I e II), tipos histológicos (carcinoide papilar e carcinoma tubular) e adenomas simples, em que o H-score não apresentou diferença estatística, e dentre estes, os tumores malignos possuíam maior H-score que os benignos. Não foi possível comparar a expressão do NRF2 entre o adenomioepitelioma maligno e adenomioepitelioma pois havia apenas uma amostra deste último tipo histológico (Figura 8B). Os carcinomas em tumores mistos ( $p < 0,001$ ), adenomioepitelioma maligno ( $p = 0,0010$ ) e carcinossarcoma ( $p=0,038$ ), apresentaram diferença estatística com o grupo controle (Figura 9B).

### **6.3.2 Comparação entre grupos: Tumores mistos benignos, carcinoma em tumor misto e carcinossarcoma**

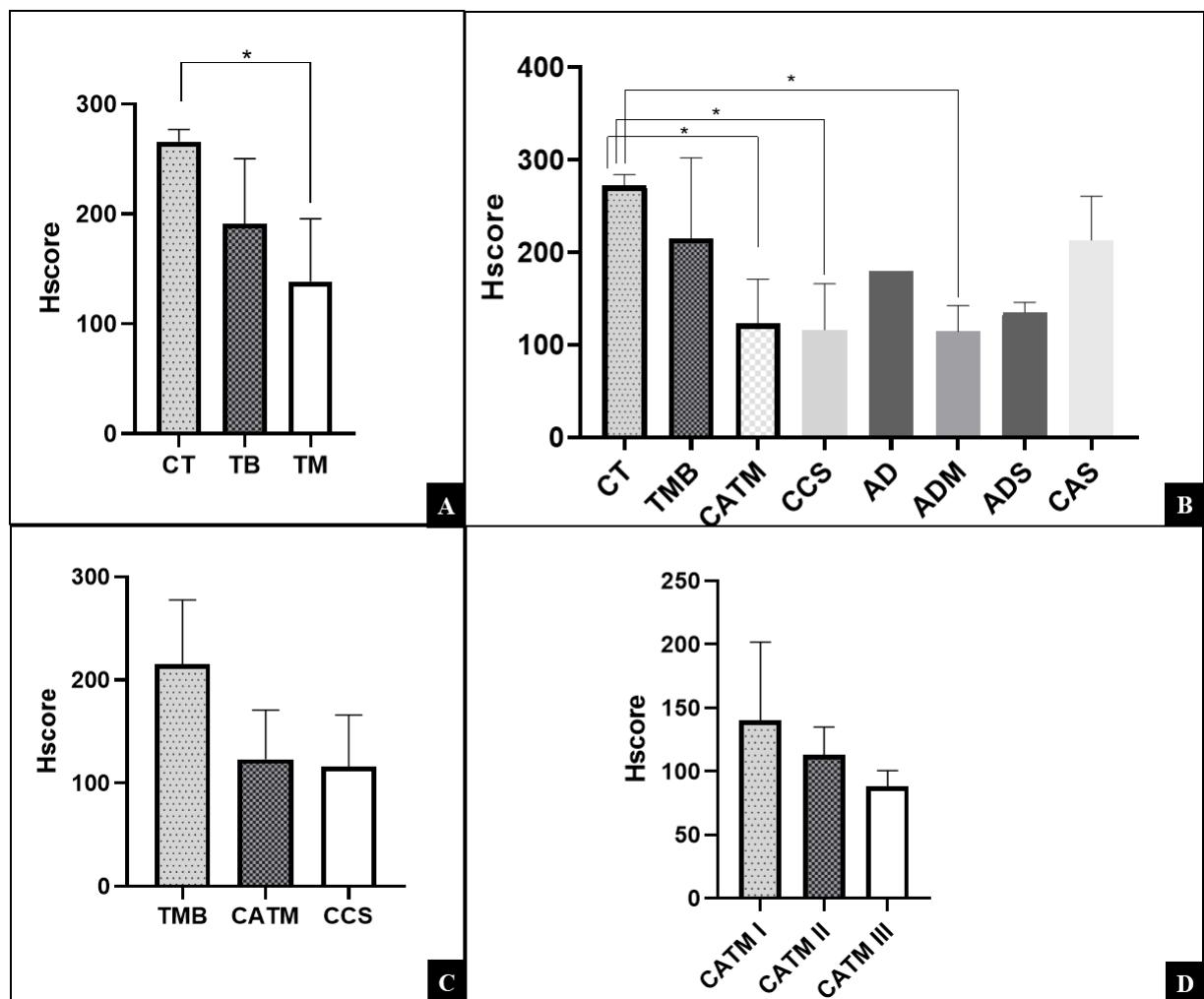
Ao comparar o H-score dentre os tumores mistos benignos e malignos, observa-se diferença da expressão do NRF2 de acordo com o comportamento biológico e redução de expressão com o aumento da agressividade tumoral, ou seja, os tumores mistos benignos possuem maior H-score que os malignos e os carcinossarcomas apresentam H-score menor que os carcinomas em tumores mistos (Figura 9C).

### **6.3.3 Comparação entre grupos: Carcinomas em tumores mistos grau I, II e III**

Quanto a graduação histológica, analisada dentro do grupo de carcinomas em tumores mistos observa-se uma correlação inversa entre graduação e H-score, o que significa dizer quanto maior a graduação menor o H-score do tumor (Figura 9D).

**Figura 9.** Representação gráfica de H-score e tipos histológicos de tumores mamários em cadelas. **A.** Comparação entre os grupos controle, tumores benignos e malignos. **B.** Comparação entre as versões malignas e

benignas de cada grupo de tumores. **C.** Comparação entre tumores mistos benignos, carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas. **D.** Comparação entre diferentes graduações histológicas do carcinoma em tumor misto.



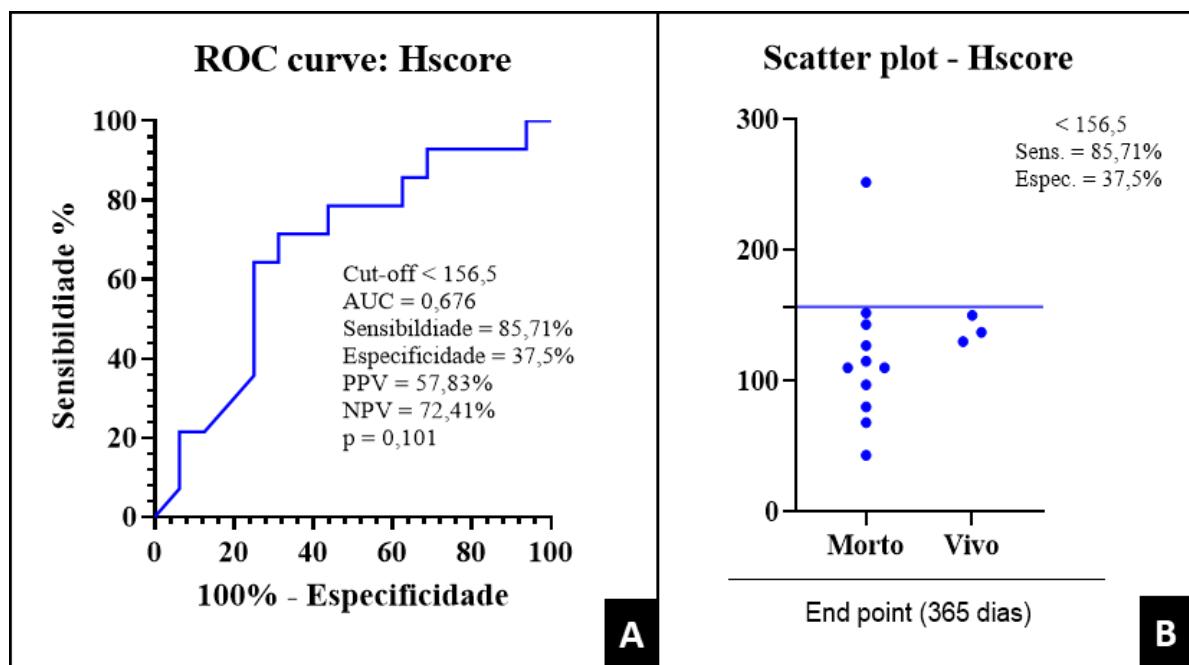
CT: Controle; TB: Tumores benignos; TM: Tumores malignos; TMB: Tumor misto benigno; CCS: Carcinossarcoma; ADS: Adenoma simples; CAS: Carcinoma simples; AD: Adenomioepitelioma; ADM: Adenomioepitelioma maligno e CATM: Carcinoma em tumor misto.

#### 6.4 ESTABELECIMENTO DE PONTO DE CORTE H-SCORE

O ponto de corte proposto para o H-score foi de 156,5. Este valor foi definido por conferir o maior percentual de sensibilidade e especificidade capaz de destacar diferenças estatísticas significativas e pesquisa de associações com outras variáveis. O ponto de corte de H-score de 156,5 demonstrou uma relação de sensibilidade e especificidade de 85,71% e 37,5% respectivamente. Além desses dados, a análise do índice de desempenho demonstrou valor de precisão (AUC = 0,676), valor preditivo negativo (NPV = 72,41%) e valor preditivo positivo (PPV = 57,83%) (Figura 10). Desta forma, o valor de  $p$  ( $p=0,101$ ) não foi significativo e o H-score não foi considerado um bom preditor de óbito neste estudo, quando avaliado em um

período de tempo pré-estabelecido de 365 dias, em que os tumores com H-score maior ou igual a 156,5 possuíam uma alta taxa de sobrevida (maior que 365 dias), enquanto que os que compreendiam H-score menor ou igual a 156,5 menor sobrevida. A análise do gráfico de dispersão revelou que o ponto de corte ( $H\text{-score} \geq 156,5$ ) não destacou diferenças estatisticamente significativas e nem definiu os resultados da progressão da doença em direção à sobrevivência ou morte em cães com neoplasias mamárias. As análises consideraram o estado das pacientes caninas apenas com neoplasias mamárias malignas (vivas/mortas) aos 365 dias pós-mastectomia, o que representou 3 animais vivos e 11 animais mortos.

**Figura 10.** Representação gráfica do índice de desempenho do ponto de corte da expressão do NRF2. **A.** Índice de curva ROC (característica de operação do receptor), com ponto de corte específico, incluindo: área sobre a curva/precisão global (AUC), sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos (PPV e NPV). **B.** Gráfico de dispersão entre a expressão do NRF2 (H-score) e o desfecho da doença. Quantificação imuno-histoquímica expressadas pelo NRF2 para prever a progressão da doença em direção à sobrevivência ou morte em cadelas portadoras de neoplasia mamária.



