

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**ALTERAÇÕES PROLIFERATIVAS E NEOPLÁSICAS EM FÊMEAS CANINAS E
SRPKS (SERINE/ARGININE SPECIFIC-PROTEIN KINASES) EM GLÂNDULAS
MAMÁRIAS**

Verônica Rodrigues Castro
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

VERÔNICA RODRIGUES CASTRO

**ALTERAÇÕES PROLIFERATIVAS E NEOPLÁSICAS EM FÊMEAS CANINAS E
SRPKS (SERINE/ARGININE SPECIFIC-PROTEIN KINASES) EM GLÂNDULAS
MAMÁRIAS**

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

Orientadora: Emily Correna Carlo Reis

Coorientadores: Fabricio L. Valente
Gustavo Costa Bressan

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

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

T

C355a
2024

Castro, Verônica Rodrigues, 1996-
Alterações proliferativas e neoplásicas em fêmeas caninas
e SRPKs (Serine/Arginine Specific-Protein Kinases) em
glândulas mamárias. / Verônica Rodrigues Castro. – Viçosa,
MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (85 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Emily Correna Carlo Reis.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2024.

Referências bibliográficas: f. 71-80.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.002>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cães - Doenças. 2. Mamas - Câncer. 3. Hiperplasia.
4. Proteínas - Metabolismo. I. Reis, Emily Correna Carlo, 1980-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.7089699449

VERÔNICA RODRIGUES CASTRO

ALTERAÇÕES PROLIFERATIVAS E NEOPLÁSICAS EM FÊMEAS CANINAS E SRPKS (SERINE/ARGININE SPECIFIC-PROTEIN KINASES) EM GLÂNDULAS MAMÁRIAS

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

APROVADA: 12 de agosto de 2024.

Assentimento:

Verônica Rodrigues Castro
Autora

Emily Correna Carlo Reis
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 09/01/2025 às 13:07:06 e pela orientadora em 13/01/2025 às 14:39:37. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **632M.MUM7.KDJC** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e à Nossa Senhora Aparecida por sempre me abençoarem.

Aos meus pais (Cláudia e Jesualdo) que sempre foram meu maior exemplo de dedicação, amor e força. Ao meu irmão (Nícollas) e à minha cunhada (Raquel) pela amizade, amor e apoio.

Aos meus avós (in memoriam) Maria Eliza e José que me dão força e proteção espiritual.

Às minhas tias e primas (Rita, Valéria, Daniele, Ana e Renata) que sempre estiveram ao meu lado torcendo por mim e sendo meu refúgio de paz.

Às amigas que a pós-graduação me proporcionou, Elaine, Thaís, Juliana, Carol, Gabrielly e Clara, às quais vou ser sempre grata pelo suporte e amizade.

Aos amigos que fiz na residência, Huana, Diego, Cecília, Thamara e Camila, que sempre estiveram ao meu lado, nos bons e maus momentos, melhorando os meus dias.

Aos meus amigos da vida, Caroline, Natália, Marina, Emília, Jessyka, Camila, Suelen, Welison, Priscila, Lara e Gabriela, por trazerem luz para a minha vida.

À minha orientadora Emily por ter aceitado a minha orientação, por todas as instruções e apoio que me deu.

Aos professores Fabrício, Gustavo, Carlos e Rodrigo pelas contribuições para o desenvolvimento desta dissertação, aos técnicos do laboratório de histopatologia (Adão e Cláudio) pelo suporte e à Rosi (secretaria da pós-graduação) por toda a dedicação, competência e auxílio.

Aos professores, técnicos e residentes do hospital veterinário da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial à Andréa, Fabiana e Tatiana, que auxiliaram na execução deste experimento.

Aos profissionais da Universidade Federal de Juiz de Fora (em especial Cinthya, Laetícia e Leonardo) por me apoiarem e me inspirarem.

À UFV, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

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

Assim, agradeço a CAPES pelo apoio, assim como pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse realizar mais um sonho.

“Compartilhar conhecimento, para mim, é o mesmo que manter o seu legado. É como plantar uma semente com o seu nome no coração de outra pessoa.”
(Dorian Torres)

RESUMO

CASTRO, Verônica Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **ALTERAÇÕES PROLIFERATIVAS E NEOPLÁSICAS EM FÊMEAS CANINAS E SRPKS (SERINE/ARGININE SPECIFIC-PROTEIN KINASES) EM GLÂNDULAS MAMÁRIAS**. Orientadora: Emily Correia Carlo Reis. Coorientadores: Fabricio Luciani Valente e Gustavo Costa Bressan.

As neoplasias mamárias são o tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado em mulheres e cadelas. Os tumores mamários espontâneos em cadelas são considerados modelos valiosos para o estudo do câncer de mama humano, devido às diversas semelhanças observadas entre as neoplasias mamárias nas duas espécies. Alterações proliferativas, como a hiperplasia mamária, são comuns em glândulas mamárias macroscopicamente saudáveis de cadelas com tumores, seguindo um padrão morfológico semelhante ao observado em humanos, onde essas alterações são reconhecidas como fatores de risco para o câncer de mama. Além das similaridades morfológicas, pesquisas têm destacado semelhanças moleculares entre as neoplasias mamárias humanas e caninas, incluindo a expressão das proteínas SRPKs. Essas proteínas, envolvidas no *splicing* alternativo, conferem plasticidade celular às células tumorais, permitindo a produção de isoformas proteicas que favorecem o crescimento tumoral e a disseminação metastática. Para explorar melhor o papel dessas alterações nas neoplasias mamárias, este estudo inclui duas abordagens: uma análise da ocorrência de lesões proliferativas em glândulas mamárias macroscopicamente saudáveis de cadelas com câncer de mama e uma revisão sistemática sobre a relação das proteínas SRPKs com tecidos mamários saudáveis e tumorais. Foi observada uma alta ocorrência de hiperplasia mamária em glândulas saudáveis de cadelas com câncer, enquanto, em cadelas sem tumores, as glândulas permaneceram predominantemente normais. Isso sugere que alterações proliferativas, como a hiperplasia sem atipia, podem estar associadas a uma predisposição ao desenvolvimento de tumores mamários, especialmente em fêmeas não castradas. A revisão sistemática destacou que as SRPKs desempenham papéis centrais em redes moleculares complexas, envolvendo processos pró-oncogênicos como resistência à apoptose, adaptação à hipóxia, crescimento tumoral e metástase. Sua superexpressão está fortemente associada a neoplasias mamárias, principalmente ao câncer de mama triplo-negativo (TNBC), correlacionando-se a pior prognóstico e resistência a quimioterápicos. A inibição dessas proteínas mostrou potencial para reverter resistências, promover apoptose e reduzir taxas de metástases. Esses achados

reforçam a relevância de estudos morfológicos e moleculares para compreender melhor as alterações associadas ao desenvolvimento e progressão de tumores mamários em cadelas. Além disso, destacam a necessidade de desenvolver compostos específicos para inibir o *splicing* alternativo aberrante promovido pelas SRPKs, com potencial para seu uso como marcadores tumorais e alvos terapêuticos no tratamento do câncer de mama.

Palavras-chave: hiperplasia mamária; *splicing* alternativo; câncer de mama; glândula mamária; câncer de mama triplo negativo.

ABSTRACT

CASTRO, Verônica Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2024. **PROLIFERATIVE AND NEOPLASTIC CHANGES IN FEMALE CANINES AND SRPKS (SERINE/ARGININE SPECIFIC-PROTEIN KINASES) IN MAMMARY GLANDS**. Adviser: Emily Correna Carlo Reis. Co-advisers: Fabricio Luciani Valente and Gustavo Costa Bressan.

Mammary neoplasms are the most commonly diagnosed type of cancer in women and bitches. Spontaneous mammary tumors in bitches are considered valuable models for studying human breast cancer due to the various similarities observed between mammary neoplasms in both species. Proliferative changes, such as mammary hyperplasia, are common in macroscopically healthy mammary glands of bitches with tumors, following a morphological pattern similar to that observed in humans, where these changes are recognized as risk factors for breast cancer. In addition to morphological similarities, research has highlighted molecular similarities between human and canine mammary neoplasms, including the expression of SRPK proteins. These proteins, involved in alternative splicing, provide cellular plasticity to tumor cells, allowing the production of protein isoforms that promote tumor growth and metastatic spread. To better explore the role of these changes in mammary neoplasms, this study includes two approaches: an analysis of the occurrence of proliferative lesions in macroscopically healthy mammary glands of bitches with breast cancer, and a systematic review on the relationship of SRPK proteins with healthy and tumor tissues. A high occurrence of mammary hyperplasia was observed in healthy glands of bitches with cancer, while in bitches without tumors, the glands remained predominantly normal. This suggests that proliferative changes, such as hyperplasia without atypia, may be associated with a predisposition to the development of mammary tumors, especially in unspayed females. The systematic review highlighted that SRPKs play central roles in complex molecular networks, involving pro-oncogenic processes such as resistance to apoptosis, adaptation to hypoxia, tumor growth, and metastasis. Their overexpression is strongly associated with mammary neoplasms, particularly triple-negative breast cancer (TNBC), correlating with worse prognosis and resistance to chemotherapy. Inhibition of these proteins showed potential to reverse resistance, promote apoptosis and reduce metastasis rates. These findings reinforce the relevance of morphological and molecular studies to better understand the alterations associated with the development and progression of mammary tumors in bitches. Additionally, they emphasize the need to develop specific compounds to

inhibit the aberrant alternative splicing driven by SRPKs, with potential for their use as tumor markers and therapeutic targets in breast cancer treatment.

Keywords: mammary hyperplasia; alternative splicing; breast cancer; mammary gland; triple-negative breast cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Exemplos de classificações histopatológicas encontradas nas amostras.....	24
Figura 2	Distribuição das cadelas participantes do experimento segundo a raça (n = 64).....	26
Figura 3	Distribuição do histórico reprodutivo das cadelas participantes do experimento (n = 64).....	27
Figura 4	Proporção de mamas classificadas histologicamente como normais ou hiperplásicas de acordo com o grupo (MMS-GC e MMS-PC).....	29
Figura 5	Relação entre o escore corporal e a classificação de MMS-PC (normal ou hiperplásica).....	29
Figura 6	Histórico clínico relacionado a classificação das MMS-PC (normal ou hiperplásica).....	30
Figura 7	Associação entre a classificação das MMS-PC em normal ou hiperplásica, a quantidade de tumores e o tipo de crescimento tumoral.....	31
Figura 8	Associação entre a classificação das MMS-PC (normal ou hiperplásica) e a classificação TNM (I a V ou inicial e avançado).....	32
Figura 9	Associação entre a classificação das MMS-PC (normal ou hiperplásica) e a graduação do tumor ou a classificação do nódulo (benigno/não neoplásico e maligno).....	33
Figura 10	Fluxograma ilustrando as fases de seleção dos artigos incluídos nesta revisão sistemática.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição da idade e escore corporal das cadelas participantes do experimento.....	27
Tabela 2	Critério PICOS para seleção dos trabalhos da revisão sistemática.....	43
Tabela 3	Critérios de inclusão e exclusão considerados para a seleção dos artigos da revisão sistemática.....	44
Tabela 4	Informações específicas dos tipos de amostras analisadas nos artigos selecionados na revisão sistemática.....	47
Tabela 5	Resultados da expressão de SRPKs dos artigos selecionados na revisão sistemática.....	51
Tabela 6	Informações referentes aos artigos selecionados que abordam a interação de SRPKs com outras proteínas ou genes.....	56
Tabela 7	Informações dos artigos selecionados que abordam a inibição de SRPKs.....	61
Tabela 8	Informações dos artigos selecionados que abordam o prognóstico associado a SRPKs.....	64
Tabela 9	Informações referentes aos artigos selecionados que abordam mecanismo de resistência ou adaptação.....	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAHA	American Animal Hospital Association
AKT	<i>Protein kinase B</i>
asTF	<i>alternatively spliced Tissue Factor</i>
Bis	Bisindolilmaleimida
BME-UV1	Linhagem de células epiteliais mamárias bovinas
BQ	BQ323636.1
BRCA	<i>Breast cancer gene</i>
BT-20	Células de câncer de mama triplo-negativo, que foi causado por um carcinoma ductal invasivo na glândula mamária
BT-549	Linhagem de células epiteliais derivada de um carcinoma ductal metastático da mama
CAP	<i>Cold atmospheric plasma</i>
cBLMT	<i>Canine basal-like mammary tumor</i>
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CLKs	<i>Cdc-like kinases</i>
DKO	<i>Double knockouts</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EP	Receptor de Progesterona
ER	Receptor de estrogênio
ERa	<i>Estrogen receptor alpha</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FBP1	<i>Fructose-Bisphosphatase 1</i>
fITF	<i>Full-length Tissue Factor</i>
HBL100	Linhagem de tecido mamário saudável
HD	Hiperplasia ductal
HL	Hiperplasia lobular
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i>

INCA	Instituto Nacional de Câncer
ITGB3BP	<i>Integrin β3-binding protein</i>
LIMK2	<i>LIM Domain Kinase 2</i>
MAPKT	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCF7	Linhagem de células epiteliais derivada de derrame pleural de uma mulher com adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Linhagem de células epiteliais humanas derivada de um derrame pleural de um paciente com adenocarcinoma de mama metastático
MDA-MB-435	Linhagem celular derivada de derrame pleural de uma paciente com câncer de mama
MDA-MB-468	Linhagem celular derivada de um adenocarcinoma metastático da mama
MMS-GC	Mamas Macroscopicamente Saudáveis do Grupo Controle
MMS-PC	Mamas Macroscopicamente Saudáveis de Pacientes com Câncer de mama
mRNAs	RNA mensageiro
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
NAC	<i>Antioxidant n-acetyl cysteine</i>
NCOR2	<i>Nuclear receptor co-repressor 2</i>
NEK2	<i>NIMA-related kinase</i>
NF2	<i>Neurofibromatosis type 2</i>
NF-kappa-B	Fator nuclear <i>kappa B</i>
NPC	Nódulos de Pacientes com Câncer de mama
OGA	<i>N-acetyl-b-glucosaminidase</i>
OGT	<i>O-GlcNAc transferase</i>
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PICOS	<i>Popultion, Intervention, Comparasion and Outcomes</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PKR	<i>RNA-dependent protein kinase</i>
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PRLR	<i>Prolactin receptor</i>
PUF60	<i>Poly(U) Binding Splicing Factor 60</i>