## 6.5 ASSOCIAÇÃO PARÂMETROS CLÍNICOS PATOLÓGICOS E H-SCORE

Ao relacionar o H-score com os dados clínicos-patológicos observou-se que há associação entre H-score, tamanho tumoral e estadiamento clínico. Os tumores maiores que cinco centímetros têm 0,67 vezes menor chance de possuir H-score maior ou igual a 156,5 ( $p = 0,001$ ). Os estadios III, IV e V tem chance de 0,85 vezes menor de possuir um H-score maior ou igual a 156,5 ( $p = 0,005$ ). Portanto, quanto menor o H-score maior o tamanho do tumor, consequentemente maior seu estadiamento (Tabela 5).

Ao comparar o índice de proliferação dos tumores por imuno-histoquímica (Ki-67), e expressão de NRF2, foi observada associação significativa. Os tumores com Ki-67 > 14% tem 0,56 vezes menor chance de possuir H-score maior ou igual a 156,5.

Um interessante resultado reforça a correlação negativa entre H-score de NRF2 e malignidade. Do total de 30 cadelas com tumores malignos, havia indicação para tratamento quimioterápico adjuvante a cirurgia em 20 delas (66,6%). Ao avaliar o H-score desses animais observou-se que 90% (18/20) possuíam tumores com H-score menor que 156,5, enquanto apenas 10 % (2/20), o H-score era maior ou igual a 156,5. Vale salientar que, apenas 10% dos tumores com indicação de quimioterapia eram carcinomas simples de grau II, o que reforça a hipótese que os carcinomas em tumor misto possuem menor H-score.

**Tabela 5.** Associação entre parâmetros clínico-patológicos e intervalo de H-score  $\geq 156,5$ .

	Hscore			p-valor	Odds ratio (IC 95%)
	< 156,5		$\geq 156,5$		
	n (%)	n (%)			
<b>Comportamento do tumor</b>	Benigno	3 (12,0%)	5 (38,5%)	0,063	4,23 (0,81 – 20,7)
	Maligno	22 (88,0%)	8 (61,5%)		
<b>Idade</b>	< 11 anos	12 (48,0%)	7 (53,8%)	0,732	1,17 (0,34 – 3,9)
	$\geq 11$ anos	13 (52,0%)	6 (46,2%)		
<b>Ki-67</b>	< 14%	10 (40,0%)	12 (92,3%)	0,001*	0,56 (0,006 – 0,71)
	>14%	15 (60,0%)	1 (7,7%)		
<b>Tamanho do tumor</b>	< 5 cm	3 (12,0%)	10 (76,9%)	<0,001*	0,61 (0,011 – 0,32)
	$\geq 5$ cm	22 (88,0%)	3 (23,1%)		
<b>Metástase nodal</b>	N0	14 (63,6%)	6 (75,0%)	0,553	0,22 (0,05 – 1,9)
	N1	8 (36,4%)	2 (25,0%)		
<b>Metástase a distância</b>	M0	18 (81,8%)	8 (100%)	0,121	**
	M1	4 (18,2%)	0		
<b>Ulceração</b>	Não	11 (44,0%)	9 (69,2%)	0,135	0,41 (0,11 – 1,8)
	Sim	14 (56,0%)	4 (30,8%)		
<b>Graduação</b>	I	5 (41,7%)	6 (75,0%)	0,184	0,32 (0,11 – 1,6)
	II e III	7 (58,3%)	2 (25,5%)		
<b>Estadiamento Clínico</b>	I e II	2 (9,1)	4 (50,0%)	0,005*	0,85 (0,26 – 2,7)
	III, IV e V	20 (90,9%)	74(50,0%)		

**Sobrevida**

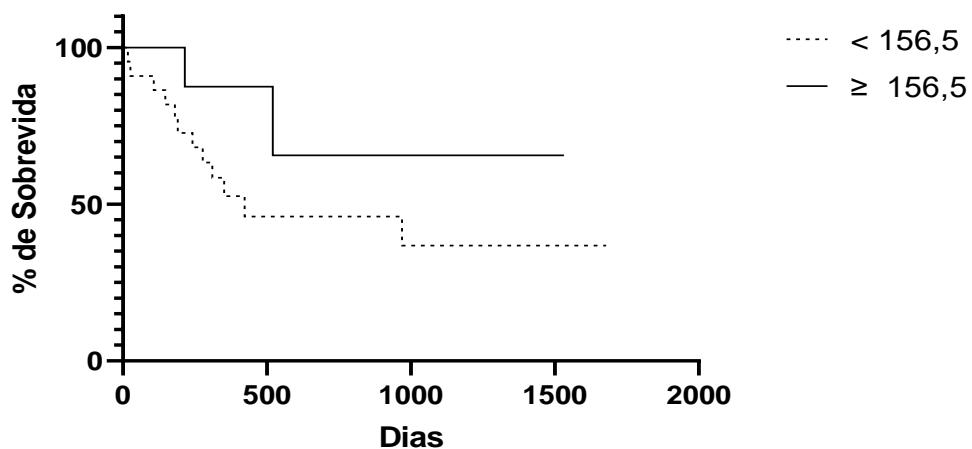
Vivo	13 (52,0%)	11 (84,6%)	0,077	0,39
Óbito	12 (48,0%)	2 (15,4%)		(0,15 – 1,8)

Testes estatísticos: Teste exato de Fischer e regressão logística binária. \*Associação estaticamente significante  $p < 0,05$ ; \*\* Não é possível calcular.

## 6.6 COMPARAÇÃO DE CURVA DE SOBREVIDA

Para a comparação das curvas de sobrevida a expressão de NRF2 em células epiteliais neoplásicas foi considerada alta quando o H-score foi  $\geq 156,5$ ; e baixa quando H-score  $< 156,5$ . As curvas de sobrevida foram estratificadas com base na expressão do NRF2 e analisadas apenas em tumores malignos, visto que os tumores benignos, independentemente, não atingem a mediana e não levam ao óbito do animal. Os resultados indicaram que não houve diferença na curva de sobrevida para H-score  $< 156,5,0$  e H-score  $\geq 156,5$  ( $p = 0,141$ , HR:0,34, IC 95% = 0,11 – 1,05). Cães com tumores com baixa expressão de NRF2 apresentaram uma sobrevida mediana de 423 dias e maior taxa de mortalidade ( $n = 12/22$ , 54,5%). Embora a taxa de mortalidade no grupo com H-score  $\geq 156,5$  ser menor (2/8, 25%), não houve diferença estatística entre as curvas de sobrevida, possivelmente devido ao número amostral. Os dados foram analisados pelo método de Kaplan-Meier conforme observado na figura 11.

**Figura 11.** Curva de sobrevida de Kaplan-Meier considerando todas as cadelas (carcinoma em tumor misto grau I, II, e III, carcinomas simples, adenomioepitelioma maligno e carcinossarcoma).



## 6.7 ANÁLISE UNIVARIADA E MULTIVARIADA

A correlação dos parâmetros clínicos-patológicos apenas das neoplasias mamárias na análise univariada com a expressão do NRF2 (alta  $\geq 156,5$  e baixa  $< 156,5$ ), demonstrou um grau de significância e forte correlação negativa com o índice de proliferação (Ki-67)( $p=0,001$ ;  $r = -0,698$ ), tamanho tumoral ( $p<0,001$ ;  $r=0,707$ ), e moderada correlação negativa com o

estadiamento clínico ( $p=0,036$ ;  $r= -0,471$ ) Quanto maior o H-score, menor o tamanho do tumor, estadiamento clínico, menor o índice Ki-67. Na análise multivariada, houve significância estatística apenas em relação ao Ki-67 ( $p=0,007$ ), como demonstrado na Tabela 6.

**Tabela 6.** Análise univariada e multivariada dos parâmetros clínico-patológicos das neoplasias mamárias malignas relacionados com H-score  $\geq 156,5$ .

\* Diferenças significativas ( $p < 0,005$ )

\*\* Não é possível calcular

Testes estatísticos: Correlação de Spearman e regressão logística.

Parâmetros	Univariada <sup>a</sup>		Multivariada <sup>b</sup>	
	Rho Spearman's (IC 95%)	p-valor	Odds ratio (IC 95%)	p-valor
Ki-67	-0,698 (-0,957 – -0,328)	0,001*	0,04 (0,004 – 0,428)	0,007*
Tamanho	- 0,707 (-0,968 – -0,424)	< 0,001*	**	**
Metástase nodal	-0,089 (-0,504 – 0,414)	0,709	0,58 (0,09 – 3,6)	0,562
Metástase a distância	-0,343 (-0,576 – 0,167)	0,139	**	**
Estadiamento Clínico	-0,471 (-0,866 – -0,002)	0,036*	0,11 (0,01 – 0,74)	0,100
Graduação	-0,328 (-0,704 – 0,154)	0,158	0,24 (0,03 – 1,7)	0,153
Ulceração	-0,082 (-0,544 – 0,390)	0,731	0,57 (0,11 – 2,9)	0,502
Sobrevida	-0,171 (-0,599 – -0,303)	0,471	0,28 (0,05 – 1,7)	0,165

Ao correlacionar sobrevida com os fatores avaliados, foi observado que metástase a distância ( $p=0,008$ ), apresentou associações significativas com a sobrevida. A análise multivariada revelou que o índice de proliferação KI-67 ( $p=0,018$ ) e metástase a distância ( $p=0,002$ ) mostraram significância. Não houve correlação e associação com H-score e sobrevida neste estudo (Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise univariada e multivariada dos parâmetros clínico-patológicos das neoplasias mamárias malignas relacionados com a sobrevida.

\* Diferenças significativas ( $p < 0,005$ )

Testes estatísticos: Correlação de Spearman e regressão de Cox

Parâmetros	Univariada <sup>a</sup>		Multivariada <sup>b</sup>	
	Rho Spearman's (IC 95%)	p-valor	Odds ratio (IC 95%)	p-valor
Hscore	-0,171 (-0,577 – 0,287)	0,471	0,34 (0,076 – 1,53)	0,161
Ki-67	0,242 (-0,206 – 0,637)	0,303	5,01 (1,32 – 18,98)	0,018*
Tamanho	0,424 (-0,210 – 0,667)	0,063	30,49 (0,14 – 62,96)	0,214
Metástase nodal	0,206 (-0,252 – 0,663)	0,384	1,83 (0,63 – 5,31)	0,268
Metástase a distância	0,572 (0,302 – 0,883)	0,008*	7,55 (2,05 – 27,79)	0,002*
Estadiamento Clínico	0,424 (-0,210 – 0,667)	0,063	33,05 (0,197 – 55,4)	0,181
Graduação	0,390 (-0,058 – 0,739)	0,089	3,99 (0,77 – 20,66)	0,099

## 7 DISCUSSÃO

O fator de transcrição NRF2 é o regulador mestre, que atua na proteção das células contra o estresse oxidativo, a partir da regulação da expressão de vários genes que codificam enzimas antioxidantes. Desta maneira, sua modulação parece ser importante para terapia do câncer (SAJADIMAJD; KHAZAEI, 2018). Este estudo é pioneiro, na avaliação da expressão deste fator de transcrição nos tumores mamários de cadelas e sua correlação com os fatores prognósticos considerados clássicos.

O tamanho tumoral, estadiamento clínico, diagnóstico e graduação histopatológica e ocorrência de metástase são considerados fatores prognósticos clássicos (CAVALCANTI; CASSALI, 2006; ESTRELA-LIMA, et al., 2010; FERREIRA, et al., 2009). No presente estudo a relação direta, desses fatores com a sobrevida foi ratificada em todos os grupos, sendo observada maior frequência de tumores pequenos com comportamento benigno; o potencial de malignidade foi intermediário a crescente nos grupos constituído por tumores entre 3 e 5 cm e dos tipos histológicos carcinoma em tumor misto I, II e III e carcinomas simples (FERREIRA, et al., 2009; QUEIROGA; LOPES, 2002; TORÍBIO, et al., 2012) alguns já com metástase para linfonodo e alto potencial de malignidade. Os tumores maiores foram observados no grupo de adenomioepitelioma maligno e carcinossarcoma, com predomínio de metástase, sobrevida baixa e evolução para o óbito (NUNES, et al., 2018).

Os resultados da imunomarcação demonstraram, em sua grande maioria, expressão citoplasmática e difusa de NRF2 nos tumores mamários da cadela. Pelo exposto, diante da escassa ou inexistente marcação nuclear em células epiteliais apenas a expressão citoplasmática de NRF2 foi considerada. Essa expressão mostrou-se inversamente proporcional ao potencial de malignidade dos tumores, ou seja, marcação intensa e difusa nas amostras controles, tumores benignos e carcinomas bem diferenciados e ausente ou em menor intensidade, mas também difusa nos tumores agressivos. Resultados divergentes dos aqui descritos, foram relatados em mulheres com câncer de mama, sendo a expressão do NRF2 predominantemente nuclear, relacionada ao aumento da graduação histológica e pior prognóstico (SIMPLICIO-REVOREDO, et al., 2020). Solis e colaboradores (2010), assim como no presente estudo, também encontraram maior expressão citoplasmática de NRF2 em tumores de cabeça e pescoço, entretanto, eram tumores de pior prognóstico com mutações em Keap 1 e NRF2.

Embora a maior expressão citoplasmática de NRF2 tenha sido observada em neoplasias benignas em comparação as neoplasias malignas correspondentes, a expressão nuclear de NRF2 continuou sendo mínima entre os tipos tumorais. Está bem estabelecido que o estresse oxidativo

representa um importante sinal para translocação nuclear de NRF2 (TAGUCHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2011). Embora as células neoplásicas, geralmente, tenham altos níveis de ROS (LEINONEN, et al., 2015; OHTA, et al., 2008), esses sinais de estresse oxidativo podem estar presentes apenas de forma transitória.

É possível que a expressão citoplasmática elevada de NRF2 observada nas neoplasias benignas aqui observadas, represente uma capacidade aumentada de detectar e responder a perturbações no ambiente redox celular. Mas também, é provável que a localização nuclear de NRF2 exija aumentos adicionais nos níveis de ROS e/ou tenha influência de outros fatores. Podem ser fatores importantes para o melhor entendimento da expressão citoplasmática, as atividades de localização nuclear (NLS) e sinais de exportação (NES) dentro de NRF2, a interação entre o fator de transcrição e proteínas importinas (LI; KONG, 2009; THEODORE, et al., 2008), mutações em NRF2 ou KEAP 1 e envolvimento dos genes p53, CRM1 (FARAONIO, et al., 2006; HAYES; MCMAHON, 2009; SOLIS, et al., 2010; WANG, et al., 2009). Desta forma, a partir dos resultados aqui apresentados, é necessário delinear a importância funcional da expressão citoplasmática de NRF2 em neoplasias mamárias de cadelas, bem como entender o mecanismo de transporte núcleo-citoplasmático deste fator de transcrição.

Ademais, apesar de ser um fator de transcrição nuclear, o NRF2, também se localiza no citoplasma, quando ligado ao KEAP1, mas aparentemente mesmo quando associado a esta proteína, sua imunomarcação citoplasmática é positiva (CHO, et al., 2017). Esta é uma das hipóteses para explicar a marcação predominantemente citoplasmática observada. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar a expressão das proteínas associadas ao NRF2 em tumores de mama. Ainda é importante destacar que por se tratar de um estudo retrospectivo, não se pode descartar que a baixa expressão resulte da menor sensibilidade da técnica imuno-histoquímica, pela menor exposição aos抗ígenos, bem como por se tratar de amostras parafinadas, a expressão proteica pode estar reduzida.

Fisiologicamente, o NRF2, que se encontra no citoplasma das células ligado a KEAP 1, é um importante fator de transcrição e marcador de estresse oxidativo celular, sensível a qualquer tipo de desequilíbrio oxidativo nas células. Com o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), sofre translocação nuclear, e se associa a pequenas proteínas Maf com a finalidade de ativar genes-alvo para citoproteção por meio do elemento de resposta antioxidante (ARE) (PANDEY, et al., 2017). Sabe-se do importante desequilíbrio oxidativo associado as neoplasias malignas (KARIHTALA, et al., 2006; KARIHTALA, et al., 2011), logo, esperava-se neste

estudo que houvesse uma maior marcação nuclear em tumores malignos, e citoplasmática em neoplasias benignas, a exemplo do que acontece nos tumores de mama da mulher (SIMPLICIO-REVOREDO, et al., 2020; ONODERA, et al., 2014). Contudo, há de se ponderar que a ausência ou marcação nuclear fraca observada nas células epiteliais dos tumores mamários de cadelas, pode estar relacionada a intensa e complexa desregulação das vias de sinalização das células neoplásicas.

Os adenomas pleomórficos da glândula salivar e sua contraparte maligna, os carcinomas ex-adenomas pleomórficos apresentam várias características semelhantes com tumores mistos benignos (TMB) e malignos, respectivamente, das glândulas mamárias caninas (GENELHU, et al., 2007). Droždzik e colaboradores (2015) avaliaram o papel do NRF2 na patologia dos adenomas pleomórficos, e apesar de relatarem expressão nuclear, assim como no presente estudo, também encontraram expressão citoplasmática nas células epiteliais neoplásicas, corroborando que há expressão de NRF2 no citoplasma destas células nos tumores mistos.

A marcação de NRF2 nas células mioepiteliais, assim como no presente estudo, também foi relatada nos adenomas pleomórficos de glândula salivar de humanos, contudo, de forma intensa, difusa e localização nuclear (HUANG, et al., 2016). O componente mioepitelial dos tumores mistos benignos e carcinomas em tumores mistos, apresentam comportamento benigno (MISDORP, et al., 1999), sendo assim, a marcação nuclear difusa nas células mioepiteliais, aconteceu de maneira semelhante as células epiteliais benignas ou do grupo controle. Portanto, pode-se sugerir que esta localização celular (nuclear) da expressão de NRF2 nos tumores mamários mistos de cadelas possa estar associada comportamento biológico benigno.

Quanto a quantificação imuno-histoquímica de NRF2, a diferença entre comportamentos biológicos antagônicos dos tumores mamários e entre as graduações histológicas dos carcinomas em tumores mistos, ratifica o que foi observado de forma geral, no presente estudo, ou seja, as versões malignas apresentam menor H-score quando comparadas com as benignas e dentre os tumores malignos quanto maior a graduação menor o H-score. No entanto, sabe-se que as células neoplásicas não possuem um bom sistema antioxidante quando comparadas com células normais, pois elas já têm altas taxas de ROS e hiperativação de NRF2 (LEINONEN, et al., 2015; OHTA, et al., 2008). Resultado semelhante foi observado por Brod e colaboradores (2017), que encontraram maior expressão de NRF2 em adenocarcinoma polimórfico, neoplasia epitelial de bom prognóstico que acomete glândulas salivares em humanos.

A relação de prognóstico favorável e alta expressão de NRF2, assim como no presente estudo, também já foi descrita no carcinoma mucoepidermoide pulmonar em humanos (TERTIL, et al., 2015). Esses autores observaram que a expressão de NRF2 foi relacionada positivamente com microRNAs supressores de tumor, como miR-181a, miR-193b e miR-424 e negativamente com miR-378 oncogênica, assim como acontece em superexpressões de genes codificadores de heme-oxigenase 1(HMOX1) (TERTIL, et al., 2015). Portanto, outras vias moleculares envolvendo HO-1 devem ser investigadas como mediadoras da ação de NRF2 no comportamento biológico dos tumores de mama de cadelas.

Os tumores mistos mantiveram menor expressão conforme aumenta a malignidade. Enquanto os tumores simples (adenomas e carcinomas) apresentam expressão similar a observada em mulheres, ou seja, a maior expressão de NRF2, tem relação com malignidade e progressão tumoral (SIMPLICIO-REVOREDO, et al., 2020; ONODERA, et al., 2014). Cabe ressaltar o predomínio na amostra estudada de tumores mistos, pouco frequente em mulheres, que exibem um padrão histológico complexo, caracterizado por células epiteliais, mioepiteliais e componentes mesenquimais (CASSALI, et al., 2012; MISDORP, 1999). Desta forma, a expressão do NRF2 nos tumores mistos, pode ter influência decisiva para os resultados divergentes entre tumores de mama na cadela e na mulher aqui observados. Estes resultados, demonstram a necessidade de uma avaliação envolvendo as células neoplásicas mioepiteliais e mesenquimais para um melhor entendimento da expressão do NRF2 nos tumores de mama da cadela.

Assim como observado neste estudo, também já foi descrita distintas expressões de NRF2 em diferentes subtipos histológicos de um mesmo tumor, como os carcinomas císticos de glândula salivar em humanos, que apresentaram maior expressão nos tumores tubulares quando comparados com os cribiformes (HUANG, et al., 2016). Não obstante, no presente estudo, os tumores simples, tinham H-scores maiores que os tumores mistos, ratificando a hipótese que a composição histológica dos tumores pode influenciar na expressão de NRF2 em neoplasias mamárias na espécie canina.

A menor expressão de NRF2 em tumores malignos e agressivos, inicialmente pode sugerir que este fator de transcrição não influencie a carcinogênese mamária em cadelas, ou que seria interessante o uso de estimuladores de NRF2, como por exemplo, a cúrcuma, quercetina e ozônio em baixas concentrações (BARINDA, et al., 2022; COSTANZO, et al., 2020; MOSTAFAVI- POUR, et al., 2017). Entretanto, este resultado deve ser avaliado com cautela e mais estudos devem ser realizados para investigar outras vias de atuação do NRF2.

A utilização de métodos semi-quantitativos ou qualitativos para avaliar a expressão do NRF2, podem contribuir para a divergência de resultados observados quanto a relação dos fatores prognósticos com NRF2 no câncer de mama da mulher (SIMPLICIO-REVOREDO, et al., 2020; ONODERA, et al., 2014). Buscando minimizar as divergências, no estudo em questão, foi estabelecido um ponto de corte de H-score 156,5, considerado adequado pela análise da curva ROC, pela relação de sensibilidade e especificidade e valores preditivos negativo e positivo.