RBM4	RNA-binding motif protein 4
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPL30	<i>Ribosomal Protein L30</i>
S6K1	Ribosomal S6 kinase 1
SAFB	<i>Scaffold Attachment Factors B</i>
SF2	<i>Arginine Rich Splicing Factor 2</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNRPA1	<i>Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide A</i>
SR	<i>Serine and arginine-rich proteins</i>
SRPIN340	<i>N-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl) isonicotinamide</i>
SRPK	<i>Serine/arginine specific-protein kinase</i>
SRSF1	<i>Serine/Arginine Splicing Factor 1</i>
TF	<i>Tissue factor</i>
TNBC	Tumores triplo negativos
UFSCAR	Universidade Federal de São Carlos
UFV	Universidade Federal de Viçosa
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
YBX1	<i>Y-Box Binding Protein 1</i>
ZR-75-1 e ZR-75-30	Linhagem de células epiteliais derivada de um paciente com carcinoma ductal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2. CAPÍTULO 1: ALTERAÇÕES PROLIFERATIVAS EM GLÂNDULAS MAMÁRIAS MACROSCOPICAMENTE SAUDÁVEIS DE FÊMEAS CANINAS COM CÂNCER DE MAMA.....	20
2.1 INTRODUÇÃO.....	21
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.2.1 Aspectos éticos.....	22
2.2.2 Coleta de material.....	22
2.2.3 Classificação histopatológica.....	23
2.2.4 Dados dos pacientes.....	25
2.2.5 Análise estatística.....	25
2.3 RESULTADOS.....	26
2.4 DISCUSSÃO.....	33
2.5 CONCLUSÃO.....	39
3. CAPÍTULO 2: RELAÇÃO DE SRPKs (<i>Serine/Arginine specific-protein kinase</i>) COM O TECIDO MAMÁRIO SAUDÁVEL E NEOPLÁSICO: REVISÃO SISTEMÁTICA.....	40
3.1 INTRODUÇÃO.....	42
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.2.1 Busca e seleção dos estudos.....	43
3.2.2 Extração e síntese dos dados.....	44
3.3 RESULTADOS.....	44
3.3.1 Seleção.....	44
3.3.2 Informações gerais dos artigos: título, autores, país e ano.....	46
3.3.3 Características dos estudos.....	46
3.3.4 Estudos que avaliam a expressão.....	49
3.3.5 Estudos que avaliam a interação com outras proteínas ou genes.....	52
3.3.6 Estudos que avaliam a inibição de SRPKs.....	59
3.3.7 Estudos que avaliam o prognóstico associado a SRPKs.....	62

3.3.8 Estudos que avaliam mecanismo de resistência ou adaptação.....	65
3.4 DISCUSSÃO.....	66
3.5 CONCLUSÃO.....	70
4. PERSPECTIVAS FUTURAS	71
5. REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer de mama é a neoplasia mais frequentemente diagnosticada em mulheres em todo o mundo, com mais de 2,2 milhões de novos casos e mais de 680.000 mortes registradas em 2020 (Sung et al., 2021). Da mesma forma, os tumores mamários são a neoplasia mais comum em cadelas não castradas, respondendo por até 70% de todos os tumores caninos (Queiroga et al., 2011). Conquanto o câncer de mama seja frequente em mulheres, comparativamente, a incidência em cadelas é três vezes maior (Nardi e Dalek, 2016).

As neoplasias mamárias caninas apresentam-se comumente como nódulos circunscritos com tamanho, consistência e mobilidade variáveis e, ainda, podem estar associadas a ulcerações cutâneas e reações inflamatórias locais (Cassali et al., 2011).

Estas neoplasias acometem principalmente fêmeas caninas de meia-idade a idosas, com faixa etária entre 7 e 12 anos, com maior ocorrência nas raças Poodle, Dachshund, Yorkshire Terrier, Cocker Spaniel, Pastor Alemão, Boxer, Fox Terrier, além dos animais sem raça definida (Nardi e Dalek, 2016).

Sabe-se que as alterações proliferativas são frequentes em glândulas mamárias macroscopicamente saudáveis de cães com neoplasias mamárias (Ferreira et. al, 2012).

Segundo o Consenso para o Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento de Tumores Mamários Caninos (2011) existem três tipos distintos de alterações hiperplásicas caninas, sendo estas a hiperplasia ductal (HD), hiperplasia lobular (HL) e adenose. A hiperplasia epitelial pode surgir nos ductos extralobulares, denominada hiperplasia ductal, ou nos ductos intralobulares, denominada hiperplasia lobular. A HD corresponde a proliferações caracterizadas por projeções supranumerárias de células epiteliais, que são morfológicamente semelhantes às células normais do ducto, com leve pleomorfismo nuclear, podendo ser observadas pontes desorganizadas ou irregulares formadas por projeções papilares intraductais. Já na HL os núcleos das células são pequenos e redondos, predominantemente localizados em uma posição central, apresentando baixo pleomorfismo e, às vezes, um único vacúolo intracitoplasmático. Essa população uniforme de células ocupa as unidades acinares, levando ao crescimento dessas unidades. Ainda, a adenose refere-se a uma alteração caracterizada por um aumento do número de ácinos e

dilatação do ducto intralobular, aumentando assim o diâmetro geral das unidades lobulares (Cassali et al., 2011).

Em mulheres a hiperplasia mamária é reconhecida como um fator de risco para o câncer de mama (Ellis, 2010). Segundo Ferreira et al. (2012), de maneira semelhante, as alterações no comportamento molecular do epitélio mamário canino sugeriram que lesões intraepiteliais ou intraductais (como hiperplasia ductal e lobular ou carcinoma ductal *in situ*) representam estágios evolutivos no processo de progressão neoplásica maligna. Portanto, como existem muitas semelhanças entre as neoplasias mamárias nestas espécies, discussões sobre a hiperplasia mamária em humanos e cadelas são pertinentes.

Os tumores mamários caninos de ocorrência espontânea representam um modelo valioso para investigar diferentes aspectos da biologia do câncer de mama humano. A doença em ambas as espécies apresenta semelhanças significativas em termos de etiologia, classificação histopatológica e patogênese. Além disso, compartilham importantes mecanismos oncogênicos, como a expressão de HER2 e a sinalização mediada por estrogênio (Gray et al., 2020).

Outras características compartilhadas por mulheres e cadelas em relação a neoplasias mamárias incluem a ocorrência do tumor de forma espontânea, a idade de início, a etiologia hormonal e o curso semelhante da doença. Além disso, os fatores que afetam o resultado clínico, incluindo o tamanho do tumor, o estágio clínico e a invasão linfonodal, além do aspecto histopatológico das lesões, também são semelhantes (Abdelmegee e Mohammed, 2018).

Apesar de os dados histopatológicos e morfológicos serem úteis na classificação dos cânceres de mama humanos, a incorporação de informações moleculares obtidas por imuno-histoquímica aprimora a precisão diagnóstica e prognóstica (Known et al., 2023). Considerando as semelhanças entre as neoplasias mamárias caninas e humanas, estudos recentes têm abordado as semelhanças moleculares, destacando uma possível correspondência na expressão das proteínas SRPKs entre essas espécies.

Estudos prévios que associam a expressão alterada de proteínas SRPKs (*Serine/arginine specific-protein kinases*) em neoplasias mamárias humanas demonstraram que a expressão destas se eleva em tecido mamário neoplásico em relação ao tecido mamário saudável (Hayes et al, 2007; Li et al., 2014; Lin et al., 2014).

A família SRPK, contendo SRPK1-3, é uma classe de proteínas quinases predominantemente distribuídas no citoplasma. Seus graus de expressão e distribuição em diferentes compartimentos celulares variam de acordo com as mudanças de condições, podendo esta proteína catalisar a fosforilação de SRs no citoplasma e no núcleo (Du et al., 2021). Ao fosforilarem as proteínas SR (que auxiliam na montagem do *spliceossomo*), as SRPKs atuam na regulação de eventos de *splicing* alternativo e modificação pós-transcricional (que remove sequências intrônicas e une os éxons circundantes), sendo responsáveis por originar uma variedade de proteínas e que, portanto, podem apresentar diferentes propriedades químicas e biológicas (Pajares et al., 2007). Sabe-se que diversas doenças estão relacionadas à desregulação dessa maquinaria, como é o caso do câncer (Vale, 2017).

A alteração do processo habitual de *splicing* alternativo em células cancerígenas resulta na produção de mRNAs que eram inexistentes e/ou na modificação entre isoformas de mRNA de tecidos específicos (Pajares et al., 2007).

Sabe-se que células cancerígenas buscam desenvolver mecanismos para adaptação ao microambiente. Assim, segundo David e Manley (2010), a plasticidade celular oferecida pelo *splicing* alternativo permite que células cancerígenas produzam isoformas de proteínas que favorecem o crescimento e/ou a disseminação tumoral.

Estudos anteriores demonstram que a expressão alterada de proteínas SRPK em tumores mamários pode estar associada a um pior prognóstico, favorecimento de metástases, resistência a tratamentos e menor sobrevida (Li, et al. 2014; van Roosmelen et al., 2015; Wang et al., 2020).

Moreira (2018) observou a eficácia de algumas moléculas sintéticas que atuam em SRPKs na prevenção de metástases em camundongos. Siqueira (2018) realizou um estudo onde verificou o potencial antileucêmico de moléculas que atuam em proteínas SRPKs. Paiva (2022) investigou os efeitos da inibição farmacológica de SRPKs (em especial SRPK1) em células de câncer de mama no contexto antimetastático *in vitro*, observando que um dos compostos estudados apresentou efeitos antimetastáticos e eventualmente inibitórios de SRPK1 intracelularmente.

Assim, segundo Du et al. (2022) projetar drogas que promovem a reversão do estado de fosforilação promovido por estas quinases e suprimir o *splicing* alternativo aberrante impulsionado por proteínas SRs é uma estratégia terapêutica promissora.

Por fim, além de serem utilizadas como modelo animal para estudos sobre neoplasias mamárias humanas, as cadelas também desenvolvem tumores mamários com agressividade clínica e letalidade similares às encontradas em mulheres. Dessa forma, em ambas as espécies, é essencial identificar fatores prognósticos que possibilitem a estratificação dos pacientes em grupos de maior risco de recorrência ou mortalidade, promovendo também o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Queiroga et al., 2011).

Este trabalho, visando uma melhor compreensão sobre neoplasias mamárias, apresenta dois estudos referentes ao tema. Um deles aborda a ocorrência de lesões proliferativas de mamas macroscopicamente saudáveis em cadelas com câncer de mama e o outro corresponde a uma revisão sistemática para elucidar a relação das proteínas SRPKs com o tecido mamário saudável e/ou neoplásico.

2. CAPÍTULO 1

ALTERAÇÕES PROLIFERATIVAS EM GLÂNDULAS MAMÁRIAS MACROSCOPICAMENTE SAUDÁVEIS DE FÊMEAS CANINAS COM CÂNCER DE MAMA.

CASTRO, Verônica Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024. **ALTERAÇÕES PROLIFERATIVAS EM GLÂNDULAS MAMÁRIAS MACROSCOPICAMENTE SAUDÁVEIS DE FÊMEAS CANINAS COM CÂNCER DE MAMA.** Orientadora: Emily Correna Carlo Reis. Coorientadores: Fabrício Luciani Valente e Gustavo Costa Bressan.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade em humanos e cães. Em cadelas as lesões epiteliais não neoplásicas, como hiperplasia ductal e lobular, são frequentemente diagnosticadas em glândulas mamárias. Estudos sobre alterações no comportamento molecular do epitélio mamário nesta espécie sugerem que essas lesões podem representar estágios iniciais na progressão para neoplasias malignas. Assim, diante da possibilidade de alterações proliferativas mamárias evoluírem para câncer, é essencial investigar sua ocorrência, a fim de orientar o tratamento adequado e promover a prevenção do câncer de mama em cadelas. Este estudo tem como objetivo identificar a presença de alterações histológicas proliferativas em glândulas mamárias macroscopicamente saudáveis de cadelas com câncer de mama e compará-las com glândulas de cadelas não oncológicas. Para isso, foram coletadas amostras dos maiores nódulos mamários e de glândulas mamárias macroscopicamente normais de cadelas submetidas à mastectomia terapêutica, além de amostras de glândulas saudáveis de pacientes que não possuíam câncer de mama. Todas as amostras passaram por análise histopatológica, e as alterações proliferativas foram avaliadas em relação a fatores clínicos, reprodutivos e oncológicos. Os resultados revelaram uma alta ocorrência de hiperplasia mamária em glândulas macroscopicamente saudáveis de cadelas com tumores mamários, presente em 76,4% dos casos. Em contrapartida, em cadelas sem câncer, as glândulas mamárias permaneceram majoritariamente histologicamente normais, indicando que alterações proliferativas, como a hiperplasia sem atipia, podem estar associadas ao desenvolvimento de tumores mamários. Além disso, a hiperplasia mamária foi mais frequente em cadelas com câncer de mama que não haviam sido castradas. Esses achados são particularmente relevantes para a abordagem das neoplasias mamárias em cadelas, uma vez que a espécie possui cinco pares de glândulas mamárias. A escolha entre cirurgia local ou radical deve considerar essas alterações proliferativas, com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de tumores malignos.

2.1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por uma proliferação descontrolada de células anormais que podem se espalhar para os tecidos circundantes, sendo uma causa comum de morte em humanos e cães (Vasquez et al., 2023). Ainda, a mortalidade associada ao câncer de mama tanto em mulheres quanto em cadelas justifica a preocupação dos médicos e médicos veterinários quanto à precisão diagnóstica e às estratégias terapêuticas para essa doença, reforçando ainda a necessidade de mais pesquisas nesta área.

A avaliação clínica de cães com tumor de mama envolve o histórico clínico completo e o exame físico, através do qual é possível detectar nódulos únicos ou múltiplos nas glândulas mamárias durante a palpação dos cinco pares de glândulas mamárias (Cassali et al., 2020). Segundo a “*American Animal Hospital Association*” (AAHA) (Biller et al., 2016) para observar o estágio clínico associado a neoplasias mamárias devem ser feitas: citologia, que auxilia na distinção de tumores benignos e malignos (através da punção aspirativa por agulha fina - PAAF do tumor), radiografias de tórax em três projeções radiográficas e PAAF do linfonodo regional. O exame histopatológico é o padrão ouro para a identificação de nódulos, sendo fundamental para o diagnóstico definitivo. Além disso, neoplasias mal diferenciadas são difíceis de distinguir de outros tumores, e a imuno-histoquímica auxilia nesta diferenciação, bem como na determinação da natureza e origem da neoplasia nesses tipos de casos (Kumbhani et al., 2022).

São diversos os tipos histológicos de neoplasias mamárias e estudos evidenciam que seu tratamento precoce é o principal fator para um bom prognóstico (Biller et al., 2016; Kumbhani et al., 2022).

A classificação histológica de tumores mamários caninos envolve lesões epiteliais não neoplásicas (como hiperplasia ductal, hiperplasia lobular, adenose, ectasia ductal, lesões de células colunares, alterações proliferativas com atipia celular) e neoplásicas (podendo ser tumores benignos ou malignos) (Cassali et al., 2020).

O tratamento de escolha para esta afecção é a cirurgia, porém a extensão desta depende do tamanho e localização do tumor, bem como do tipo de drenagem linfática da glândula mamária afetada (LaValle et al., 2012).

Estudos de acompanhamento clínico em mulheres indicaram que as lesões proliferativas intraductais estão associadas a diferentes níveis de risco para o desenvolvimento subsequente de câncer de mama invasivo, que varia de aproximadamente 1,5 vezes para hiperplasia ductal usual, 4 a 5 vezes (variação de 2,4 a 13,0 vezes) para hiperplasia ductal atípica e 8 a 10 vezes para carcinoma ductal *in situ* (Ellis, 2010). Segundo Ferreira et al. (2012) as hiperplasias epiteliais das glândulas mamárias caninas apresentam a mesma organização ductal-lobular e características moleculares semelhantes às descritas em lesões humanas. Em humanos, a hiperplasia do tipo usual é uma lesão associada a um risco aumentado de posterior desenvolvimento de câncer de mama (Page e Dupont, 1990).

Considerando a possibilidade de alterações mamárias proliferativas se tornarem neoplásicas, é importante investigar sua ocorrência para definir adequadamente o tratamento e para promover a prevenção do câncer de mama em cadelas. Assim, objetiva-se com este trabalho a identificação da ocorrência de alterações histológicas proliferativas em glândulas mamárias macroscopicamente saudáveis de pacientes com câncer de mama e sua comparação com as mamas macroscopicamente saudáveis de pacientes não oncológicos, além de correlacioná-las com fatores clínicos, reprodutivos e oncológicos dos pacientes.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Aspectos éticos

O desenvolvimento deste estudo seguiu o Código de Ética Profissional de Médicos Veterinários e os Princípios Éticos em Experimentação Animal. Houve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a pesquisa foi realizada sob o número de processo 06/2020.

2.2.2 Coleta de material

O material foi colhido de cadeias mamárias de cadelas (*Canis lupus familiaris*) com neoplasias mamárias, atendidas na rotina do hospital veterinário da UFV, após a realização do procedimento cirúrgico recomendado para o tratamento da

neoplasia. Ressalta-se que nenhuma cadela foi submetida a procedimento cirúrgico unicamente com o objetivo de participar deste experimento.

Como em grande parte dos casos de neoplasias mamárias caninas realiza-se a remoção de toda a cadeia mamária ipsilateral ou de mais de uma mama, por meio de mastectomia regional ou unilateral, em um mesmo paciente foram coletados os tecidos neoplásicos (fragmentos dos tumores) e os tecidos mamários saudáveis (porção da glândula mamária de aspecto macroscopicamente saudável).

Todos os animais passaram por avaliações clínicas, laboratoriais e de imagem com o objetivo de minimizar os riscos do procedimento cirúrgico, conforme recomendações do médico veterinário responsável e sem a interferência do pesquisador.

Os responsáveis pelos animais participantes do experimento foram esclarecidos a respeito da coleta de material e esta foi realizada apenas após o seu consentimento por escrito, de acordo com o termo de consentimento livre e esclarecido.

Como grupo controle foram recolhidas amostras de tecido mamário originário de cadelas que vieram a óbito por causas não relacionadas a neoplasia mamária ou que foram eutanasiadas na rotina do Hospital Veterinário da UFV. Esse procedimento também foi realizado apenas após a assinatura do termo de doação do cadáver para utilização em pesquisa.

Em resumo, o trabalho foi composto por 3 grupos, sendo um correspondente às amostras de nódulos mamários (amostras do maior nódulo de mama do paciente com câncer), um de mama macroscopicamente saudável de pacientes oncológicos e o grupo controle (mamas macroscopicamente saudáveis de pacientes que vieram a óbito e que não possuíam neoplasias mamárias).

2.2.3 Classificação histopatológica

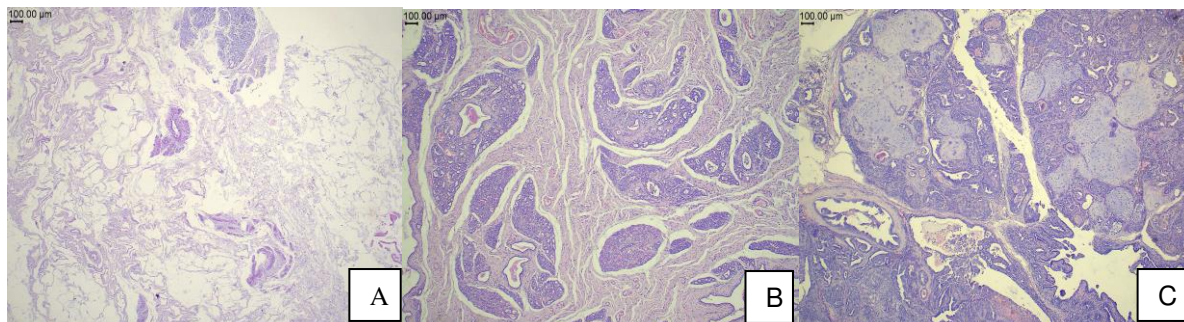
O material fresco, advindo da rotina do hospital veterinário, foi conservado em formaldeído tamponado a 10% por 48 horas e após esse período foi transferido para o álcool 70 e processado para sua inclusão em blocos de parafina.

Após, as amostras foram seccionadas e fixadas em lâminas de vidro, passaram por desparafinização e foram coradas com hematoxilina/eosina.

Então, as mesmas foram analisadas, classificadas e graduadas por patologista veterinário experiente, de acordo com Cassali et al. (2011), conforme apresentado

na figura 1.

Figura 1. Exemplos de classificações histopatológicas encontradas nas amostras.



Legenda: A: glândula mamária normal; B: hiperplasia sem atipia; C: carcinoma em tumor misto de grau I. Objetiva de 4x, barra de 100 µm. Fonte: arquivo institucional, 2024.

A partir do diagnóstico histopatológico, foram reunidas no grupo de hiperplasia todas as amostras diagnosticadas com alterações proliferativas (em casos de aumento da celularidade epitelial ductal com ou sem atipia celular) e definidas como mamas normais aquelas que não apresentavam alterações proliferativas.

Até o momento não existe um sistema de graduação específico em relação ao câncer de mama em cadelas. Por isso, o método de Elston e Ellis, desenvolvido para câncer de mama humano, foi adotado para classificar tumores mamários também nessa espécie. Karayannopoulou et al. (2005) utilizaram esse método em cães com carcinoma mamário para investigar sua relação com o prognóstico, baseando-se em um acompanhamento de 2 anos. Após esse período, observaram diferenças significativas na sobrevivência entre os graus tumorais. Cadelas com carcinomas de grau III apresentaram pior prognóstico em comparação com aquelas com tumores de grau I ou II, sendo que carcinomas indiferenciados (grau III) mostraram um risco de morte 21 vezes maior em relação aos casos de carcinomas diferenciados (graus I e II). Esses resultados indicam que o sistema de classificação humano pode ser eficaz na estratificação e previsão do prognóstico dos tumores mamários caninos (Gray et. al, 2020).

Portanto, a graduação das neoplasias em cadelas neste estudo foi realizada de acordo com os critérios descritos por Elston e Ellis (1998). A classificação é baseada na arquitetura do tecido (formação tubular), pleomorfismo celular e contagem de mitoses, sempre considerando áreas invasivas para a avaliação. Esta classificação histológica é direcionada principalmente a adenocarcinomas invasivos.

2.2.4 Dados dos pacientes

Os dados referentes aos pacientes (raça, idade, escore corporal, histórico de utilização de progestágenos, ocorrência de pseudogestação, histórico de castração, evidências de metástases) e resultados dos exames físicos, clínicos, ultrassonográficos e radiográficos (para pesquisa de metástases) foram obtidos por meio das fichas de atendimento clínico e ambulatorial preenchidas durante os atendimentos realizados no Hospital Veterinário da UFV.

A classificação do TNM foi feita de acordo com Cassali et al. (2020), onde “T” corresponde a avaliação do tumor primário sendo “T1” menor do que 3 cm no seu maior diâmetro, “T2” de 3-5 cm no seu diâmetro máximo e “T3” maior do que 5 cm; “N” corresponde à avaliação dos linfonodos sendo “N0” sem metástase nos linfonodos e “N1” com presença de metástase e o “M” a avaliação de metástases distantes sendo “M0” sem a ocorrência de metástases e “M1” com a ocorrência de metástase). Os estágios são: I quando T1 N0 M0, II quando T2 N0 M0, III quando T3 N0 M0, IV quando o paciente apresentar qualquer T N1 M0 e V com qualquer T qualquer N e M1.

As informações sobre o “T” (tamanho do tumor primário) foram extraídas das fichas de atendimento preenchidas pelos médicos veterinários responsáveis pelo caso. As informações sobre “N” (metástase em linfonodos) foram encontradas na descrição do exame físico (palpação de linfonodos ou PAAF realizadas em casos de alterações de volume, forma e consistência ao exame clínico) também nas fichas de atendimento. Informações sobre “M” (metástases distantes) foram encontradas da mesma maneira, por meio de dados sobre exames radiográficos e ultrassonográficos.

Informações sobre o tipo de crescimento da neoplasia (rápido ou lento) e número de nódulos foram extraídas também dos prontuários de atendimento. Ainda, o tipo de crescimento foi relatado pelo tutor e o número de nódulos foi constatado no exame oncológico.

2.2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o *Statistical Analysis System* (SAS OnDemand). As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificar a normalidade dos erros e a homogeneidade das variâncias,

respectivamente. Sequencialmente, os dados foram submetidos à análise de variância, de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + e_{ij}$$

Onde: Y_{ij} , resposta; μ , constante; C_i , efeito da classificação da glândula mamária (Normal ou Hiperplásica); e_{ij} , erro.

As variáveis qualitativas foram dispostas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

2.3. RESULTADOS

O conjunto de dados foi composto por 64 animais de diferentes raças (Figura 2), históricos clínicos (Figura 3), idades e escores corporais (Tabela 1).

Figura 2. Distribuição das cadelas participantes do experimento segundo a raça (n = 64).

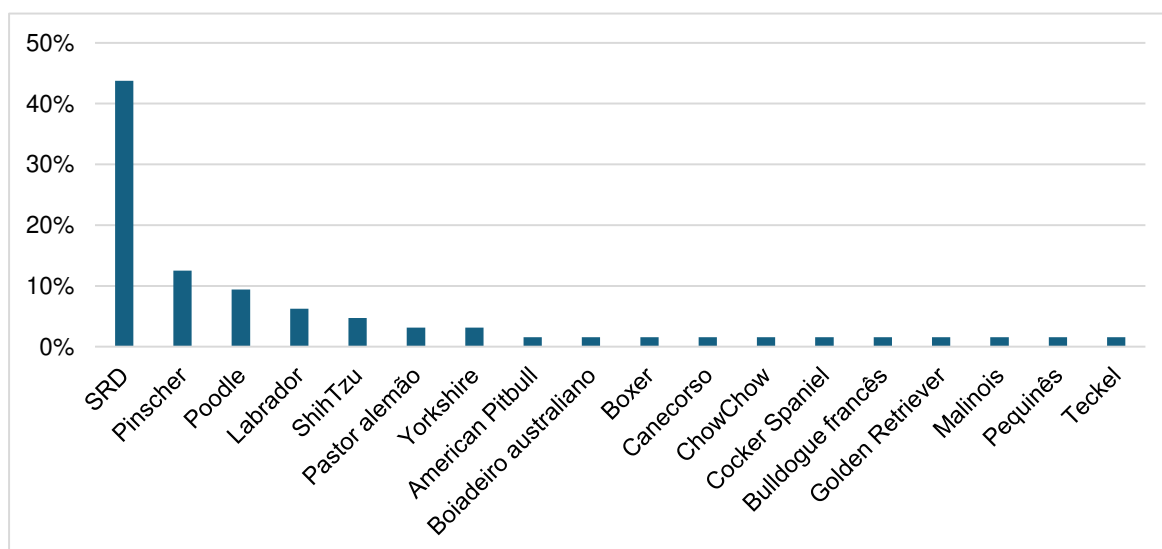


Figura 3. Distribuição do histórico reprodutivo das cadelas participantes do experimento (n = 64).

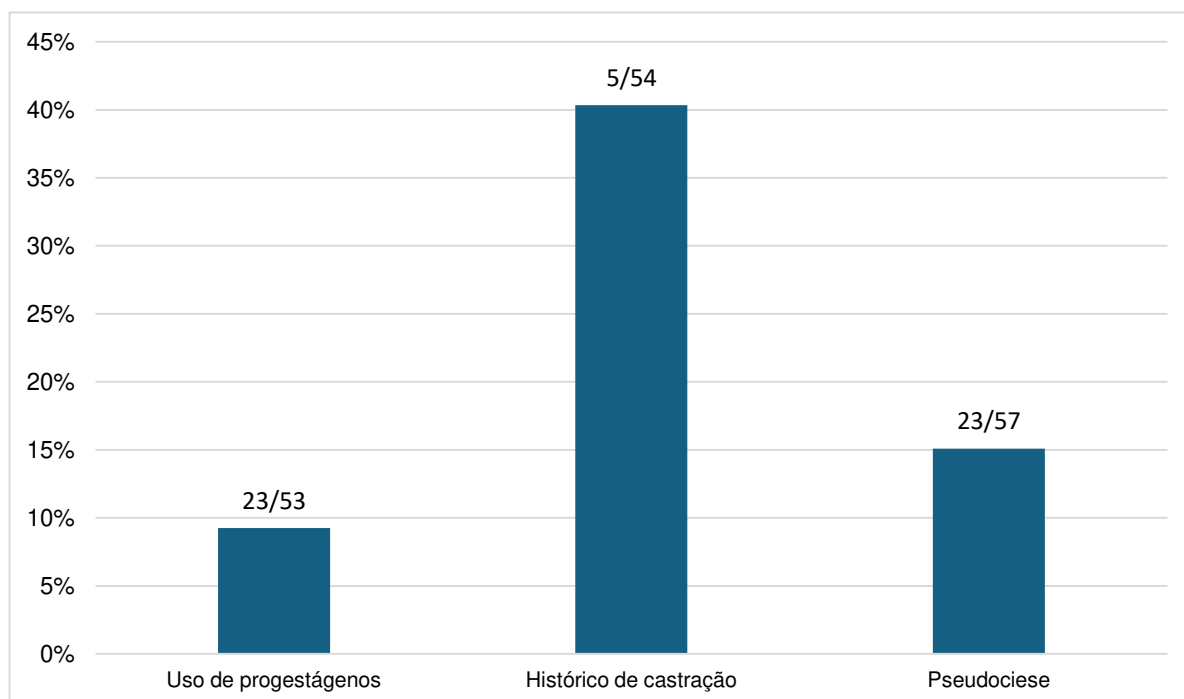


Tabela 1. Descrição da idade e escore corporal das cadelas participantes do experimento.

Variável	Média (DP)	Media (1 st Q–3 rd Q)	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	9.8 (3.5)	10 (7 – 12)	0.6	17
Escore corporal	3.4 (0.7)	3 (3 – 4)	2	5

Legenda: DP, desvio padrão; Q, quartil.