A avaliação da expressão do marcador de proliferação Ki-67 em relação a expressão do NRF2 nos diferentes grupos, demonstrou uma correlação forte e negativa, ou seja, menor expressão do NRF2 foi vista em tumores com alta taxa de proliferação. Segundo Kadthur e colaboradores (2011), a alta expressão nuclear do Ki-67 está relacionada ao menor grau de diferenciação, classificação histopatológica e com o maior potencial metastático da neoplasia. Essa relação inversa entre o marcador Ki-67 e o grau de diferenciação também foi observada neste estudo, no qual foi constatada maior expressão em tumores malignos e agressivos. Entretanto, os resultados relacionados à capacidade proliferativa e expressão de NRF2 no presente estudo divergem dos resultados encontrados por Onodera e colaboradores (2014) que observaram associação positiva entre os dois marcadores nos tumores de mama de mulheres.

Os parâmetros clínico-patológicos relacionados à expressão do NRF2 (alta  $\geq 156,5$ ), tamanho tumoral e estadiamento foram significativos tanto na análise uni quanto na multivariada. Tumores maiores que cinco centímetros apresentam maior chance de possuir menor H-score, logo comportamento biológico maligno (SORENMO, 2003). Não obstante, também houve correlação negativa e moderada com o estadiamento clínico, o que era esperado, pois o tamanho influencia diretamente no estadiamento. Onodera e colaboradores (2014) relataram correlação direta entre estadiamento e expressão de NRF2 nos tumores de mama da mulher, de maneira inversa a quantificação imuno-histoquímica do presente estudo.

As cadelas que tiveram indicação de quimioterapia foram aquelas que apresentaram tumores agressivos, com graduação igual ou maior a II, ou metástase (regional ou a distância), de acordo com o que é preconizado no consenso de diagnóstico de neoplasias mamárias (CASSALI, et al., 2020). Interessante ressaltar que das 20 cadelas que possuíam indicação para tratamento quimioterápico 18 apresentavam baixa expressão de NRF2, indicando mais uma vez correlação entre baixa expressão e maior malignidade. Com bases nesses resultados pode-se aventar a possibilidade de utilizar a imunomarcação de NRF2 em tumores de mama em cadelas

como um fator indicativo para realização de quimioterapia, além de alvo terapêutico como sugeriram Rutland e colaboradores (2021) com osteossarcomas caninos.

Ademais, estudos sobre quimiossensibilidade avaliada pela expressão de NRF2, em tumores de mama de cadelas são necessários e devem ser realizados com a finalidade de investigar a expressão deste fator de transcrição nas possíveis recidivas e metástases a distância após o tratamento com determinados quimioterápicos, principalmente a carboplatina, muito estudada no tratamento de câncer de mama nesta espécie (LAVALLE, et al., 2012; MACHADO, et al., 2018; MACHADO, et al., 2022). Atualmente, o NRF2 ainda é apontado como importante fator para quimioresistência, devido aos elevados níveis de ROS, causados pela quimioterapia, que leva a ativação constitutiva do NRF2 conferindo proteção às células neoplásicas (KANG; HYUN, 2017; LEUNG, et al., 2020; WANG, et al., 2008; ZHONG, et al., 2013).

A avaliação pela curva ROC demonstrou, neste estudo, que o NRF2 não foi um bom preditor de óbito para cadelas com diferentes neoplasias mamárias e a comparação de curvas de sobrevida não tiveram significância estatística ( $p=0,141$ ). Entretanto, quando o tumor possui H-score menor, maior potencial de malignidade, logo maiores chances de evoluir ao óbito. Rutland e colaboradores (2021) relataram correlação direta da expressão de NRF2 em osteossarcomas caninos com sobrevida e Onodera e colaboradores (2014) ao estudarem a expressão de NRF2 em câncer de mama em mulheres encontraram forte correlação com fatores prognósticos e aumento da sobrevida livre da doença, no entanto neste estudo não foi possível observar essas correlações o que não torna o NRF2 como fator prognóstico independente para neoplasias mamárias na espécie canina.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo, nas condições metodológicas empregadas, permitiram concluir:

- A imunomarcação de NRF2 nos tumores mamários na espécie canina, apresentou localização predominantemente citoplasmática e difusa nas células epiteliais;
- O H-score do fator de transcrição - NRF2, foi menor nos tumores malignos de cadelas quando comparados ao grupo das neoplasias benignas e grupo controle, apresentando correlação inversa e significativa com os fatores prognósticos tamanho tumoral, estadiamento clínico e capacidade proliferativa (Ki-67);
- O ponto de corte proposto para avaliação do NRF2 nos tumores de mama na espécie canina possibilitou a segregação de cadelas com maior sobrevida.
- Em conjunto, os dados não conferiram um significativo valor clínico ao NRF2, desta forma ele não é um fator prognóstico independente em cadelas com neoplasias mamárias.

## REFERÊNCIAS

- ABDELMEGEED, SM.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease. **Oncol Lett**, v.15, n6, p. 8195-8205, 2018.
- ALENZA, P.; PEÑA, L.; CASTILLO, N. D.; NIETO, A. I. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. **Journal of Small Practice**, v.41, p.287-291, 2000.
- AMORIM, R.L.; SOUZA, C.H.M.; BANDARRA, E.P.; SANCHES, O.C.; PIZA, E.T. Immunohistochemical study of Estrogen and Progesterone Receptors and Cell Proliferative Indexes in Canine Inflammatory Mammary Carcinoma: 9 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v.1, p. 16-20, 2008.
- ANDRADE, F. H. E., FIGUEIROA, F. C., BERSANO, P. R. O., BISSACOT, D. Z., ROCHA, N. S. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. **Diagnostic Pathology**, v.45, p. 1-5, 2010.
- ARAÚJO, M. R.; CAMPOS L. C.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 29, n. 5, p. 1360-1367, 2015.
- ARLT, A.; BAUER, I.; SCHAFMAYER, C.; TEPEL, J.; MÜERKÖSTER, SS.; BROSCH, M.; RÖDER, C.; KALTHOFF, H.; HAMPE, J.; MOYER, MP.; FÖLSCH, UR.; SCHÄFER, H. Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). **Oncogene**, v.28, n.45, p.3983-96, 2009.
- ARTWOHL, M.; RODEN, M.; HÖLZENBEIN, T.; FREUDENTHALER, A.; WALDHÄUSL, W.; BAUMGARTNER-PARZER, S. M. Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. **International journal of obesity**, v.26, n.4, p. 577-580, 2002.
- BAE, I; FAN S; MENG, Q; RIH, JK; KIM, HJ; KANG, HJ; XU, J; GOLDBERG, ID; JAISWAL, AK; ROSEN, EM. BRCA1 induces antioxidant gene expression and resistance to oxidative stress. **Cancer research**, v. 64, n. 21, p. 7893-7909, 2004.
- BAIRD, L.; LLÈRES, D.; SWIFT, S.; DINKOVA-KOSTOVA, AT. Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the KEAP1-Nrf2 protein complex. **Proc Natl Acad Sci**, v.110, n.38, 15259-64, 2013
- BARINDA, AJ.; AROZAL, W.; SANDHIUTAMI, NMD.; LOUISA, M.; ARFIAN, N.; SANDORA, N.; YUSUF, M. Curcumin Prevents Epithelial-to Mesenchymal Transition-Mediated Ovarian Cancer Progression through NRF2/ETBR/ET-1 Axis and Preserves Mitochondria Biogenesis in Kidney after Cisplatin Administration. **Adv Pharm Bull**, v.12, n.1, p.128-141, 2022.
- BEAUVAIS, W.; CARDWELL, JM.; BRODBELT, DC. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs--a systematic review. **J Small Anim Pract**, v.53, n.6, p.314-22, 2012.
- BORGE, K.S.; MELIN, M.; RIVERA, P.; THORESEN, S.I.; WEBSTER, MT.; VON EULER, H.; LINDBLAD-TOH, K.; LINGAAS, F. The ESR1 gene is associated with risk for canine mammary tumours. **BMC Vet Res.**, v.10, n.9, 2013.
- BROD, J.M.; DEMASI, A.P.D.; MONTALLI, V.A.; TEIXEIRA, L.N.; FURUSE, C.; AGUIAR, M.C.; SOARES, A.B.; SPERANDIO, M.; ARAUJO, VC. Nrf2-peroxiredoxin I axis in polymorphous adenocarcinoma is associated with low matrix metalloproteinase 2 level. **Virchows Arch**, v.471, n.6, p.793-898, 2017.
- BROWDER, T.; BUTTERFIELD, C. E.; KRALING, B. M.; MARSHALL, B.; O'REILLY, M. S.; FOLKMAN, J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. **Cancer Res.**, v. 60, p.1878–1886, 2000.

- BUKAU, B.; WEISSMAN, J.; HORWICH, A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, v.125, n.3, p.443-51, 2006.
- CAMPOS, C. B.; LAVALLE, G. E. Exame clínico. In.: CASSALI, G. D. **Patologia mamária canina do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, cap. 13, 224p, 2017.
- CASSALI, G. ; JARK, P.; GAMBA, C.; DAMASCENO, K.; ESTRELA-LIMA, A.; NARDI, A.; FERREIRA, E.; HORTA, R.; FIRMO, B.; SUEIRO, F.; RODRIGUES, L.; NAKAGAKI, K. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 13, n. 3, p. 555-574, 2020.
- CASSALI, G.D.; BERTAGNOLLI A.C.; FERREIRA, E.; DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; DE CAMPOS, C.B. Canine mammary mixed tumours: a review. **Vet Med Int**, v. 2012, 2012.
- CAVALCANTI, M. F.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v.61, p.56-63, 2006.
- CHANG, C.C.; TSAI, M.H.; LIAO, J.W.; CHAN, J.P.; WONG, M.L.; CHANG SC. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. **J Am Vet Med Assoc**, v.235,n.4, p.391-6, 2009.
- CHEN, MJ.; LIN, PL.; WANG, L.; CHENG, YM.; CHEN, CY.; LEE, H. Cytoplasmic, but not nuclear Nrf2 expression, is associated with inferior survival and relapse rate and response to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer. **Thorac Cancer**, v.11, n.7, p.1904-1910, 2020.
- CHEN, W.; SUN, Z.; WANG, XJ.; JIANG, T.; HUANG, Z.; FANG, D.; ZHANG, DD. Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. **Mol Cell**, v.34, n.6, p.663-73, 2009.
- CHOWDHRY, S.; ZHANG, Y.; MCMAHON, M.; SUTHERLAND, C.; CUADRADO, A.; HAYES, JD. Nrf2 is controlled by two distinct  $\beta$ -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. **Oncogene**, v.32, n.32, p.3765-81, 2013.
- CHO, HY.; KIM, K.; KIM, YB.; KIM, H.; NO, JH. Expression Patterns of Nrf2 and KEAP1 in Ovarian Cancer Cells and their Prognostic Role in Disease Recurrence and Patient Survival. **Int J Gynecol Cancer**, v.27, n.3, p.412-419, 2017.
- CLEARY, M. P.; GROSSMAN, M. E.; RAY, A. Effect of obesity on breast cancer development. **Veterinary Pathology**, p.1-12, 2010
- COLLADO, M.; SERRANO, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. **Nat Rev Cancer**.v.10, n.1,p.51-57, 2010.
- COSTANZO, M.; ROMEO, A.; CISTERNA, B.; CALDERAN, L.; BERNARDI, P.; COVI, V.; TABARACCI, G.; MALATESTA, M. Ozone at low concentrations does not affect motility and proliferation of cancer cells in vitro. **Eur J Histochem**, v.2, n. 64, p.3119 2020.
- COSTA-SANTOS, K.; DAMASCENO, K.; PORTELA, RD.; SANTOS, FL.; ARAÚJO, GC.; MARTINS-FILHO, EF.; SILVA, LP.; BARRAL, TD.; SANTOS, SA.; ESTRELA-LIMA, A. Lipid and metabolic profiles in female dogs with mammary carcinoma receiving dietary fish oil supplementation. **BMC Vet Res**, v.15, n1, p.401, 2019.
- DAIRKEE, S. H.; NICOLAU, M.; SAYEED, A.; CHAMPION, S.; JI, Y.; MOORE, DH.; YONG, B.; MENG, Z.; JEFFREY, SS. Oxidative stress pathways highlighted in tumor cell immortalization: association with breast cancer outcome. **Oncogene**, v. 26, n. 43, p. 6269-6279, 2007
- DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 608p, 2006.