Dos 64 animais, 11 eram do grupo controle (correspondente aos animais que não possuíam neoplasias mamárias) e 53 do grupo de neoplasia (correspondente aos animais com nódulos mamários).

Após as coletas, foram obtidas 121 amostras de: Mamas Macroscopicamente Saudáveis do Grupo Controle (MMS-GC), cujo n = 11; Mamas Macroscopicamente Saudáveis de Pacientes com Câncer de mama (MMS-PC), cujo n = 55; e Nódulos de Pacientes com Câncer (NPC), cujo n = 55.

As mamas macroscopicamente saudáveis (MMS-GC e MMS-PC) foram divididas em hiperplásicas e normais, após a realização do exame histopatológico.

Das 11 amostras de MMS-GC, apenas uma (9,1%) apresentava hiperplasia, enquanto as outras 10 (90,9%) apresentaram-se histologicamente normais. Das 55 amostras de MMS-PC 42 (76,4%) apresentavam hiperplasia e as outras 13 (23,6%) estavam normais. Ainda, entre as lesões proliferativas (n=42) encontradas em MMS-PC apenas uma (2,4%) apresentava atipia celular.

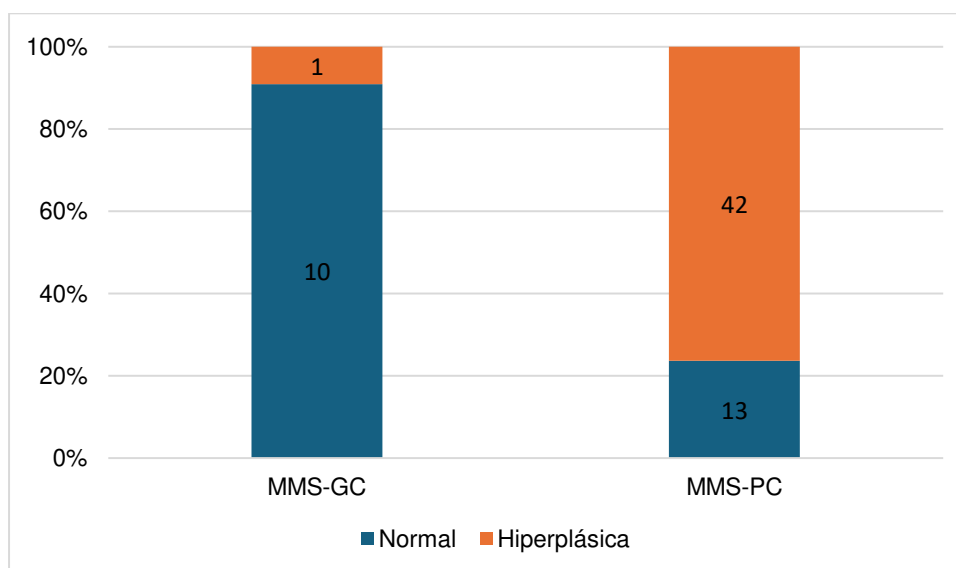
Em relação aos NPC foram diagnosticados histopatologicamente 55 nódulos, sendo 46 (83,4%) neoplasias malignas, 2 (3,6%) neoplasias benignas e as outras 7 amostras (12,7%) eram não neoplásicas.

Em relação aos NPC, dentre as 46 neoplasias malignas: 25 (54,3%) eram do tipo carcinoma em tumor misto, 6 (13%) do tipo carcinoma sólido, 4 (8,6%) carcinosarcomas, 4 (8,7%) carcinomas papilares, 2 (4,4%) carcinomas tubulares, 1 (2,2%) hemangiossarcoma, 1 (2,2%) carcinoma de células escamosas, 1 (2,2%) carcinoma tubular pleomórfico, 1 (2,2%) carcinoma micropapilar e 1 (2,2%) mioepitelioma maligno. Ainda, as 2 amostras benignas eram do tipo tumor misto benigno. Os 7 nódulos não neoplásicos eram: 3 (42,8%) hiperplasias lobulares, 1 (14,3%) adenose, 1 (14,3%) ectasia ductal, 1 (14,3%) hiperplasia com atipia e 1 (14,3%) hiperplasia sebácea.

A idade foi semelhante entre os pacientes oncológicos e não-oncológicos, sendo em média 10 anos. Este indicador também foi semelhante ($p > 0,05$) entre as classificações de MMS-PC e MMS-GC em saudáveis ou hiperplásicas. Assim, observou-se que a idade era de $8,9 \pm 0,07$ anos ($n = 23$) em pacientes com glândulas mamárias normais e de $10,2 \pm 0,5$ anos ($n = 43$) em pacientes com mamas hiperplásicas.

Após as análises estatísticas verificou-se que a classificação das glândulas mamárias (MMS-GC e MMS-PC) em histologicamente normais ou hiperplásicas foi altamente associada ao grupo neoplásico ($p < 0,0001$). Sendo assim, observou-se que o grupo com neoplasia apresentou maior frequência de hiperplasia ao exame histopatológico das mamas que macroscopicamente se apresentavam sem alterações em comparação aos pacientes não oncológicos do grupo controle (Figura 4).

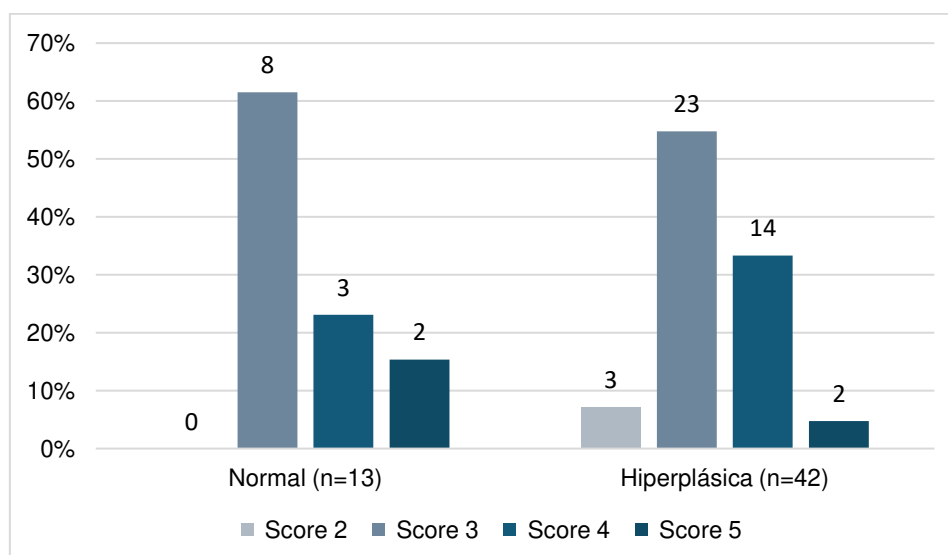
Figura 4. Proporção de mamas classificadas histologicamente como normais ou hiperplásicas de acordo com o grupo (MMS-GC e MMS-PC).



Legenda: $p < 0,0001$ pelo teste exato de Fisher.

Não houve associação entre o escore corporal e a classificação histológica de MMS-PC em normais ou hiperplásicas ($p > 0,05$; Figura 5).

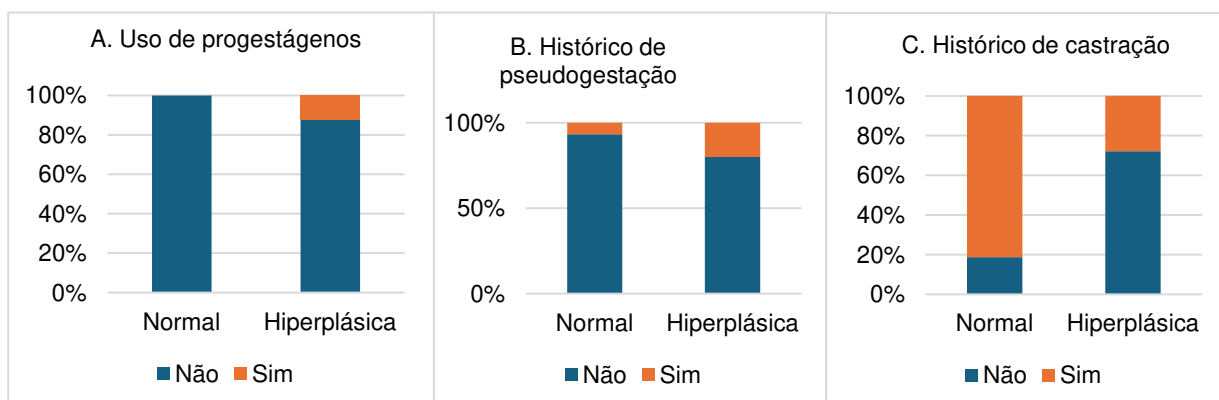
Figura 5. Relação entre o escore corporal e a classificação de MMS-PC (normal ou hiperplásica).



Legenda: $p = 0.4682$ pelo teste exato de Fisher.

As associações entre o histórico clínico e classificação das MMS-PC em normais ou hiperplásicas estão no Figura 6.

Figura 6. Histórico clínico relacionado a classificação das MMS-PC (normal ou hiperplásica).

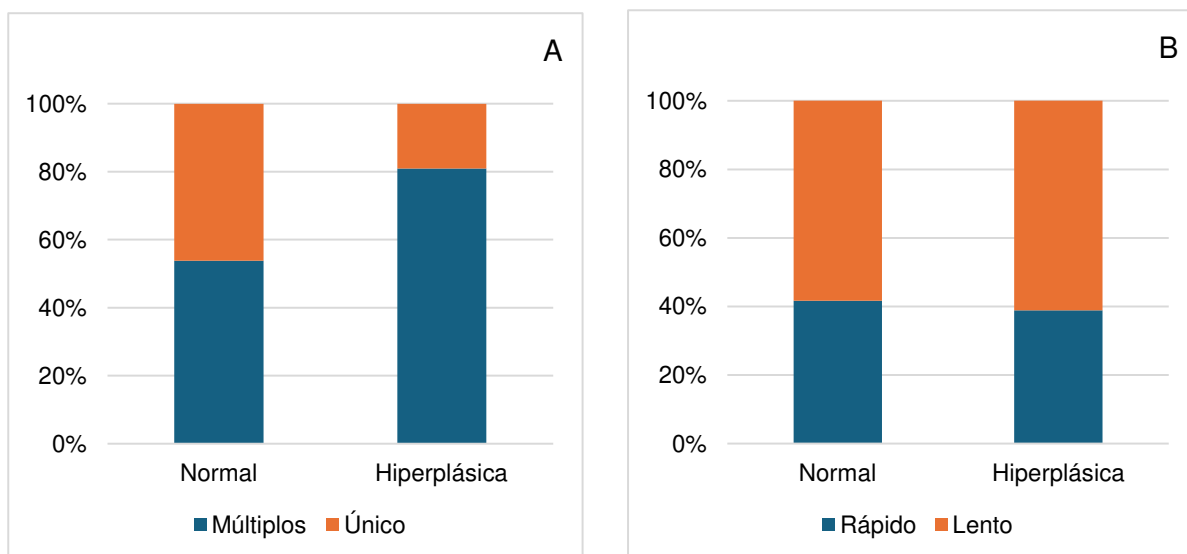


Legenda: Em A, progestágenos ($p = 0,3093$); Em B, pseudogestação ($p = 0,4175$); Em C, castração ($p = 0,0003$). Teste exato de Fisher.

Não houve associação ($p > 0,05$) entre as classificações das MMS-PC com o uso de progestágenos e histórico de pseudogestação (Figuras 6A e 6B). No entanto, a classificação histológica das MMS-PC e MMS-GC em glândula mamária normal apresentou maior proporção em animais castrados ($p < 0,05$), conforme apresentado no Figura 6C.

Todas as neoplasias foram classificadas com base na quantidade de tumores em múltiplas ou únicas. Não houve associação ($p > 0,05$) entre a quantidade de tumores e a classificação das MMS-PC (Figura 7A). Da mesma forma, o tipo de crescimento do tumor (rápido ou lento) não foi associado ($p > 0,05$) com a classificação das MMS-PC (Figura 7B).

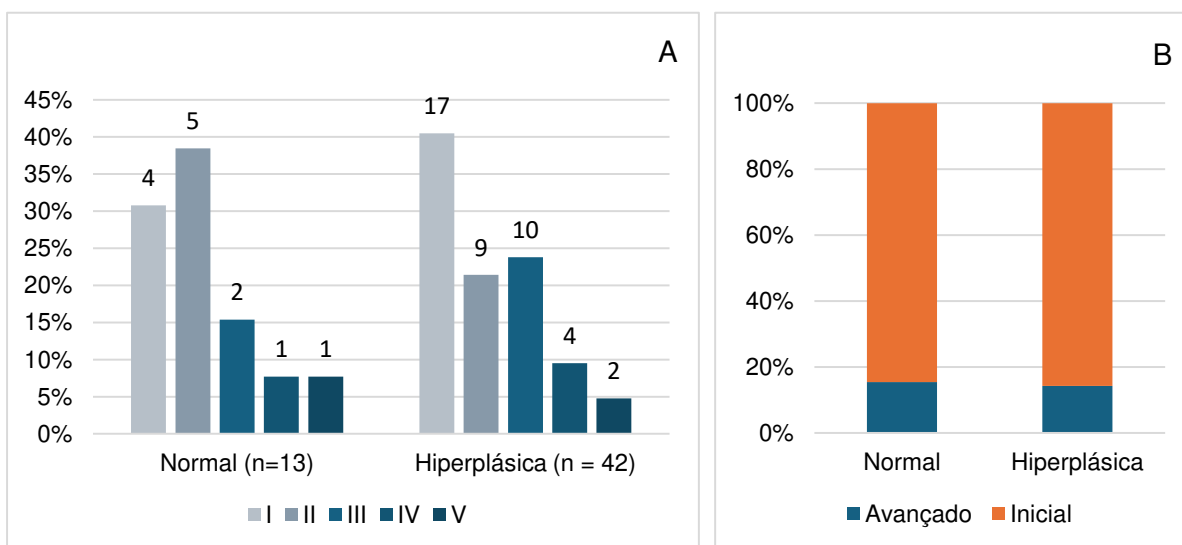
Figura 7. Associação entre a classificação das MMS-PC em normal ou hiperplásica, a quantidade de tumores e o tipo de crescimento tumoral.



Legenda: Em (A) quantidade de tumores; Em (B) o tipo de crescimento tumoral (B), $p > 0,9999$. Teste exato de Fisher.