- DAYALAN NAIDU S.; KOSTOV, RV.; DINKOVA-KOSTOVA, AT. Transcription factors Hsf1 and Nrf2 engage in crosstalk for cytoprotection. **Trends Pharmacol Sci**, v.36, n.1, 2015.
- DE LA VEGA, MONTSERRAT ROJO; CHAPMAN, ELI; ZHANG, DONNA D. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. **Cancer Cell**, v. 34, n. 1, p. 21-43, 2018.
- DETRE, S.; JOTTI, GS; DOWSETT, M.A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **J Clin Pathol**, v. 48, n. 9, pág. 876-878, 1995.
- DIEUDONNÉ, M. N.; SAMMARI, A.; DOS SANTOS, E.; LENEVEU, M. C.; GIUDICELLI, Y.; PECQUERY, R. Sex steroids and leptin regulate 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase I and P450 aromatase expressions in human preadipocytes: sex specificities. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v.99, n.4, p.189-196, 2006.
- DINKOVA-KOSTOVA, AT.; HOLTZCLAW, WD.; COLE, RN.; ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; YAMAMOTO, M.; TALALAY, P. Direct evidence that sulphydryl groups of KEAP1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. **Proc Natl Acad Sci**, v.99, n.18, p.11908-13, 2002.
- DONNELLY, N.; STORCHOVA, Z. Aneuploidy and proteotoxic stress in cancer. **Mol Cell Oncol**, v.25, n.2, 2015.
- DONG, X.; BISWAS, A.; SÜEL, K.E.; JACKSON, L.K.; MARTINEZ, R.; GU, H.; CHOOK, YM. Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. **Nature**, v.458, p.1136-41, 2009.
- DROŽDZIK, AGNIESZKA; KOWALCZYK, R.; JAWOROWSKA, E.; URASIŃSKA, E.; KURZAWSKI, M. The role of Nrf2 in pathology of pleomorphic adenoma in parotid gland. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 21, p. 1243, 2015.
- DUTRA, A.P., AZEVEDO JUNIOR, G.M., SCHIMITT, F.C., CASSALI, G.D. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary Gland tumors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 6, p. 1403-1412, 2008.
- ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Assessment of histological gradeSystemic pathology. **The breast** (3rd ed.). London: Churchill Livingstone, p.365-384, 1998.
- ESTRELA-LIMA A.; ARAÚJO, M.S.; COSTA-NETO, J.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S.M.; CARDOSO, S.V.; MARTINS-FILHO, O.A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**, v.4, n.10, p.256, 2010.
- ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S.; COSTA-NETO, J. M.; RIBEIRO, L. G.; DAMASCENO, K. A.; D'ASSIS, J. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. **Breast Cancer Research And Treatment**, Boston, v. 131, n. 3, p. 751-763, 2012.
- EZERSKYTE, A.; ZAMOKAS, G.; GRIGONIS, A.; JUODZIUKYNIENE, N. The retrospective analysis of mammary tumors in dogs. **Veterinarija ir Zootechnika**, v.53, n.75, p.3-8, 2011.
- FARAONIO, R.; VERGARA, P.; DI MARZO, D.; PIERANTONI, MG.; NAPOLITANO, M.; RUSSO, T.; CIMINO, F. p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. **J Biol Chem**, v.281, n.52, 2006.

- FAZEKAS, J.; FÜRDÖS, I.; SINGER, J.; JENSEN-JAROLIM, E. Why man's best friend, the dog, could also benefit from an anti-HER-2 vaccine. **Oncol Lett**, v.12, n.4, p. 2271-2276, 2016.
- FEDCHENKO, N.; REIFENRATH, J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. **Diagn Pathol**, v.9, p.221, 2014.
- FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; CAVALCANTI, M.F.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. The relationship between tumor size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumors. **Veterinary and comparative oncology**, Belo Horizonte, v. 7, n. 4, p. 230-235, 2009.
- FONSECA, C.S.; DALECK, C.R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovário-histerectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v. 30, p. 731-735, 2000.
- FORNEROD, M.; OHNO, M.; YOSHIDA, M. and Mattaj, I. W.CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. **Cell**, v. 90, p.1051-1060, 1997.
- FOX, D. B.; GARCIA, N. M. G.; MCKINNEY, B. J.; LUPO, R.; NOTEWARE, L. C.; NEWCOMB, R.; ALVAREZ, J. V. NRF2 activation promotes the recurrence of dormant tumour cells through regulation of redox and nucleotide metabolism. **Nature metabolism**, v. 2, n. 4, p. 318-334, 2020.
- FUJITA, Y.; MURAKAMI, M.; OGAWA, Y.; MASUZAKI, H.; TANAKA, M.; OZAKI, S.; NAKAO, K.; MIMORI, T. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. **Clin Exp Immunol**, v.128, n.1, 2002.
- GAO, C.M; TAKEZAKI, T.; WU, J.Z.; LIU, Y.T.; DING, J.H.; LI, S.P.; SU, P.; HU, X.; KAI, H.T.; LI, ZY.; MATSUO, K.; HAMAJIMA, N.; SUGIMURA, H.; TAJIMA, K. Polymorphisms in thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and the susceptibility to esophageal and stomach cancer with smoking. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.5, n.2, p-133-8, 2004.
- GAO, J.; CHU, P.; LIU, C.; SUN, Z.; LIU, Q.; YANG, Y. Discovery and biological evaluation of a small-molecule inhibitor of CRM1 that suppresses the growth of triple-negative breast cancer cells. **Traffic**, v.22, n.7, p.221-229, 2021.
- GENELHU, MC.; CARDOSO, SV.; GOBBI, H.; CASSALI, GD. A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands. **BMC Cancer**, v.28, n.7, 2007.
- GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Vet. Pathol**, v.48, p.117-131, 2011.
- GORRINI, C; BANIASADI, OS; HARRIS, IS; SILVESTER, J; INOUE, S; SNOW, B; JOSHI, PA; WAKEHAM, A; MOLYNEUX SD; MARTIN B; BOUWMAN P; CESCON, DW; ELIA AJ; WINTERTON-PERKS, Z; CRUICKSHANK, J; BRENNER, D; TSENG, A; MUSGRAVE, M; BERMAN HK; KHOKHA, R; JONKERS, J; MAK, TW; GAUTHIER, ML. BRCA1 interacts with Nrf2 to regulate antioxidant signaling and cell survival. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 8, p. 1529-1544, 2013.
- GÖRLICH, D.; KUTAY U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.15, p.607-60, 1999.
- GUINA, T.; BIASI, F.; CALFAPIETRA, S.; NANO, M.; POLI, G Inflammatory and redox reactions in colorectal carcinogenesis.. **Ann NY Acad Sci**, v.1340, p.95-103, 2015.
- GUNDIM, L. F.; ARAUJO, C. P.; BLANCA, W. T.; GUIMARAES, E. C.; MEDEIROS, A. A. Clinical staging in 508 bitches with mammary tumours: Influence of type and histological grade. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 80, n. 4, p. 318-322, 2016

- HART, B.L.; HART, LA.; THIGPEN, AP.; WILLITS, NH. Assisting Decision-Making on Age of Neutering for 35 Breeds of Dogs: Associated Joint Disorders, Cancers, and Urinary Incontinence. **Front Vet Sci**, v.7, n.7, p.388, 2020.
- HAYES, J.D.; MCMAHON M. RF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. **Trends Biochem Sci**, v.34, n.4, p.176-88, 2009.
- HEDLUND, C.S. **Cirurgias do Sistema Reprodutor**. Cirurgia de Pequenos Animais. 3ed. Mosby Elsevier, p.731-732, 2008.
- HUANG, C.F.; DENG, W.W.; ZHANG, L.; ZHANG, W.F.; SUN, Z.J. Expression of LC3, LAMP2, KEAP1 and NRF2 in Salivary Adenoid Cystic Carcinoma. **Pathol Oncol Res**, v.22, n.1, p.109-14, 2016.
- HWANG, ES; BOWEN PE. DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. **Crc Cr Rev Food Sci**, v.47, p.27-50, 2007.
- ICHIMURA, Y.; WAGURI, S.; SOU, Y.S.; KAGEYAMA, S.; HASEGAWA, J.; ISHIMURA, R.; SAITOT, Y.Y.; KOUNO, T.; FUKUTOMI, T.; HOSHII, T.; HIRAO, A.; TAKAGI, K.; MIZUSHIMA, T.; MOTOHASHI, H.; LEE, M.S.; YOSHIMORI, T.K.; YAMAMOTO, M.; KOMATSU, M. Phosphorylation of p62 activates the KEAP1-Nrf2 pathway during selective autophagy. **Mol Cell**, v.51, p.618-31, 2013.
- ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; ISHII, T.; IGARASHI, K.; ENGEL, J.D.; YAMAMOTO, M. KEAP1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes Dev**, v.13, n.1, p.76-86, 1999.
- ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; ISHII, T.; O'CONNOR, T.; YAMAMOTO, M. KEAP1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. **Genes Cells**, v.8, n.4, p.379-91, 2003.
- JANS, D.A.; HÜBNER, S. Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. **Physiol Rev**, v.76, n.3, p.651-85, 1996.
- JARAMILLO MC, ZHANG DD. The emerging role of the Nrf2-KEAP1 signaling pathway in cancer. **Genes Dev**, v.27, n.20, 2013.
- KADTHUR, J. C.; RAO, S.; SONNAHALLIPURA, B. M.; THIMMANAHALLI, D.S.; LAXMIKANTH, M. Prognostic value of Ki-67 proliferation antigen in canine malignant mammary gland tumours. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, p.36-40, 2011.
- KANG, K.A.; HYUN, J.W. Oxidative Stress, Nrf2, and Epigenetic Modification Contribute to Anticancer Drug Resistance. **Toxicol Res**, v.33, n.1, 2017.
- KANSANEN, E.; KIVELÄ, A.M.; LEVONEN, A.-L. Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. **Free Radical Biology and Medicine**, v.47, p.1310-1317, 2009.
- KANSANEN, E.; JYRKKÄNEN, H.K.; LEVONEN, A.L. Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. **Free Radic Biol**, v.52, n.6, p.973-82, 2012.
- KANSANEN, E.; KUOSMANEN, S.M.; LEINONEN, H.; LEVONEN, A.L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. **Redox Biol**, v.1, n.1, p.45-9, 2013.
- KARIHTALA, P.; KAUPPILA, S.; PUISTOLA, U.; JUKKOLA-VUORINEN, A. Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2- nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. **Histopathology**, v.58, n.6, p.854-62, 2011.
- KARIHTALA, P.; WINQVIST, R.; SYVÄOJA, J.E.; KINNULA, V.L.; SOINI, Y. Increasing oxidative damage and loss of mismatch repair enzymes during breast carcinogenesis. **Eur. J. Cancer**, v.42, n.15, 2006.