Em MMS-PC, considerando a relação entre o TNM e as amostras hiperplásicas ($n=42$): 17 (40,5%) eram do estágio I, 9 (21,5%) de estágio II, 10 (23,8%) de estágio III, 4 (9,5%) de estágio IV e 2 (4,7%) de estágio V. Estatisticamente, não houve associação ($p > 0,05$) entre a classificação da MMS-PC em normais ou hiperplásicas e a classificação pelo TNM (Figura 8A). Também, ao considerar a classificação do TMN como inicial (TNM I a III) e avançada (TNM IV e V) não houve associação com a classificação das MMS-PC ($p > 0,05$; Figura 8B).

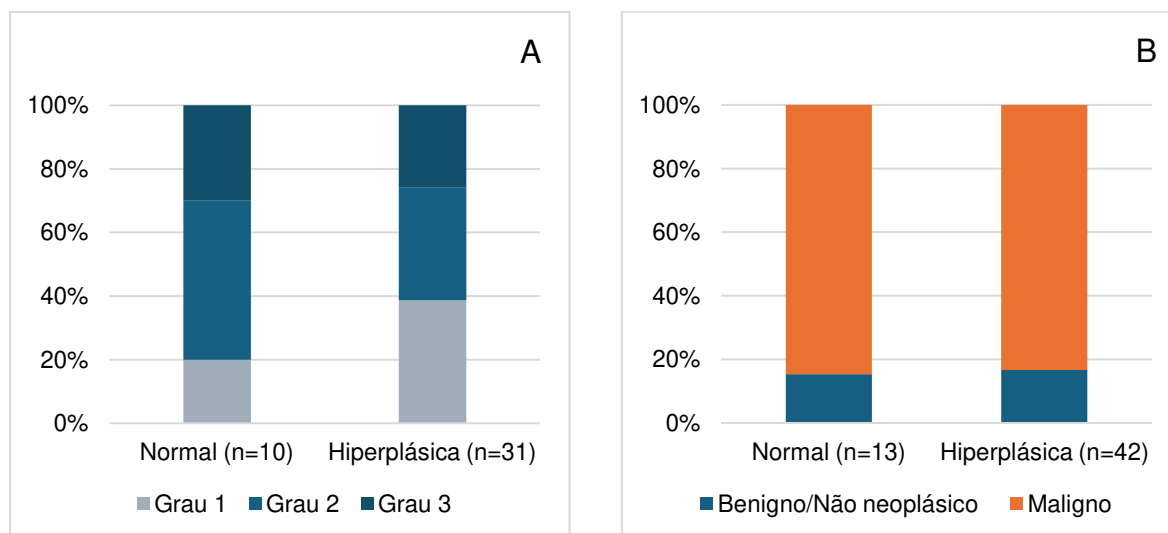
Figura 8. Associação entre a classificação das MMS-PC (normal ou hiperplásica) e a classificação TNM (I a V ou inicial e avançado).



Legenda: Em A, a associação entre a classificação das MMS-PC (normal ou hiperplásica) e a classificação TNM (I a V), $p = 0,7148$ pelo teste exato de Fisher. Em B, a associação entre TNM (inicial e avançado) e a classificação das MMS-PC (normal ou hiperplásica), $p > 0,9999$ pelo teste exato de Fisher.

Os tipos histológicos em as amostras hiperplásicas ($n=42$) de MMS-PC foram: 35 (76,1%) neoplasias malignas ($n=46$), 1 (50%) neoplasia benigna ($n=2$) e 6 (85,7%) eram lesões não neoplásicas ($n=7$). Ainda, as graduações neoplásicas ($n=35$) em as amostras hiperplásicas foram: 12 (34,3%) de grau I, 11 (31,4%) de grau II, 7 (20%) de grau III e 5 (14,3%) não se enquadravam nos critérios de Elston e Ellis (1998) utilizados para a graduação neoplásica. Estatisticamente, a graduação (grau 1 a 3) e a classificação dos NPC (em benigno/não neoplásico e maligno) não foram associadas à classificação histológica das MMS-PC ($p > 0,05$; Figura 9A e 9B).

Figura 9. Associação entre a classificação das MMS-PC (normal ou hiperplásica) e a graduação do tumor ou a classificação do nódulo (benigno/não neoplásico e maligno).



Legenda: Em A, a associação entre a classificação das MMS-PC (normal ou hiperplásica) e a graduação do tumor (Grau 1 a 3), $p = 0,5926$; Em B, a associação entre a classificação das MMS-PC (normal ou hiperplásica) e a classificação do nódulo (benigno/não neoplásico e maligno), $p > 0,9999$. Teste exato de Fisher.

Em relação ao tamanho dos nódulos das MMS-PC hiperplásicas ($n=42$): 17 (40,5%) amostras possuíam menos de 3 cm, 14 (33,3%) possuíam entre 3 e 5 cm e 11 (26,2%) eram maiores do que 5 cm. Já em MMS-PC normais ($n=13$) o tamanho dos nódulos era menor que 3 cm em 4 (30,8%) amostras, entre 3 e 5 cm em 6 (46,2%) amostras e maior do 5 cm em 3 (23%) amostras. Estatisticamente o tamanho dos tumores, em cm, não demonstrou associações entre as classificações das MMS-PC ($p > 0,05$), sendo $4,45 \pm 0,92$ para glândulas normais ($n = 13$) e $4,39 \pm 0,51$ para glândulas hiperplásicas ($n = 42$).

2.4. DISCUSSÃO

A hiperplasia pode ser definida como o aumento no número de células não neoplásicas pela elevação da atividade mitótica em resposta a estímulos, como distúrbios hormonais ou lesão tecidual (Dalek e de Nardi, 2016).

As lesões epiteliais não neoplásicas, como hiperplasia ductal e hiperplasia lobular, são frequentemente diagnosticadas em glândulas mamárias caninas (Misdorp et al., 1999).

Um estudo de Ferreira et al., (2012) demonstrou que em cadelas a hiperplasia ductal estava associada em 85,21% dos casos de tumores mamários, e que a hiperplasia ductal sem atipia foi o tipo de alteração proliferativa mais frequente. Em outro estudo, realizado por Wilson (2017), verificou-se que em cães que apresentavam neoplasias mamárias, 82,40% das mamas sem nódulos palpáveis apresentaram lesões não neoplásicas, e em apenas 3,4% não foram observadas alterações no tecido mamário. No presente trabalho, foi avaliada a ocorrência de alterações proliferativas em glândulas mamárias de aspecto saudável em pacientes submetidos a mastectomia para remoção de neoplasias mamárias. Em conformidade com o descrito pela literatura, observou-se alta ocorrência de hiperplasia mamária, já que esta estava associada a 76,4% dos casos. Ainda, a hiperplasia sem atipia foi o tipo mais prevalente, já que apenas uma amostra (2,4%) possuía atipia celular. A partir disso, foram avaliadas as associações das alterações proliferativas com fatores clínicos, reprodutivos e oncológicos.

Mouser et al. (2010) detectaram uma prevalência de 52% de lesões intraepiteliais mamárias espontâneas, incluindo hiperplasia ductal, lesões atípicas e carcinoma ductal *in situ*, em um universo de glândulas mamárias de 108 cadelas sem doença mamária clínica, porém as lesões foram categorizadas de acordo com os critérios para lesões mamárias intraepiteliais humanas. No presente estudo, diferente de Mouser et al. (2010), apenas 9,1% das mamas caninas do grupo controle (formado por pacientes não oncológicos) apresentavam hiperplasia, enquanto as outras 90,9% eram histologicamente normais. Assim, observa-se que as alterações proliferativas, como a hiperplasia usual, podem estar diretamente relacionadas a tumores mamários, e que o exame físico pela palpação ou apenas por meio da avaliação macroscópica da glândula não tem boa sensibilidade para detecção da hiperplasia. Portanto, estes fatos devem ser considerados quando realizada a opção terapêutica.

Estudos prévios demonstraram que lesões hiperplásicas são influenciadas por hormônios sexuais, bem como pela exposição prolongada a progestágenos exógenos administrados para prevenção do estro (Concannon et al., 1980; Ishikawa et al., 2000; Marinelli et al., 2004). Neste estudo não foram observadas associações entre as alterações hiperplásicas e a utilização de progestágenos. No entanto, glândulas mamárias normais foram encontradas em maior proporção nos animais castrados.

Veronesi et al. (2003) realizaram um estudo onde avaliaram a relação entre lesões mamárias e pseudogestação em cadelas e verificaram que o início das lesões mamárias (inclusive hiperplásicas) não foi diferente entre cadelas com e sem pseudogestação. Em nosso estudo, também não foram observadas associações entre as alterações hiperplásicas e a ocorrência de pseudogestação.

Neste estudo, observou-se grande variedade de classificações histológicas, porém com maior número de neoplasias malignas, predominando o carcinoma em tumor misto seguido do carcinoma sólido. Ferreira et al. (2012) observaram que a hiperplasia atípica foi mais frequentemente associada a carcinomas mamários em oposição às lesões hiperplásicas associadas a tumores benignos. Neste trabalho, não foram realizadas associações entre os tipos de alterações proliferativas e as classificações histopatológicas dos nódulos. No entanto, ao analisarmos a relação entre a classificação dos nódulos, em benignos/não neoplásicos ou malignos, e a classificação histológica das mamas (MMS-PC), em normais ou com hiperplasia, não foram encontradas associações.

Segundo Wilson (2017) o tipo e o grau histológico não influenciam na frequência de lesões não neoplásicas. Neste estudo também não houve associação entre a classificação da glândula mamária (normal ou hiperplásica) e a graduação (grau 1 a 3) da neoplasia, assim como a classificação TNM e o tamanho do tumor. No presente estudo, não foi observada associação entre a quantidade de tumores (múltiplos ou únicos) e a classificação da glândula mamária (normal ou hiperplásica). Esses resultados divergem dos dados relatados por Wilson (2017), que identificou uma maior frequência de lesões não neoplásicas em glândulas mamárias sem nódulos palpáveis presentes na cadeia neoplásica de cadelas com mais de um carcinoma mamário.

Neste prospecto não houve associação entre o escore corporal e a classificação histológica da glândula mamária. Da mesma forma, não houve associação entre o tipo de crescimento dos nódulos (rápido ou lento) e a classificação da glândula mamária em normal ou hiperplásica. Assim, os dados obtidos permitem inferir que as características do tumor primário (como quantidade e tamanho dos nódulos, tipo de crescimento, TNM, grau da neoplasia e classificação dos nódulos em benignos/não neoplásicos ou malignos) não se relacionam com a ocorrência ou não de alterações proliferativas nas glândulas mamárias de aspecto saudável em animais com câncer de mama. Além disso, a idade do animal, o escore

corporal, a utilização ou não de progestágenos e a ocorrência de pseudogestação também não se associam às alterações proliferativas em mamas macroscopicamente saudáveis destes pacientes. Portanto, não há como supor que estas características do tumor primário ou do animal com câncer de mama possam ser consideradas para prever se o paciente possui alterações proliferativas em glândulas mamárias de aspecto saudável.

Hiperplasias ductais ou lobulares podem progredir para displasias, depois para neoplasias e a partir de um adenoma benigno se transformarem em carcinoma não invasivo e, no estágio final, em formas invasivas (Foster, 2013). Ferreira et al. (2012) observaram uma perda gradual da expressão de proteínas relacionadas ao controle da proliferação (ER, EGFR) e E-caderina em lesões intraepiteliais, sugerindo que a hiperplasia mamária no cão pode desempenhar um papel importante na progressão neoplásica maligna. Portanto, a elevada frequência de alterações hiperplásicas em glândulas mamárias de aspecto normal, com potencial para desenvolvimento neoplásico, serve como um importante sinal de alerta.

Segundo Cassali et al (2020) e a AAHA Oncology Guidelines (Biller et al., 2016), a excisão cirúrgica do tumor ainda é o tratamento de escolha para quase todos os cães com tumores mamários. Porém, em pacientes com tumores grandes, metástases em linfonodos ou características histopatológicas desfavoráveis, a terapia local geralmente não é eficaz e o tratamento sistêmico, como quimioterapia ou terapia hormonal, é necessário (Sorenmo et al., 2019). O objetivo da cirurgia é remover todos os tumores com margens cirúrgicas completas e/ou prevenir a formação de novos tumores mamários (Vazquez, 2023) e a decisão pelo tipo de cirurgia depende do estágio clínico e TNM, mas condições como o tamanho do tumor, ulceração e inflamação também podem impactar nesta decisão terapêutica (Cassali et al. 2020).

Em relação aos procedimentos cirúrgicos para a excisão de neoplasias mamárias, segundo Fossum et al. (2014), são descritas as técnicas de: lumpectomia (remoção de uma massa ou parte da mama), mastectomia simples (excisão de uma glândula inteira), mastectomia regional (excisão da glândula envolvida e das glândulas adjacentes), mastectomia unilateral (retirada de todas as glândulas mamárias, tecido subcutâneo e linfonodos associados de um lado da linha média) e mastectomia bilateral (remoção simultânea das duas cadeias mamárias).

De acordo com o “consenso sobre o diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores mamários de caninos e felinos” (Cassali et al, 2020), a recomendação é que a mastectomia unilateral envolva a remoção de todas as glândulas de uma cadeia mamária junto com seus linfonodos regionais superficiais ipsilaterais (axilares e inguinais) quando o animal apresentar tumores múltiplos (independentemente do tamanho), lesões localizadas em M3 e tumores com fatores de prognósticos clínicos ruins, como lesões de crescimento rápido e/ou maiores do que 3 cm. Quando as lesões estão em M1 recomenda-se a remoção das glândulas M1 e M2 e do linfonodo axilar; quando as lesões estão em M2 glândulas M1, M2 e M3 devem ser removidas, além do linfonodo axilar; quando as lesões estão em M4 glândulas M3, M4 e M5 são removidas além do linfonodo inguinal e quando as lesões estão em M5 glândulas M4, M5 e o linfonodo inguinal devem ser removidos.

Segundo Vazquez et al. (2023) o conhecimento da drenagem linfática das glândulas mamárias é essencial para o cirurgião determinar a extensão da cirurgia e estabelecer melhor o prognóstico pós-cirúrgico para o paciente, já que o sistema linfático é considerado a principal via de metástase do câncer mamário canino. No entanto, o tipo e a extensão da cirurgia para tumores mamários não são padronizados atualmente.

Nunes et al. (2019) avaliaram os dados epidemiológicos, clinicopatológicos, fatores prognósticos e abordagens terapêuticas para cadelas com tumores mistos. No estudo, observaram que sobrevida global dos pacientes não diferiu significativamente pela técnica cirúrgica (nodulectomia, mastectomia simples, mastectomia regional ou mastectomia radical unilateral). Porém, cadelas com carcinoma em tumores mistos e carcinossarcomas com margens cirúrgicas livres apresentaram maior sobrevida global do que cadelas com margens cirúrgicas comprometidas.

A quimioterapia, como terapia adjuvante ou paliativa (ou em casos de doença metastática), é rotineiramente usada em mulheres com câncer de mama e demonstrou melhora na sobrevida (Sleeckx et al., 2011). Segundo Vasquez et al. (2023) na medicina veterinária, apesar de vários protocolos quimioterápicos terem sido usados em cães com tumores mamários malignos, são necessários mais estudos prospectivos adicionais para verificar o seu benefício na sobrevivência de pacientes com carcinoma mamário.