- KATOH, Y.; ITOH, K.; YOSHIDA, E.; MIYAGISHI, M.; FUKAMIZU, A.; YAMAMOTO, M. Two domains of Nrf2 cooperatively bindCBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. **Genes Cells**, v.6, p.857–868, 2001.
- KANG, K.A.; HYUN, J.W. Oxidative Stress, Nrf2, and Epigenetic Modification Contribute to Anticancer Drug Resistance. **Toxicol Res**, v.33, n.1, p.1-5, 2017.
- KIM, Y.J.; AHN, J.Y.; LIANG, P.; IP, C.; ZHANG, Y.; PARK, Y.M. Human prx1 gene is a target of Nrf2 and is up-regulated by hypoxia/reoxygenation: implication to tumor biology. **Cancer Res**, v.67, n.2, p.546-54, 2007.
- KIMMELMAN, AC.;WHITE, E. Autophagy and Tumor Metabolism. **Cell Metab**, v.25, n.5, p.1037-1043, 2017.
- KLAUNIG, J.E.;KAMENDULIS, L.M.; HOCEVAR, B.A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicol Pathol**, v.38, p.96-109, 2010.
- KOMATSU, M.; KUROKAWA, H.; WAGURI, S.; TAGUCHI, K.; KOBAYASHI, A.; ICHIMURA, Y.; SOU, YS.; UENO, I.; SAKAMOTO, A.; TONG, KI.; KIM, M.; NISHITO, Y.; IEMURA, S.; NATSUME, T.; UENO, T.; KOMINAMI, E.; MOTOHASHI, H.; TANAKA, K.; YAMAMOTO, M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of KEAP1. **Nat Cell Biol**, v.12, n.3, p.213-23, 2010.
- KURYSZKO, J.; SŁAWUTA, P.; SAPIKOWSKI, G. Secretory function of adipose tissue. **Polish Journal of Veterinary Science**, v. 19, p. 441-446, 2016.
- KUSTRITZ, MV. Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats. **J Am Vet Med Assoc**, v.231, n.11, p. 1665-75 2007.
- KWAK, MK.; WAKABAYASHI, N.; GREENLAW, JL.; YAMAMOTO, M.; KENSLER TW. Os antioxidantes aumentam a expressão do proteassoma de mamíferos através da via de sinalização KEAP1-Nrf2. **Mol Cell Biol**, v.23, p. 8786-94, 2003.
- LANA, SE.; RUTTEMAN, GR.;WITHROW, SJ. Tumors of the mammary gland. In: Withrow FJ and Vail DM (eds). **Withrow & MacEwen's Small animal clinical oncology**. 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 2007, pp 619–636.
- LAU, A; VILLENEUVE,NF; SUN, Z; WONG, PK; ZHANG, DD. Dual Roles of Nrf2 in Cancer. **Pharmacol Res**, v. 58, n. 5-6, p. 262-270, 2008.
- LAU, A.; WANG, XJ.; ZHAO, F.; VILLENEUVE, NF.; WU, T.; JIANG, T.; SUN, Z.; WHITE, E.; ZHANG, DD. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between KEAP1 and p62. **Mol Cell Biol**, v.30, n.13, p.3275-85, 2010.
- LAVALLE, G. E.; BERTAGNOLLI, A. C.; TAVARES, W. T.; et al. COX-2 expression in canine mammary carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. **Veterinary Patohology**, v. 46, 2009.
- LAVALLE, G. E.; CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C.; CASSALI, G. D. Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. **In Vivo**. v.26, p.375-380, 2012.
- LEINONEN, H.M.; KANSANEN, E.; PÖLÖNEN, P.; HEINÄNIEMI, M.; LEVONEN, A.L. Dysregulation of the KEAP1-Nrf2 pathway in cancer. **Biochem Soc Trans**, v.43, n.4, p.645-49, 2015.
- LEUNG MH.; TSOI, H.; GONG, C.; MAN, EP.; ZONA, S.; YAO, S.; LAM, EW.; KHOO, US. A Splice Variant of NCOR2, BQ323636.1, Confers Chemoresistance in Breast Cancer by Altering the Activity of NRF2. **Cancers (Basel)**, v.12, n.3, p.533, 2020.
- LI, L.; PAN, H.; WANG, H.; LI, X.; BU, X.;WANG, Q.; GAO, Y.; WEN, G.; ZHOU, Y.; CONG, Z.; YANGY; TANG, C.; LIU Z. Interplay between VEGF and Nrf2 regulates angiogenesis due to intracranial venous hypertension. **Sci Rep.**, v.6, 2016.

- LI, W.; KONG, AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. **Mol Carcinog**, v.48, n.2, p.91-104, 2009.
- LI, W.; JAIN, MR.; CHEN, C.; YUE, X.; HEBBAR, V.; ZHOU, R.; KONG, AN. Nrf2 Possesses a redox-insensitive nuclear export signal overlapping with the leucine zipper motif. **J Biol Chem**, v.280, n.31, 2005.
- LIM, H.Y.; IM, K.S.; KIM, N.H.; KIM, H.W.; SHIN, J.I.; YHEE, J.Y.; SUR, J.H. Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors. **Vet Pathol**, v.52, n6,p.1045-41, 2015.
- LIN, PL.; CHANG, J.T.; WU, DW.; HUANG, C.C.; LEE, H. Cytoplasmic localization of Nrf2 promotes colorectal cancer with more aggressive tumors via upregulation of PSMD4. **Free Radic Biol**, v.95, p.121-32, 2016.
- MA, J; CAI, H; WU, T; SOBHIAN, B; HUO, Y; ALCIVAR, A; MEHTA, M; CHEUNG, KL; GANESAN, S; KONG, NA; ZHANG, DD; XIA, B. PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function. **Molecular and cellular biology**, v. 32, n. 8, p. 1506-1517, 2012.
- MACHADO, M.C.; DA COSTA-NETO, J.M.; PORTELA, R.D.; D'ASSIS, MJMH.; MARTINS-FILHO, O.A.; BARROUIN-MELO, S.M.; BORGES, N.F.; SILVA, F.L.; ESTRELA-LIMA, A. The effect of naltrexone as a carboplatin chemotherapy-associated drug on the immune response, quality of life and survival of dogs with mammary carcinoma. **PLoS One**, v.13, n.10, 2018.
- MACHADO, MC.; YAMAMOTO, PA.; PIPPA, LF.; DE MORAES, NV.; NEVES, FMF.; PORTELA, RD.; BARROUIN-MELO, SM.; HIELM-BJÖRKMAN, A.; GODOY, A.L.P.; ESTRELA-LIMA, A. Pharmacokinetics of Carboplatin in Combination with Low-Dose Cyclophosphamide in Female Dogs with Mammary Carcinoma. **Animals**, v.12, n.22, 2022.
- MACHADO, S.; RIBEIRO, R.; QUEIROZ, JH.DE.; GOUVEIA, C. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, v.21, n.33, p. 133–149, 2006.
- MATOS, A.J.F.; LOPES, C.C.C.; FAUSTINO, A.M.R.; CARVALHEIRA, J.G.V.; DOS SANTOS, M.S.A.; RUTTEMAN, G.R.; GARTNER, M.F.R.M. MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. **Anticancer research**. Atenas, v.26, p. 1821-1826, 2006.
- MAYNE, ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J Nutr**. v. 133, p.933-40, 2003.
- MELIN,M.;RIVERA,P.;ARENDT,M.;ELVERS,I.;MURÉN,E.;GUSTAFSON,U.;STARK EY,M.;BORGE,K.S.;LINGA,F.;HÄGGSTRÖM,J.;SAELLSTRÖM,S.;RÖNNBERG,H.;L INDBLAD-TOH, K. Genome-Wide Analysis Identifies Germ-Line Risk Factors Associated with Canine Mammary Tumours. **PLoS Genet**, v.9, n.12, 2016.
- MICHEL, E.;FELDMANN, S.K.; KOWALEWSKI, M.P.;BLEY, C.R.; BOOS, A.; GUSCETTI, F.;REICHLER, IM. Expression of prolactin receptors in normal canine mammary tissue, canine mammary adenomas and mammary adenocarcinomas. **BMC Vet Res**, v.30, n.8, p.72, 2012
- MISDORP W; ELSE R.W; HELLMÉN E.; LIPSCOMB T.P. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat, p.11-58. In: *Ibid.* (Eds), World Health Organization. **International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second Series**. Vol.7. 1999. WHO, Geneva, Switzerland.
- MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: Iowa State Press, Cap. 12, p. 575-606, 2002.
- MOHR, A.; LÜDER RIPOLI, F.; HAMMER, S.C.; WILLENBROCK, S.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; KIEŁBOWICZ, Z.; MURUA ESCOBAR, H.; NOLTE, I. Hormone

Receptor Expression Analyses in Neoplastic and Non-Neoplastic Canine Mammary Tissue by a Bead Based Multiplex Branched DNA Assay: A Gene Expression Study in Fresh Frozen and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Samples. **PLoS One**, v.11, n.9, 2016

MOI, P.; CHAN, K.; ASUNIS, I.; CAO, A.; KAN, Y.W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. **Proc Natl Acad Sci**, v.91, n.11, p.9926-30, 1994.

MOL, J.A.; SELMAN, P.J.; SPRANG, E.P.; VAN NECK, J.W.; OOSTERLAKEN-DIJKSTERHUIS, M.A. The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. **J Reprod Fertil**, v.51, p.339-44 1997.

MORRISON, W.B. **Cancers in dogs and cats. Medical and surgical management.** Philadelphia: Willians & Wilkins, p.785, 1998.

MOSSER, D.D.; MORIMOTO, R.I. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. **Oncogene**, v.23, n.16, p.2907-18, 2004.

MOSTAFAVI-POUR, Z.; RAMEZANI, F.; KESHAVARZI, F.; SAMADI, N. The role of quercetin and vitamin C in Nrf2-dependent oxidative stress production in breast cancer cells. **Oncol Lett**, v.13, n.3, p.1965-1973, 2017.

MUNDAY, J.S.; ARIYARATHNA, H.; ABERDEIN, D.; THOMSON, N.A.

Immunostaining for p53 and p16CDKN2A Protein Is Not Predictive of Prognosis for Dogs with Malignant Mammary Gland Neoplasms. **Vet Sci**, v.6, n.1, p.34, 2019.

MUNSON, L.; MORESCO, A. Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. **Breast Disease**, v. 28, p.7-21, 2007

MURAKAMI, S.; MOTOHASHI, H. Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation. **Free Radic Biol Med**, v. 88, p.168-78, 2015.

MURATA, M.; THANAN, R.; MA, N.; KAWANISHI, S. Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. **J Biomed Biotechnol**, 2012.

MUTSAERS, A.J. Metronomic Chemotherapy. **Top. Comp. Anim. Med.**, v.24, n.3, p.137-143, 2009.

NGUYEN, F.; PENA, L.; IBISCH, C.; LOUSSOUARN, D.; GAMA, A.; RIEDER, N. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer: a retrospective observational study. Part 1: Natural history and prognostic factors. **Breast Cancer Res Treat**, v.78, p.141-148, 2017.

NICCHIO, B. O.; BARROUIN-MELO, S.M.; MACHADO, M.C.; VIEIRA-FILHO, C.H.; SANTOS, F.L.; MARTINS-FILHO, E.F.; BARBOSA, V.F.; BARRAL, T.D.; PORTELA, R.W.; DAMASCENO, K.A.; ESTRELA-LIMA, A. Hyperresistinemia in Obese Female Dogs With Mammary Carcinoma in Benign-Mixed Tumors and Its Correlation With Tumor Aggressiveness and Survival. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 1-14, 2020.

NIOI, P.; NGUYEN, T.; SHERRATT, P.J.; PICKETT, C.B. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. **Mol Cell Biol**, v.25, p.10895-10906, 2005.

NOURAZARIAN, AR.; KANGARI, P.; SALMANINEJAD, A. Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.15, n.12, p.4745-51, 2014.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. **Hormones**. 2.ed. San Diego : Academic, 1997. 558p.

NUNES, F.C.; DAMASCENO, K.A.; DE CAMPOS, C.B.; BERTAGNOLLI, A.C.; LAVALLE, G.E.; CASSALI, GD. Mixed tumors of the canine mammary glands:

- Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. **Vet Anim Sci**, v.22, n.7, 2018.
- ONODERA Y, MOTOHASHI H, TAKAGI K, MIKI Y, SHIBAHARA Y, WATANABE M, ISHIDA T, HIRAKAWA H, SASANO H, YAMAMOTO M, SUZUKI T. NRF2 immunolocalization in human breast cancer patients as a prognostic factor. **Endocr Relat Cancer**, v.27, n.2, 241-52, 2014.
- OHTA, T.; IIJIMA, K.; MIYAMOTO, M.; NAKAHARA, I.; TANAKA, H.; OHTSUJI, M.; SUZUKI, T.; KOBAYASHI, A.; YOKOTA, J.; SAKIYAMA, T.; SHIBATA, T.; YAMAMOTO, M.; HIROHASHI, S. Loss of KEAP1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. **Cancer Res**, v.68, n.5, p.1303-09, 2008
- OWEN, L. N. **The TNM Classification of tumors in domestic animals**, 1st Ed. World Health Organization, Geneva, 20-80, 1980.
- PAJARES, M.; JIMÉNEZ-MORENO, N.; GARCÍA-YAGÜE, ÁJ.; ESCOLL, M.; DE CEBALLOS,ML.;VANLEUVEN,F.;RÁBANO,A.;YAMAMOTO,M.;ROJO, AI.;CUADRADO,A. Transcription factor NFE2L2/NRF2 is a regulator of macroautophagy genes. **Autophagy**, v.12, n.10, p.1902-1916, 2016.
- PANDE, D.;NEGI, R.;KARKI, K.; KHANNA, S.; KHANNA, R.S.; KHANNA, H.D. Oxidative damage markers as possible discriminatory biomarkers in breast carcinoma. **Transl. Res**, v.16, n.6, p.411-8, 2012.
- PANDEY, P; SINGH, AK; SINGH, M; TEWARI, M; SHUKLA, HS; GAMBHIR, IS. The see-saw of KEAP1-Nrf2 pathway in cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 116, p. 89-98, 2017.
- PAREJA, F.; GEYER, F. C.; MARCHIÓ, C.; BURKE, K. A.; WEIGELT, B.; REIS-FILHO, J. S. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. **NPJ Breast Cancer**, v. 2, p. 1-11, 2016.
- QUEIROGA, F. L.; RAPOSO, T.; CARVALHO, M. I.; PRADA, J; PIRES, I. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. **In Vivo**, v.25, p. 455-465, 2011.
- QUEIROGA, F.; LOPES C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.97, n.543, p. 2119-2127, 2002.
- ROTBLAT, B.; MELINO, G.; KNIGHT, RA. NRF2 and p53: Januses in cancer? **Oncotarget**, v.3, n.11, p.1272-83, 2012.
- ROSE, D.P.; KOMNINOU, D.; STEPHENSON, G.D. Abesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. **Obes Ver**, v5.n13, p.153-65, 2004.
- ROSENTHAL RC. **Segredos em oncologia veterinária**. Porto Alegre: Artmed. p.99-199. 2004
- RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 2.ed. Philadelphia: Sanders, p.455-477, 2001.
- RUTLAND, CS; COCKCROFT, JM; LOTHION-ROY, J.; HARRIS, AE; JEYAPALAN, JN; SIMPSON, S.; ALIBHAI, A.; BAILEY, C.; BALLARD-REISCH, AC.; RIZVANOV, A.; DUNNING, M.D.; BROT, S.; MONGAN, NP. Immunohistochemical Characterisation of GLUT1, MMP3 and NRF2 in Osteosarcoma. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 2021.
- SAJADIMAJD, S.; KHAZAEI, M. Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. **Curr Cancer Drug Targets**. v.18, n.6, p538-557, 2018.

- SANTOS, S. C. A. **Padrão de incidência e análise espacial de tumor de mama em cadelas.** 2020. 86p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, 2020.
- SANTOS, M.; CORREIA-GOMES, C.; MARCOS, R.; SANTOS, A.; DE MATOS, A.; LOPES, C.; DIAS-PEREIRA, P. Value of the Nottingham Histological Grading Parameters and Nottingham Prognostic Index in Canine Mammary Carcinoma. **Anticancer Res**, v.35, n.7, p.4219-27, 2015.
- SARLI, G.; PREZIOSI, R.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; MARCATO, P.S. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. **Journal of veterinary diagnostic investigation**. Columbia, v.14, p. 14-25, 2002.
- SASSEK M.; PRUSZYNSKA-OSZMALEK E.; NOWACKA-WOSZUK J.; SZCZERBAL I.; SZCZEPANKIEWICZ D.; KACZMAREK P.; KOLODZIEJSKI P.A.; SWITONSKI M.; MACKOWIAK P. Resistin – from gene expression to development of diabetes. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 27, p. 647–654, 2013
- SASSI, F.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; SARLI, G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC Veterinary Research**, v.6, n.5, 2010.
- SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v.43, p.1249-1261, 1969.
- SEUNG, B.J.; CHO, S.H.; KIM, S.H.; BAE, M.K.; LIM, H.Y.; KWAK, S.W.; SUR, J.H. Impact of Histological Subtype on Survival in Canine Mammary Carcinomas: a Retrospective Analysis of 155 Cases. **J Comp Pathol**, v186, p.23-30, 2021.
- SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 625-633, 2004
- SIMPLICIO-REVOREDO, C. MARIA; DE OLIVEIRA PEREIRA, R.; DE ALMEIDA MELO, M.; LOPES-COSTA, V.P.; DE TARSO MOURA-BORGES P.; SOUSA E. BRANDÃO; NETO F. MANES; CAMPELO V.; SOARES-LOPES I; MARIA RIBEIRO, DA CONCEIÇÃO BARROS-OLIVEIRA M.; TAVARES C. BRAGA; SANTOS A.
- SOLIS, L.M.; BEHRENS, C.; DONG, W.; SURAOKAR, M.; OZBURN, N.C.; MORAN, C.A.; CORVALAN, A.H.; BISWAL, S.; SWISHER, S.G.; BEKELE, B.N.; MINNA, J.D.; STEWART, D.J.; WISTUBA, II. Nrf2 and KEAP1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. **Clin Cancer Res**, v.16, n.14, p.3743-53, 2010.
- RIBEIRO DOS; DE ARAÚJO C. GUEDES BORGES. Expression of Nrf2 and NF-κB transcription factors in breast cancer and breast fibroadenoma: Insights for a new therapeutic approach. **Oncotarget**, v. 11, n. 18, pág. 1629, 2020.
- SOINI, Y.; ESKELINEN, M.; JUVONEN, P.; KÄRJÄ, V.; HAAPASAARI, KM.; SAARELA, A.; KARIHTALA, P. Nuclear Nrf2 expression is related to a poor survival in pancreatic adenocarcinoma. **Pathol Res Pract**, v.210, n.1, p.35-9, 2014.
- SOLIMAN, N.A.; KESHK, WA.; SHOHEIB, ZS.; ASHOUR, D.S.; SHAMLOULA, MM. Inflammation, oxidative stress and L-fucose as indispensable participants in schistosomiasis-associated colonic dysplasia. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.15. n.3, p.1125-31, 2014.
- SORENMO, K. U. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, n. 3, p. 573-596, 2003.
- SORENMO, K. W.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**,