Startman et al. (2008) realizaram uma pesquisa avaliando a evolução de 99 cadelas, durante um ano, após passarem por procedimento de mastectomia regional para remover um único nódulo mamário. Descobriu-se que 58% dos pacientes desenvolveram um novo tumor na mesma cadeia da glândula mamária após a primeira cirurgia. Esses dados sugerem que a formação de novos tumores pode estar associada à presença de alterações proliferativas não diagnosticadas previamente, que evoluíram para lesões neoplásicas.

Hörfeldt e Mortensen (2023), em uma revisão sistemática da literatura, observaram que nenhum dos estudos analisados apresentou evidências claras de benefícios ao optar por uma técnica cirúrgica em detrimento de outra. O tratamento mais frequentemente usado foi a mastectomia radical e o segundo mais realizado foi a mastectomia regional. Porém, cães tratados com mastectomia simples ou outras técnicas mais conservadoras foram menos comumente relatados e, portanto, não foi possível concluir qual técnica cirúrgica seria eficiente, permitindo uma remoção menos extensa de tecido.

Como apresentado anteriormente, vantagens e desvantagens da cirurgia local e radical são sempre discutidas na comunidade veterinária. Apesar de estudos buscarem identificar os benefícios de cada técnica, a recomendação cirúrgica ainda está em discussão e avaliação. Ainda não há consenso entre os especialistas sobre qual abordagem poderia oferecer um melhor controle local, diminuir o risco de recorrência do tumor e do desenvolvimento de metástase à distância (Cassali et al., 2020).

No presente estudo, verificou-se que um grande número de mamas macroscopicamente saudáveis de pacientes com câncer de mama apresentam alterações proliferativas que, segundo estudos prévios, podem se tornar neoplásicas. Este fato é especialmente importante em relação a neoplasias mamárias caninas, já que as cadelas possuem cinco pares de mamas, e a definição do procedimento cirúrgico, entre remoção local ou radical, objetiva a prevenção do desenvolvimento neoplásico. Portanto, verifica-se a importância de estudos futuros para identificar os benefícios de cada técnica cirúrgica e buscar definir a recomendação terapêutica ideal para neoplasias mamárias caninas, principalmente considerando também as alterações proliferativas das glândulas mamárias macroscopicamente saudáveis. Ainda, da mesma forma que há informações

limitadas sobre a eficácia da quimioterapia em pacientes caninos com câncer mamário, estudos adicionais são necessários para verificar o seu benefício também em relação ao tratamento das alterações proliferativas mamárias caninas.

2.5. CONCLUSÃO

Há uma alta ocorrência de hiperplasia mamária em glândulas mamárias macroscopicamente saudáveis de pacientes com tumores mamários. Ainda, em pacientes não neoplásicos, as mamas se mantiveram, em sua maioria, histologicamente normais. Este fato reforça a informação de que as alterações proliferativas, como a hiperplasia sem atipia, podem estar relacionadas à tumores mamários em cadelas. Além disso, a ocorrência de hiperplasia mamária em pacientes com câncer de mama prevalece em fêmeas não castradas. Estudos morfológicos e epidemiológicos para o acompanhamento e avaliação de marcadores moleculares em proliferações epiteliais podem contribuir para uma melhor compreensão das alterações no desenvolvimento de tumores mamários caninos.

3. CAPÍTULO 2

RELAÇÃO DE SRPKs (*Serine/Arginine specific-protein kinase*) COM O TECIDO MAMÁRIO SAUDÁVEL E NEOPLÁSICO: REVISÃO SISTEMÁTICA.

CASTRO, Verônica Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024. **RELAÇÃO DE SRPKs (*Serine/Arginine specific-protein kinase*) COM O TECIDO MAMÁRIO SAUDÁVEL E NEOPLÁSICO: REVISÃO SISTEMÁTICA.** Orientadora: Emily Correna Carlo Reis. Coorientadores: Fabrício Luciani Valente e Gustavo Costa Bressan.

RESUMO

Proteínas SR são fosforiladas por SRPKs e podem exercer função oncogênica quando, durante o desenvolvimento tumoral, favorecem o *splicing* alternativo de transcritos promotores de eventos pró-carcinogênicos. A relação de SRPKs com o *splicing* alternativo e os processos neoplásicos reforça a importância de estudos que avaliem sua relação com diferentes tipos de neoplasias (como as neoplasias mamárias). Isto permite, a partir do conhecimento da expressão, influência na progressão, prognóstico, resistência a tratamentos, envolvimento em processos celulares e resposta a inibição destas proteínas, o desenvolvimento de novas pesquisas que abordam o tema com perspectivas de utilização das SRPKs como marcadores neoplásicos e alvos para moléculas anti-neoplásicas. Portanto, objetivo desta revisão é analisar as evidências publicadas até o momento que abordam as SRPKs em câncer de mama e/ou mamas saudáveis. Para isso, foi realizada uma busca de estudos nas bases de dados *Scopus*, *Embase*, *Science direct* e *Pubmed* utilizando a expressão: (breast OR mammary OR "mammary gland") AND ("serine arginine protein kinase" OR "serine-arginine protein kinase" OR srpk OR srpk1 OR srpk2 OR srpk3). Foram selecionados 35 artigos para leitura na íntegra. Os resultados do estudo indicaram uma superexpressão de SRPK1 em vários tipos de câncer de mama, incluindo câncer de mama triplo-negativo, angiossarcoma mamário primário e secundário, carcinoma lobular invasivo, carcinoma ductal invasivo e câncer de mama basal, quando comparados a tecidos saudáveis, e em diferentes linhagens celulares mamárias. Estudos adicionais reforçam que a SRPK1 está frequentemente superexpressa no câncer de mama triplo-negativo e no câncer de mama basal. Para SRPK3, também foi observada superexpressão no câncer de mama triplo-negativo. Em pacientes com essas neoplasias, a alta expressão de SRPK1 foi associada a mau prognóstico e menor sobrevida. Portanto, os resultados deste estudo demonstram que aumentos da expressão de SRPK1 estão associados a piores prognósticos em indivíduos com cancro mamário. Além disso, diferentes proteínas da família SRPKs interagem com diversos genes, vias e proteínas, desempenhando papéis cruciais em processos como regulação de fatores teciduais, alteração de eventos pró-apoptóticos, promoção do crescimento de células tumorais, metástases distantes, sinalização de proliferação, sobrevivência celular e resistência tumoral. Especificamente, as proteínas SRPK1 estão associadas ao desenvolvimento de resistência à apoptose, a agentes quimioterápicos como Tamoxifeno e Cisplatina e à adaptação celular em condições de hipóxia, destacando seu comportamento pró-oncogênico. A pesquisa também ressalta que compostos capazes de interagir com as proteínas SRPKs estão sendo estudados tanto como inibidores antineoplásicos quanto em combinação com quimioterápicos, visando combater a resistência induzida por essas proteínas. Esses achados reforçam a

importância do desenvolvimento de estratégias terapêuticas para suprimir o *splicing* alternativo aberrante promovido por SRPKs em neoplasias mamárias. Além disso, evidenciam a necessidade de aprofundar a compreensão sobre os fatores que regulam a expressão de SRPKs em tecidos mamários, abrindo perspectivas para seu uso como marcadores tumorais e alvos terapêuticos no desenvolvimento de novas moléculas antineoplásicas.

3.1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é globalmente o tipo de neoplasia mais diagnosticada em mulheres (Sung et al., 2021). Da mesma forma, os tumores mamários são a neoplasia mais comum em cadelas não castradas, respondendo por até 70% de todos os tumores caninos. Ainda, um agravante é que aproximadamente 50% dos tumores mamários caninos são malignos. Também, é importante ressaltar que vários estudos demonstram que a incidência, mortalidade e relação com a idade e o índice de massa corporal são semelhantes na doença em mulheres e cadelas (Gherman et al., 2023).

No Brasil as neoplasias mamárias são a maior causa de tumores em mulheres, representando cerca de 30% dos casos em 2022, além de ser a maior causa de morte por câncer em pacientes do sexo feminino no país (INCA, 2022).

A família de quinases SRPK atua através da fosforilação do domínio RS característico das proteínas SR e, em conjunto com as CLKs, são as principais responsáveis pela ativação destas proteínas, contudo, as SRPKs se relacionam com as proteínas SR de uma maneira mais fiel, enquanto as CLKs apresentam uma ação mais ampla em sítios RS (Giannakouros et al., 2011). As proteínas SR podem exercer função oncogênica quando, durante o desenvolvimento tumoral, favorecem o *splicing* alternativo de transcritos promotores de eventos pró-carcinogênicos, como evasão de supressores de crescimento, escape de apoptose, angiogênese e invasão (Shepard e Hertel, 2009; Oltean e Bates, 2014).

Há uma relação direta com desequilíbrios em *splicing* alternativo de pré-mRNA em variados tipos de câncer, o que permite que células tumorais sejam capazes de resistir a tratamentos anticancerígenos, além de se tornarem mais agressivas e assumirem fenótipos metastáticos. Portanto, SRPKs se mostram como alvos promissores no desenvolvimento de novas drogas para terapêutica do câncer (Huang et al., 2021).

A relação de SRPKs com o *splicing* alternativo e os processos neoplásicos reforça a importância de estudos que avaliem sua relação com diferentes tipos de neoplasias (como as neoplasias mamárias). Isto permite, a partir do conhecimento da expressão, influência na progressão, prognóstico, resistência a tratamentos, envolvimento em processos celulares e resposta a inibição desta proteína, o desenvolvimento de novas pesquisas que abordam o tema com perspectivas de utilização das SRPKs como marcadores neoplásicos e alvos para moléculas anti-

neoplásicas. Portanto, objetivo desta revisão é analisar as evidências publicadas até o momento que abordam as SRPKs em câncer de mama e/ou mamas saudáveis.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Busca e seleção dos estudos

Nesta revisão sistemática, utilizou-se a metodologia PRISMA-*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (Liberati et al., 2009), para responder à pergunta: Qual a relação das *Serine/Arginine specific-protein kinases* (SRPKs) com mamas saudáveis e/ou neoplásicas?

A busca dos estudos foi realizada no dia 26 de julho de 2023 nas bases de dados *Scopus*, *Embase*, *Science Direct* e *Pubmed* e a expressão de busca, *String*, utilizada foi: (breast OR mammary OR "mammary gland") AND ("serine arginine protein kinase" OR "serine-arginine protein kinase" OR srpk OR srpk1 OR srpk2 OR srpk3). A *string* foi adaptada de acordo com os critérios de cada base.

Após a busca, os resultados de todas as bases foram organizados no Software StArt (*State of the art trough Sistematic Review*) desenvolvido pelo LaPES, UFSCAR (Universidade Federal de São Carlos). Os artigos duplicados foram removidos e foi feita uma triagem dos artigos pela leitura do título e do resumo.

Para selecionar os artigos usou-se o critério PICOS (*Population, Intervention, Comparison and Outcomes*) como apresentado na Tabela 2 e os critérios de elegibilidade que estão descritos na Tabela 3. Não foram estabelecidos critérios de exclusão para data de publicação e idioma.

Tabela 2. Critério PICOS para seleção dos trabalhos da revisão sistemática.

P	POPULAÇÃO	Glândula mamária.
I	INTERVENÇÃO / EXPOSIÇÃO	Neoplasia.
C	COMPARAÇÃO	Sem neoplasia.
O	DESFECHO / RESULTADO	Relação das SRPKs.
S	TIPO DE ESTUDO	Observacional ou experimental.

Tabela 3. Critérios de inclusão e exclusão considerados para a seleção dos artigos da revisão sistemática.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO
Estudos que avaliaram a expressão de SRPKs ou sua associação ao desenvolvimento, progressão, prognóstico, resistência e inibição de neoplasias mamárias e/ou mamas saudáveis.
Estudos que avaliaram amostras de pacientes, modelos animais, linhagens e bancos de dados genômicos publicamente disponíveis.
Estudos que avaliam a relação das SRPKs com tumores de mama ou mamas saudáveis.
CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO
Revisão sistemática, metanálise ou revisão de literatura.
Tese, dissertação, resumo de evento, capítulo de livro, livro, <i>website</i> , protocolo de teste, carta ao editor.
Outros processos patológicos e neoplasias ou processos fisiológicos que não sejam em tecidos mamários relacionados a SRPK.
Estudos que abordam SRPKs sem estarem associadas diretamente a neoplasias mamárias ou tecidos mamários saudáveis.
Trabalhos que não apresentam resultados primários sobre SRPKs associados ao tecido mamário.

3.2.2 Extração e síntese dos dados

Os dados extraídos foram: identificação do artigo, do autor e da revista; ano de publicação; local de realização do estudo; foco do estudo (prognóstico, expressão, inibição, interação com outras proteínas, adaptação celular e resistência); espécie estudada; cultivo celular, banco de dados, *in vivo* ou tecido mamário; estudo em tecido saudável ou neoplásico; tipo de SRPK abordada.

De acordo com o foco do estudo foram extraídas informações como: abordagem de SRPK a nível de gene ou proteína, tipo de tecido ou célula utilizada no estudo, tipo de expressão, controle utilizado, proteína ou gene que interage com SRPKs, tipo de interação, agente utilizado para inibição e sua resposta, prognóstico associado, processos em que atuam e seus mecanismos.

Os dados foram agrupados em tabelas, primeiramente organizados pelo foco do estudo, e em seguida pelas informações específicas dos artigos.