- v.48.n.1, p.85-97, 2011.
- SORENMO, K.U.; WORLEY, D.; GOLDSCHMIDT, M.H. Mammary gland tumors. In: Withrow SJ, Vail DM, Page RL, editors. **Small animal clinical oncology by Withrow and MacEwen**. 5th edition. Saunders Elsevier; São Luís: pp. 538–556, 2013.
- SOTGIA, F.; WHITAKER-MENEZES, D.; MARTINEZ-OUTSCHOORN, U.E.; SALEM, A.F.; TSIRIGOS, A.; LAMB, R.; SNEDDON, S.; HULIT, J.; HOWELL, A.; LISANTI, M.P. Mitochondria "fuel" breast cancer metabolism: fifteen markers of mitochondrial biogenesis label epithelial cancer cells, but are excluded from adjacent stromal cells. **Cell Cycle**, v.11, n.23, p.4390-401, 2012.
- SPOERRI, M.; GUSCETTI, F.; HARTNACK, S.; BOOS, A.; OEI, C.; BALOGH, O.; NOWACZYK, R.M.; MICHEL, E.; REICHLER, I.M.; KOWALEWSKI, M.P. Endocrine control of canine mammary neoplasms: serum reproductive hormone levels and tissue expression of steroid hormone, prolactin and growth hormone receptors. **BMC Vet Res**, v.15, n.11, 2015.
- SPORN, M.B.; LIBY KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. **Nat Rev Cancer**, v.12, n.8,p.564-71, 2012.
- SUN, Z.; WU, T.; ZHAO, F.; LAU, A.; BIRCH, C.M.; ZHANG, DD. KPNA6 (Importin {alpha}7)-mediated nuclear import of KEAP1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response. **Mol Cell Biol**, v.31, n.9,p.1800-11, 2011.
- TAGUCHI, K; MOTOHASHI, H; YAMAMOTO, M. Molecular mechanisms of the KEAP1–Nrf2 pathway in stress response and cancer. Evolution. **Genes Cells**, v. 16, n. 2, p. 123-140, 2011.
- TERTIL, M.; GOLDA, S.; SKRZYPEK, K.; FLORCZYK, U.; WEGLARCZYK, K.; KOTLINOWSKI, J.; MALESZEWSKA, M.; CZAUDERNA, S.; PICHON, C.; KIEDA, C.; JOZKOWICZ, A.; DULAK, J. Nrf2-heme oxygenase-1 axis in mucoepidermoid carcinoma of the lung: Antitumoral effects associated with down-regulation of matrix metalloproteinases. **Free Radic Biol Med**, v.89, p.147-57, 2015.
- TERZIAN, A.C.B.; ZUCARRI, D.A.P.C.; PEREIRA, R.S.; PAVAM, M. V.; RUIZ, C.M.; SUEIRO, F.A.R.; COELHO, J. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v.44, n.2, p.96-102, 2007.
- THEODORE, M.; KAWAI, Y.; YANG, J.; KLESHCHENKO, Y.; REDDY, S.P.; VILLALTA, F.; ARINZE, IJ. Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. **J Biol Chem**, v.283, n.14, 2008.
- THUMSER-HENNER, P.; NYTKO, K.J.; ROHRER BLEY, C. Mutações de BRCA2 em tumores mamários caninos e seu potencial de direcionamento na terapia clínica. **Pesquisa veterinária BMC** , v. 16, n. 1, p. 1-9, 2020.
- TORÍBIO, J. M. D. M. L.; LIMA, A. E.; MARTINS FILHO, E. F.; RIBEIRO, L. G. R.; D'ASSIS, M. J. M. H.; TEIXEIRA, R. G.; DAMASCENO, K. A.; CASSALI, G. D.; COSTA NETO, J. M. D. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres**, v.59, n.4, p. 427-433, 2012.
- VAN GOLEN, K.L.; WU, Z.F.; QIAO, X.T.; BAO, L.W.; MERAJVER, S.D. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. **Cancer Research**, v. 60, p. 5832-8, 2000.
- VIEIRA-FILHO, C. H.; BARROUIN-MELO, S. M.; DAMASCENO, K. A.; ARAÚJO, M. S.; BORGES, N. F.; SILVA, F. L.; CASSALI, G.D.; ESTRELA-LIMA, A. Correlação do infiltrado macrofágico com a sobrevida e a expressão da proteína SOCS no carcinoma mamário canino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n.10, 1972-1980, 2018..

- VIEIRA, T.C.; OLIVEIRA, E.A.; DOS SANTOS, B.J.; SOUZA, F.R.; VELOSO, E.S.; NUNES, C.B.; DEL PUERTO, H.L.; CASSALI, G.D. COX-2 expression in mammary invasive micropapillary carcinoma is associated with prognostic factors and acts as a potential therapeutic target in comparative oncology. **Front Vet Sci**, v.9, 2022.
- WAKABAYASHI, N; SLOCUM, SL; SKOKO, JJ; SHIN, S; KENSLER, TW. When NRF2 Talks, Who's Listening? **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 11, p. 1649-1663, 2010.
- WANG, HB.; ZHOU, CJ.; SONG, SZ.; CHEN, P; XU, WH.; LIU, B.; ZHU, KX.; YU, WH.; WU, HL.; WANG, HJ.; LIN, S.; GUO, JQ.; QIN, CY. Evaluation of Nrf2 and IGF-1 expression in benign, premalignant and malignant gastric lesions. **Pathol Res Pract**, v.207, n.3, p.169-73, 2011.
- WANG, XJ.; HAYES, J.D.; WOLF, C.R. Generation of a stable antioxidant response element-driven reporter gene cell line and its use to show redox-dependent activation of nrf2 by cancer chemotherapeutic agents. **Cancer Res**, v.66, n.10, p.983-94, 2006.
- WANG, XJ.; SUN, Z.; VILLENEUVE, NF.; ZHANG, S.; ZHAO, F.; LI, Y.; CHEN, W.; YI, X.; ZHENG, W.; WONDRAK, GT.; WONG, PK.; ZHANG, DD. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. **Carcinogenesis**, v.29, n.6, p.1235-43, 2008.
- WANG, P.; LIU, G.H.; WU, K.; QU, J.; HUANG, B.; ZHANG, X.; ZHOU, X.; GERACE, L.; CHEN, C. Repression of classical nuclear export by S-nitrosylation of CRM1. **J Cell Sci**, v.122, 2009.
- WANG, H.; LIU, K.; GENG, M.; GAO, P.; WU, X.; HAI, Y.; LI, Y.; LI, Y.; LUO, L.; HAYES, J.D.; WANG, X.J.; TANG, X. RXR $\alpha$  inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. **Cancer Res**, v.73, n.10, 2013.
- WU, T.; HARDER, B. G.; WONG, P. K.; LANG, J. E.; ZHANG, D. D. Oxidative stress, mammospheres and Nrf2—new implication for breast cancer therapy?. **Molecular carcinogenesis**, v. 54, n. 11, p. 1494-1502, 2015.
- WU, T.; ZHAO, F.; GAO, B.; TAN, C.; YAGISHITA, N.; NAKAJIMA, T.; WONG, PK.; CHAPMAN, E.; FANG, D.; ZHANG, DD. Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis. **Genes Dev**, v.28, n.7, p.708-22, 2014.
- YAMAGAMI, T; KOBAYASHI, T; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 58, n. 11, p. 1079-1083, 1996.
- YEON, J. Y.; SUH, Y. J.; KIM, S. W. et al. Evaluation of dietary factors in relation to the biomarkers of oxidative stress and inflammation in breast cancer risk. **Nutrition**, v.27, p.912-918, 2011.
- ZHANG, CHAO; WANG, HUI-JIE; BAO, QI-CHAO; WANG, LEI; GUO, TIAN-KUN; CHEN, WEI-LIN; XU, LI-LI; ZHOU, HAI- SHAN; BIAN, JIN-LEI; ANG, YING-RUI; SUN, HAO-PENG; XU, XIAO-LI; YOU, QI-DONG. NRF2 promotes breast cancer cell proliferation and metastasis by increasing RhoA/ROCK pathway signal transduction. **Oncotarget**, v.7, n.45, 2016.
- ZHANG, D.D.; LO, SC.; CROSS, JV.; TEMPLETON, DJ.; HANNINK, M. KEAP1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. **Mol Cell Biol**, v.24, n.24, p.10941-53, 2004.
- ZHANG, HONG-SHENG; ZHANG, Z. G.; DU, G. Y.; SUN, H. L.; LIU, H. Y; ZHOU, Z.; HUANG, Y. H. Nrf2 promotes breast cancer cell migration via up-regulation of G6PD/HIF-1 $\alpha$ /Notch1 axis. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 23, n. 5, p. 3451-3463, 2019.
- ZHONG, Y.; ZHANG, F.; SUN, Z.; ZHOU, W.; LI, Z.Y.; YOU, Q.D.; GUO, Q.L.; HU, R. Drug resistance associates with activation of Nrf2 in MCF-7/DOX cells, and wogonin

- reverses it by down-regulating Nrf2-mediated cellular defense response. **Mol Carcinog**, v.52, n.10, p.824-34, 2013.
- ZUCCARI, D. A. P. C.; BERTON, C. R.; TERZIAN, A. C. B.; RUIZ, C. M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arq. Ciênc. Saúde**, v.15, n.4, p.189-198, 2008
- ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Fisiopatologia das neoplasias mamárias em cães. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 50-54, 2001.

## ANEXOS

### ANEXO 1

Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



**Universidade Federal da Bahia**  
**Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
**Comitê de Ética no Uso de Animais**  
 Av. Ademar de Barros, 500 – Ondina-40170-110 Salvador-BA  
 Fone: (071) 3283-6701/6702/6718  
 E-mail: [ceua.ufba@hotmail.com](mailto:ceua.ufba@hotmail.com)

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da expressão de fatores de transcrição em tumores mamários de cadelas e gatas**", registrada com o nº **61/2022**, sob a responsabilidade do(a) Pesquisador(a)/Professor(a) **Alessandra Estrela da Silva Lima**, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, **em reunião de 10/04/2023**.

Finalidade	( <input type="checkbox"/> )Ensino ( <input checked="" type="checkbox"/> )Pesquisa ( <input type="checkbox"/> )Extensão
Vigência da autorização	10/04/2023 à 10/04/2025
Espécie/linhagem/raça	cães e gatos/não especificada
Nº de animais	80
Peso/Idade	1 a 17 a / 2 a 50 kg
Sexo	F
Origem	Laboratório de Patologia Veterinária – Universidade Federal da Bahia Laboratório Histopathus Semeve- Ladeira do Acupe, n 50

#### ATENÇÃO: Prazos definidos no Regimento Interno da CEUA/EMEVZ

##### Relatório final

**Art. 29** – Finalizado o projeto de ensino, pesquisa e/ou extensão, o coordenador deverá enviar em até 90 (noventa) dias após o término da vigência do projeto que consta no certificado emitido pela CEUA/EMEVZ, ou no caso dos planos de ensino regulares a cada 4 (quatro) anos, o **Anexo II – Relatório de projeto certificado pela CEUA/EMEVZ** preenchido (disponível na página oficial da CEUA/EMEVZ) ao e-mail oficial da CEUA/EMEVZ.

##### Renovação do projeto

**Art. 30** – Para solicitação de renovação de protocolo de ensino, pesquisa e/ou extensão, o coordenador deverá encaminhar o **Anexo III - Formulário de solicitação de renovação de protocolo CEUA/EMEZ** preenchido (disponível na página oficial da CEUA/EMEVZ) ao e-mail oficial da CEUA/EMEZ, no mínimo 60 (sessenta) dias antes a data de término prevista no certificado emitido pela CEUA/EMEVZ.

Salvador, 10 de abril de 2023

LÚCIO LEOPOLDO ARAGÃO DA SILVA  
 Coordenador CEUA/MEVZ