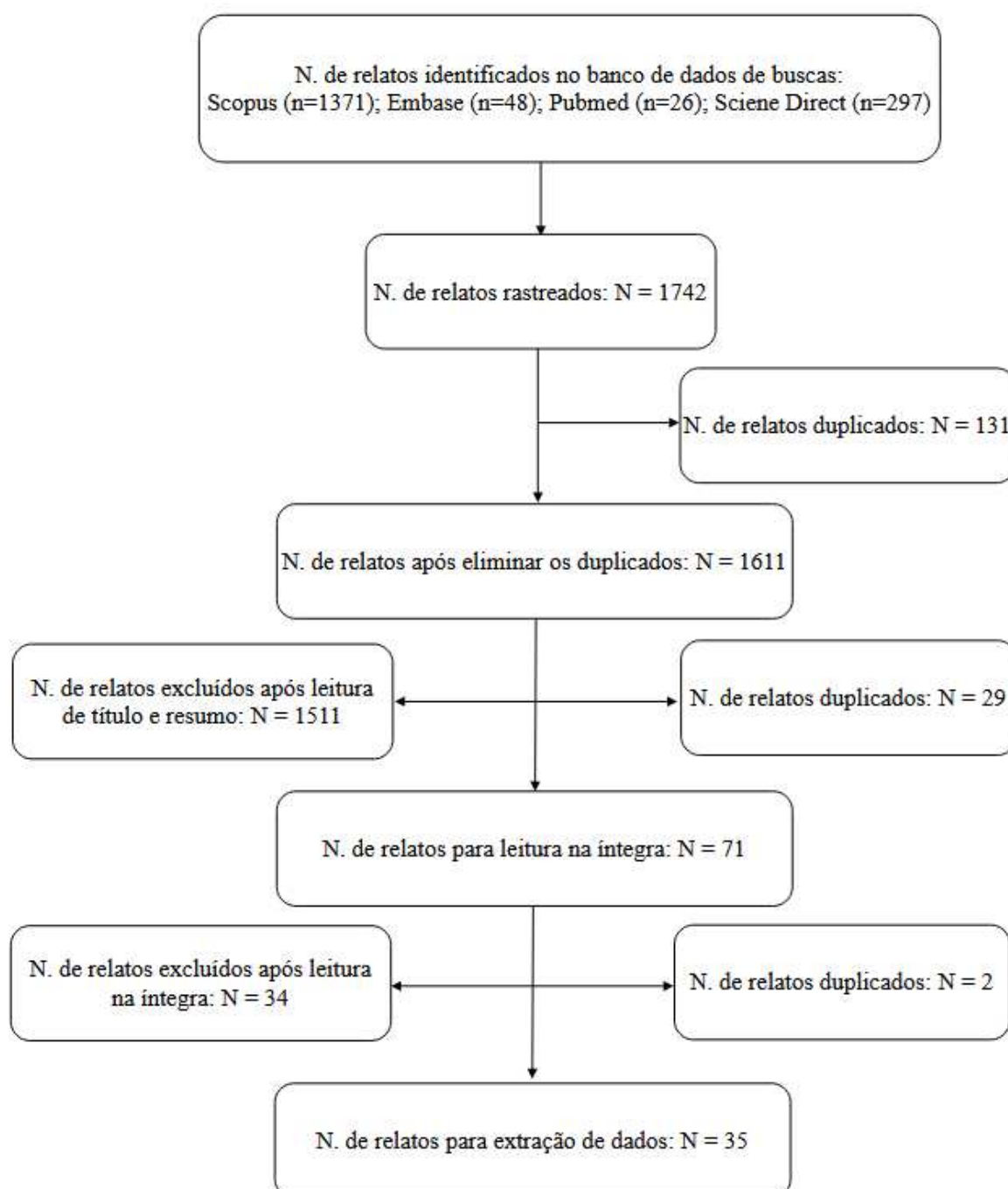
3.3. RESULTADOS

3.3.1 Seleção

Inicialmente, foram identificados nas bases de dados 1742 artigos, sendo 1371 no *Scopus*, 48 na *Embase*, 26 na *Pubmed* e 297 na *Sciene Direct*, dentre os

quais 131 estavam duplicados. Após a leitura do título e resumo dos 1611 artigos, foram excluídos 1511 que não apresentavam os critérios de inclusão, ainda 29 trabalhos estavam duplicados. Assim, foram definidos 71 trabalhos para leitura na íntegra. Destes, ainda haviam 2 artigos duplicados, 34 foram excluídos e 35 foram incluídos. Este processo está ilustrado na figura 10.

Figura 10. Fluxograma ilustrando as fases de seleção dos artigos incluídos nesta revisão sistemática.



3.3.2 Informações gerais dos artigos: título, autores, país e ano.

Os artigos selecionados foram desenvolvidos principalmente por pesquisadores americanos e chineses, sendo que dentre os trinta e cinco artigos analisados dezesseis (44,7%) foram desenvolvidos nos Estados Unidos e sete (20%) na China.

Os primeiros artigos que abordaram as proteínas SRPKs em relação ao tecido mamário saudável ou neoplásico foram publicados no ano de 2007.

As informações gerais referentes aos artigos selecionados estão em apêndice (apêndice A).

3.3.3 Características dos estudos

Em relação aos estudos selecionados foram coletadas as informações apresentadas na tabela 4.

Considerando a espécie estudada apenas um trabalho teve como foco os bovinos (2,8%), sendo os demais (97,2%) sobre a espécie humana.

Em relação ao material, vinte e quatro (68,5%) utilizaram cultivo celular, oito (22,8%) utilizaram banco de dados, oito (22,8%) usaram tecidos e cinco (14,3%) foram realizados *in vivo* (modelo animal).

Ainda, vinte e dois (62,8%) artigos abordaram apenas tecidos e/ou células mamárias neoplásicas, dois (5,7%) apenas mamas saudáveis e onze (31,5%) abordaram ambos.

Dos trinta e cinco artigos selecionados vinte e quatro (68,6%) abordaram SRPK1, seis (17,2%) SRK2, seis (17,2%) SRPK3 e dois (5,7%) não especificaram qual SRPK foi analisada no estudo.

Dezenove artigos (54,3%) abordaram a interação de SRPKs com outras proteínas ou genes, quinze estudos (42,8%) avaliaram a expressão de SRPKs em tecidos ou células, quinze (42,8%) avaliaram a inibição destas proteínas, nove (25,7%) apresentaram o prognóstico associado, três (8,5%) abordaram a resistência a medicamentos ou processos celulares e um (2,8%) trabalho relatou o processo de adaptação a hipóxia.

Tabela 4. Informações específicas dos tipos de amostras analisadas nos artigos selecionados na revisão sistemática.

Número atribuído ao artigo	Origem / tipo de amostra	Mama neoplásica ou saudável	Espécie estudada	SRPK estudada	Foco de estudo em relação a SRPK
1	Banco de dados	Neoplásica e saudável	Humana	SRPK1	Expressão
2	Cultivo celular e tecido	Neoplásica	Humana	SRPK2	Interação
3	Cultivo celular	Neoplásica e saudável	Humana	SRPK2	Interação
4	Banco de dados	Neoplásica	Humana	SRPK1	Expressão e prognóstico
5	Tecido	Neoplásica	Humana	SRPK1	Inibição
6	Cultivo celular	Neoplásica	Humana	SRPK2	Inibição
7	Cultivo celular	Neoplásica	Humana	SRPK1	Interação
8	Banco de dados	Neoplásica	Humana	SRPK3	Interação e prognóstico
9	Cultivo celular	Saudável	Bovina	SRPK (sem especificar qual)	Expressão
10	Banco de dados	Neoplásica	Humana	SRPK1	Expressão
11	Cultivo celular	Neoplásica e saudável	Humana	SRPK1	Expressão, interação, mecanismo de resistência
12	Banco de dados	Neoplásica	Humana	SRPK1	Expressão
13	Cultivo celular	Saudável	Humana	SRPK1	Inibição
14	Cultivo celular	Neoplásica	Humana	SRPK1, SRPK2 e SRPK3	Interação e inibição

15	Cultivo celular, tecido, in vivo (camundongo)	Neoplásica e saudável	Humana	SRPK1	Expressão, interação, prognóstico e inibição
16	Tecido	Neoplásica	Humana	SRPK3	Expressão
17	Tecido e cultivo celular	Neoplásica e saudável	Humana	SRPK1	Interação
18	Banco de dados	Neoplásica	Humana	SRPK1	Interação e prognóstico
19	Cultivo celular	Neoplásica	Humana	SRPK1	Prognóstico
20	Cultivo celular, in vivo (camundongo)	Neoplásica	Humana	SRPK2	Interação
21	Cultivo celular	Neoplásica	Humana	SRPK1	Interação e inibição
22	Cultivo celular, in vivo (ovo com embrião e camundongo)	Neoplásica	Humana	SRPK1	Inibição
23	Cultivo celular	Neoplásica	Humana	SRPK1 e SRPK3	Expressão
24	Banco de dados	Neoplásica	Humana	SRPK1	Expressão
25	Cultivo celular e tecido	Neoplásica e saudável	Humana	SRPK1	Inibição e prognóstico
26	Cultivo celular e tecido	Neoplásica e saudável	Humana	SRPK1	Expressão, interação e prognóstico
27	Tecido	Neoplásica e saudável	Humana	SRPK1	Expressão, interação e inibição
28	Cultivo celular	Neoplásica	Humana	SRPK1	Interação, adaptação celular e inibição

29	Cultivo celular	Neoplásica	Humana	SRPK1	Expressão, interação, mecanismo de resistência e inibição
30	Cultivo celular e modelo animal (camundongo)	Neoplásica e saudável	Humana	SRPK1	Interação, mecanismo de resistência e inibição
31	Cultivo celular	Neoplásica	Humana	SRPK (não específica qual)	Inibição
32	Cultivo celular	Neoplásica e saudável	Humana	SRPK3	Inibição
33	Banco de dados	Neoplásica e saudável	Humana	SRPK3	Expressão, interação e prognóstico
34	Cultivo celular e modelo animal (camundongo)	Neoplásica	Humana	SRPK1	Expressão, interação, inibição e prognóstico
35	Cultivo celular	Neoplásica	Humana	SRPK2	Interação

3.3.4 Estudos que avaliam a expressão

Kozlowski et al. (2009) avaliaram a diferença na expressão de genes em células epiteliais mamárias bovinas, comparando culturas 3D polarizadas com o sistema convencional em monocamada (2D). Estes demonstraram que houve a expressão de SRPK com a utilização de cultura 3D em matrigel.

Estudos observaram maior expressão de SRPK1 em tecido mamário neoplásico em comparação com tecidos mamários saudáveis (Hayes et al., 2007; Li et al., 2014; Lin et al., 2014). Li et al. (2014) observaram que SRPK1 é regulado positivamente no câncer de mama tanto em níveis de mRNA quanto de proteína. Ainda, foi evidente a alta expressão desta proteína na maioria das linhagens de células tumorais de mama, sendo expressa predominantemente em células epiteliais ductais. Já Hijazi et al. (2020) identificaram a expressão de SRPK1 e SRPK3 em

células MCF7 (linhagem de células epiteliais derivada de um derrame pleural de uma mulher com adenocarcinoma de mama).

Outros trabalhos observaram a expressão de SRPKs associadas a tipos específicos de tumores de mama. Assim, Carels et al. (2015) verificaram que em tumores triplo negativos (TNBC), que geralmente apresentam mau prognóstico, ocorre a regulação positiva de genes envolvidos no controle do ciclo celular e na ativação de invasão e metástases, incluindo SRPK1. Cheng et al. (2017) também verificaram que a expressão de SRPK1 foi significativamente elevada em amostras triplo negativas. De maneira semelhante, Malvi et al. (2020) observaram que SRPK1 é superexpresso em TNBC em comparação com outros tipos de câncer e com o tecido saudável. Ainda, foi detectada alta expressão de SRPK1 no TNBC em comparação com a linhagem de células MCF7, que é positiva para receptores hormonais (Wang et al., 2020). Por fim, Wu et al. (2021) concluíram que SRPK3 também foi regulado positivamente em pacientes com TNBC em comparação com controles saudáveis.

Willis et al. (2015) realizaram um estudo para identificar alvos viáveis para o tratamento do TNBC, onde conduziram uma análise de enriquecimento do conjunto de genes em sete diferentes coortes de expressão gênica do genoma completo do câncer de mama, identificando genes consistentemente enriquecidos que compartilham um motivo promotor comum. Neste estudo observaram que SRPK1 está entre os genes enriquecidos encontrados no maior número de coortes, indicando que os genes são consistentemente enriquecidos ao comparar triplo negativo vs ER+(HER2⁻) – positivos para receptor de estrogênio e receptor do fator de crescimento epidérmico humano. A regulação positiva de SRPK1 também foi observada no câncer de mama basal, sendo ainda correlacionada com o subtipo luminal B (Huang et al., 2019; van Roosmalen, 2015).

Wei et al. (2022) observaram que o gene SRPK1 foi um dos genes expressos diferencialmente em conjuntos de dados, sendo regulado positivamente quando realizada a comparação de angiossarcoma mamário secundário e primário. No estudo de Gruel et al. (2010) o gene SRPK3 foi encontrado tanto nos grupos de carcinoma lobular invasivo quanto nos de carcinomas ductais invasivos.

Além disso, um estudo demonstrou que a expressão de SRPK1 revelou-se positivamente correlacionada com os estágios clínicos, classificação TNM, mas negativamente correlacionada com a diferenciação patológica (Li et al., 2014).

Ainda, SRPK1 também pareceu aumentar coordenadamente com o grau do tumor (Hayes et al., 2007).

Os estudos que avaliaram a expressão de SRPKs estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Resultados da expressão de SRPKs dos artigos selecionados na revisão sistemática.

N. do artigo	Tipo de SRPK	Gene / proteína	Expressão		
			Tecido / célula	Expressão	Controle
1	SRPK1	Gene	Câncer de mama triplo negativo	↑	Linagem de células normais
4	SRPK1	Gene	Câncer de mama triplo negativo	↑	.
9	Não específica	Gene	BME-UV1 em sistema 3D	Expresso	Comparação do perfil transcricional de células cultivadas em sistema 3D vs. 2D
10	SRPK1	Gene	Angiossarcoma mamário primário e secundário	↑	.
11	SRPK1	Proteína	Canceroso	↑	Linagem de células normais
12	SRPK1	Gene	Câncer de mama triplo negativo	Enriquecido	ER+(HER2-)
15	SRPK1	Proteína	Câncer de mama triplo negativo (ERBB2/ER/PR negativas)	↑	Tecido adjacente normal e comparação com cânceres de mama não TNBC
16	SRPK3	Gene	Carcinoma lobular invasivo e carcinoma ductal invasivo	Expresso	.
23	SRPK1 e SRPK3	Gene	MCF7	Expresso	.
24	SRPK1	Proteína	Câncer de mama basal	↑	.

26	SRPK1	Proteína e gene	Canceroso	↑	Tecido adjacente normal
27	SRPK1	Proteína	Canceroso	↑ Expresso predominantemente em células epiteliais ductulares de mama ↓ de SRPK1 nas células MCF10A (quase normais em comparação com MCF7, MDA231 e MDA468)	Tecido adjacente normal MCF10A
29	SRPK1	Proteína	Câncer de mama triplo negativo	↑	MCF7 (positivas para receptor hormonal)
33	SRPK3	Proteína	Câncer de mama triplo negativo	↑	Controles saudáveis
34	SRPK1	Proteína	Câncer de mama basal ER-negativas mais agressivas	↑ Correlacionada ao subtipo B luminal	Outras linhagens neoplásicas de mama

3.3.5 Estudos que avaliam a interação com outras proteínas ou genes

Segundo Kocatürka et al. (2013) a expressão de SRPK2, que ativa o regulador de *splicing* pré-mRNA do TF (fator tecidual) ASF/SF2, foi alterada por TF solúvel com emenda alternativa (asTF) e fator tecidual de comprimento total (flTF), sugerindo que variantes de *splice* de TF podem regular sua própria expressão. Isso indica que o asTF aumenta a proliferação das células de câncer de mama via modulação de reguladores do ciclo celular, de indutores de proliferação e da supressão de proteínas pró-apoptóticas.

Os artigos de McClellan et al. (2022) e Tan et al. (2021) avaliaram a relação da SRPK2 com o processo de lipogênese “de novo”. Assim, no trabalho de McClellan et al. (2022) foi observado que o IGF-1 induz a localização nuclear e a

fosforilação de SRPK2 através de mTORC1 e que SRPK2 contribui para a expressão de FASN e a síntese de ácidos graxos. Além disso, IGF-1 regula o FASN através da revogação da retenção de íntrons, que dependem de SRPK2. O eixo IGF-1-SRPK2 em células MDA-MB-231 medeia a regulação do mRNA FASN através do SRSF-1. A localização nuclear de SRPK2 é induzida por IGF-1 e o eixo IGF-1-mTORC1-SRPK2 altera a localização nuclear de SRSF-1. Também, o eixo IGF-1-mTORC1-SRPK2 contribui para a regulação metabólica lipogênica através de FASN em células de câncer de mama triplo negativas. Ainda, a SRPK2 não afeta significativamente a expressão da proteína FASN em células MCF-7, verificando-se que a redução de SRPK2 resultou em reduções significativas no palmitato total após a exposição a IGF-1 apenas em células MDA-MB-231. Já Tan et al. (2021) relataram que OGT medeia a O-GlcNAcilação, a translocação nuclear e a ativação de SRPK2. O SRPK2 O-GlcNAcilação exibiu ligação aumentada à importina A, resultando na importação para o núcleo, fosforilação de proteínas SR a jusante e *splicing* de pré-mRNAs lipogênicos. Além disso, esse eixo funciona em paralelo com a sinalização de mTOR e ativação por fosforilação, dependente de mTOR, de SRPK2. Ainda, a OGT O-GlcNAcila SRPK2 em Ser 490, Thr 492 e Thr498 e promove a ativação e translocação nuclear de SRPK2 (que promove a estabilidade do mRNA do gene lipogênico e a lipogênese “de novo”). Constatou-se ainda que a fosforilação da proteína SR por SRPK2 é necessária para o *splicing* eficiente de mRNA de genes lipogênicos. A enzima OGA removeu O-GlcNAc de SRPK2 in vitro. Assim, OGT interagiu e O-GlcNAcila SRPK2, porém não interagiu com SRPK1. SRPK2 se liga a OGT através de uma região interna. Curiosamente, a homologia das regiões internas entre SRPK1 e SRPK2 é muito baixa, o que explica por que OGT se liga a SRPK2, mas não a SRPK1. Todos esses dados apoiam a hipótese de que OGT não afeta SRPK1. Por fim, verificou-se que a O-GlcNAcilação de SRPK2 mediada por OGT funciona em paralelo com a via mTORC1/S6K1, e este é um possível mecanismo de detecção de glicose que precisa de mais investigação.

Em relação a interação de SRPKs com outras proteínas ou genes, para obter *insights* sobre as interações genéticas promotoras de tumores entre os genes supressores de tumores, Zhao et al. (2021) conduziram uma triagem combinatória de CRISPR acoplada ao perfil transcriptômico em células epiteliais mamárias humanas. Neste trabalho verificaram que a expressão de SRPK1 foi regulada

positivamente de forma sinérgica em NF2-TP53 Double Knockout (DKO), bem como em pacientes com câncer de mama com alterações duplas nas vias TP53 e Hippo.

Lin et al. (2014) demonstraram que grande parte da proteína SRPK1 foi enriquecida no citoplasma de células MCF-7, e resultados semelhantes foram observados em células HBL100 (tecido mamário saudável). Relataram que a correlação entre a expressão elevada de SRPK1 e o acúmulo citoplasmático é dependente de fosforilação de Ser309 de RBM4. A elevação na proteína SRPK1 induziu o acúmulo citoplasmático de RBM4, que aboliu o efeito de RBM4 na expressão de transcritos pró-apoptóticos IR-B e MCL-1S. Também verificaram que o *splicing* do pré-mRNA IR e MCL-1 é modulado pela rede SRPK1-RBM4 em células de câncer de mama.

Segundo Malvi et al. (2020) a inibição de LIMK2 bloqueia a fosforilação e a atividade de SRPK1; portanto, LIMK2 transmite um efeito promotor de metástase distal, em parte por meio da regulação da função de SRPK1. Li et al. (2014) verificaram que a expressão de PR e C-erbB-2 foram correlacionadas com a expressão de SRPK1.

SRPK1 é alvo direto do miR-9, sendo regulado negativamente pelo miR-9 nos níveis de mRNA e proteína (Selcuklu et al., 2012). Ainda, os microRNAs miR-99a-5p e miR-99a-3p também regulam a expressão de SRPK1, atuando na supressão de tumores BRCA (Shinden et al., 2020).

Hayes et al. (2007) observaram que níveis de MAPK3, MAPK2 e AKT não se alteraram nas células após a redução de SRPK1. Porém, a expressão diminuída de SRPK1 inibiu a sinalização por meio de MAPK3 e MAPK1 (o que pode ser devido às alterações observadas no *splicing* de transcritos MAP2K2 que codificam uma das duas principais cinases responsáveis pela fosforilação das proteínas MAPK3 e MAPK1).

Wang et al. (2020) constataram que SRPK1 é acetilada de maneira dependente de Tip60. Ainda, a acetilação interfere na fosforilação de SRPK1 e ativação de SRSF. Também observaram que a acetilação de SRPK1 é prevalente em TNBCs. Ainda, constataram que células resistentes de câncer de mama poderiam ser ressensibilizadas ao aumentar a acetilação de SRPK1 mediada por Tip60.

Segundo van Roosmalen et al. (2015) demonstrou-se uma correlação significativa entre a alta coloração de SRPK1 e de Ki67 em câncer de mama positivo

para estrogênio. Além disso, relataram que o aumento da expressão de NEK2 e SRPK1 em pacientes com câncer de mama positivo para estrogênio está relacionado a menor tempo de sobrevida livre de metástase, já em pacientes com câncer de mama negativo para estrogênio ocorre aumento da expressão de ITGB3BP e MAP3K8. Também, SRPK1 está envolvida no controle da rede de sinalização NF-kappa β . Além disso, demonstrou-se que o *knockdown* de SRPK1 reduziu a fosforilação de FAK, paxilina e p130Cas.

Segundo Taze et al. (2022) o alto nível de fosforilação de proteínas SR e SF2 observado sob normóxia é rapidamente diminuído após a privação de oxigênio. Essas mudanças nos níveis de fosforilação dependem principalmente do controle da localização subcelular de SRPK1. Em condições normais de oxigênio, as proteínas SAFB1/2 povoam principalmente a matriz nuclear e mostram maior associação com componentes da maquinaria de *splicing*, como SF2 e SRPK1. Ainda, dados apoiam uma ligação causal entre os efeitos induzidos por hipóxia no eixo SAFB1/2-SRPK1-SF2 e o *splicing* alternativo de mRNA VEGF. Os efeitos de hipóxia em SRPK1 incluem sua interação reduzida com SAFB e SF2 acompanhada por sua migração do núcleo para o citoplasma, bem como sua associação aumentada com estruturas citoplasmáticas contendo hsp70.

Notas et al. (2013) relataram que as principais funções modificadas pelos genes ERa17p e Era-related são a proliferação, diferenciação e receptores-sinalizadores, sendo SRPK2 regulado positivamente.

PKC é ativada por PMA promovendo ativação de cinases a jusante SRPK1 e PKR em células MDA MB-231 (Dolai et al., 2011).

Wu et al. (2021) verificaram que SRPK3 pode regular positivamente o *splicing* de PCYT2_44231_AA e então levar a menor sobrevivência do TNBC.

Segundo Zhang et al. (2021) SRPK3, SRSF8 e RBM15B não têm ligação com outros genes, indicando que estas proteínas podem funcionar de forma independente em tumores de mama. Também, a inibição de SRPKs não alterou o *splicing* de S6K (Araki et al., 2015).

As informações relativas aos estudos que avaliaram a interação de outras proteínas e genes com as proteínas SRPKs estão descritas na tabela 6.

Tabela 6. Informações referentes aos artigos selecionados que abordam a interação de SRPKs com outras proteínas ou genes.

Interação com outras proteínas ou genes					
N. do artigo	SRPK	Gene / proteína	Proteína ou gene que interage	Interação	Processo envolvido
2	SRPK2	Gene	asTF e flTF	A expressão de SRPK2 foi alterada pelo asTF e flTF.	Expressão de fator tecidual
3	SRPK2	Proteína	IGF-1, mTORC1, FASN, SRSF-1	<p>IGF-1 induz a localização nuclear e a fosforilação de SRPK2 por meio do mTORC1.</p> <p>↓ na expressão da proteína FASN após ↓ de SRPK2.</p> <p>IGF-1 regula o FASN por meio da revogação da IR (dependente de SRPK2).</p> <p>O eixo IGF-1-mTORC1-SRPK2 regula o FASN através do SRSF-1.</p> <p>Localização nuclear de SRPK2 induzida por IGF-1.</p> <p>Eixo IGF-1-mTORC1-SRPK2 altera a localização nuclear de SRSF-1.</p> <p>O eixo IGF-1-SRPK2 nas células MDA-MB-231 medeia a regulação do mRNA do FASN por meio do SRSF-1.</p> <p>↓ de SRPK2: ↓ palmitato total após a exposição a IGF-1 apenas em MDA-MB-231.</p>	Síntese de ácidos graxos "de novo"
7	SRPK1	Gene	NF2-TP53 DKO, vias TP53 e Hippo	↑ de SRPK1 juntamente com ↑ NF2-TP53 DKO e em pacientes com alterações duplas nas vias TP53 e Hippo.	Não relatado
8	SRPK3	Gene	Não específica	SRPK3, SRSF8 e RBM15B não têm ligação com outros genes.	Não relatado
11	SRPK1	Proteína	RBM4, IR, MCL-1	↑ de SRPK1 e o acúmulo citoplasmático dependente de fosforilação de Ser309 de RBM4 em MCF-7.	Eventos pró-apoptóticos

O *splicing* do pré-mRNA IR e MCL-1 é modulado pela rede SRPK1-RBM4.

14	SRPKs	Proteína	S6K	Inibição de SRPKs não alterou o <i>splicing</i> de S6K.	Crescimento de células cancerígenas
15	SRPK1	Proteína	LIMK2	A inibição de LIMK2 bloqueia a fosforilação e a atividade de SRPK1.	Metástase distal
17	SRPK1	Gene e proteína	MiR-9	SRPK1 regulado negativamente pelo miR-9.	Não relatado
18	SRPK1	Gene	miR-99a-5p e miR-99a-3p	miR-99a-5p e miR-99a-3p regulam um total de 16 genes (incluindo SRPK1)	Supressão de tumores BRCA
20	SRPK1 e SRPK2	Proteína	mTOR, S6K1, OGT, importina A, SR75, SR55, SR40 e SR30	<p>SRPK2: O-GlcNAcilação por OGT.</p> <p>O SRPK2 O-GlcNAcilação: ↑ ligação à importina A (esse eixo funciona em paralelo com a sinalização de mTOR e ativação de SRPK2).</p> <p>OGT: media a SRPK2 O-GlcNAcilação em Ser 490, Thr 492 e Thr 498 e promove a translocação e ativação nuclear de SRPK2.</p> <p>Inibição da O-GlcNAcilação de SRPK2 e da via mTORC1-S6K1: não afetou a fosforilação de SRPK2.</p> <p>O-GlcNAcilação de SRPK2: promove o crescimento de células de câncer de mama em cultura e <i>in vivo</i>.</p> <p>SRPK2: promove a estabilidade do mRNA do gene lipogênico e a lipogênese de novo.</p> <p>Bloqueio/inibição de OGT: ↓ coloração nuclear e aumentou a coloração citoplasmática de SRPK2.</p> <p>OGT não afeta SRPK1.</p> <p>O-GlcNAcilação de SRPK2 por OGT funciona em paralelo com a via mTORC1/S6K1.</p>	Lipogênese "de novo"
21	SRPK1	Proteína	PKC e PMA	PKC ativada por PMA: promove ativação de cinases a jusante SRPK1 e PKR.	Não relatado

26	SRPK1	Gene e proteína	PR e C-erbB-2	Expressão de PR e C-erbB-2 correlacionada com a expressão de SRPK1.	Não relatado
27	SRPK1	Proteína	MAPK3, MAPK2 e AKT	Os níveis totais de proteína de MAPK3, MAPK2 e AKT não mudaram nas células após a redução em SRPK1. ↓ de SRPK1: redução na fosforilação e alterações no padrão de splicing das transcrições de MAP2K. ↓ de SRPK1 inibiu a sinalização por meio de MAPK3 e MAPK1 e ↓ leve da sinalização por meio da fosforilação de AKT.	Sinais de proliferação e sobrevivência
28	SRPK1	Proteína	SAFB1/2, SF2, hsp70, VEGF	↓ fosforilação de proteínas SR e SF2: privação de oxigênio por controle da localização subcelular de SRPK1. Condições normais de oxigênio: SAFB1/2 povoam principalmente a matriz nuclear e maior associação com SF2 e SRPK1. Ligação causal entre os efeitos induzidos por hipóxia no eixo SAFB1/2-SRPK1-SF2 e o splicing alternativo de mRNA VEGF. Hipóxia em SRPK1: ↓ interação com SAFB e SF2 (migração do núcleo para o citoplasma) e ↑ associação a estruturas citoplasmáticas contendo hsp70.	Não relatado
29	SRPK1	Proteína	Tip60	Ressensibilização de células resistentes: ↑ da acetilação de SRPK1 mediada por Tip60.	Resistência neoplásica
30	SRPK1	Proteína	SRSF5	SRPK1 pode interagir com SRSF5 para fosforilá-lo.	Resistência neoplásica
33	SRPK3	Proteína	PCYT2_44231_A	SRPK3: pode regular positivamente o <i>splicing</i> de PCYT2_44231_AA.	Baixa sobrevivência de TNBC.
34	SRPK1	Proteína	NF-κB, FAK, ki67, NEK2 paxilina e p130Cas	SRPK1: controle da rede de sinalização NF-κB	Controle da migração de células

				<p>A fosforilação de FAK, paxilina e p130Cas: ↓ pelo knockdown de SRPK1.</p> <p>Correlação significativa entre alta coloração de SRPK1 e Ki67 em câncer de mama positivo para estrogênio.</p> <p>↑ de NEK2 e SRPK1 em câncer de mama positivo para estrogênio: ↓ tempo de sobrevida livre de metástase.</p>	tumorais de mama e formação de metástases.
35	SRPK2	Gene	ERa17p	Principais funções modificadas por ERa17p: proliferação do ciclo celular, diferenciação e receptores-sinalização (SRPK2 regulado positivamente).	Não relatado

3.3.6 Estudos que avaliam a inibição de SRPKs

Considerando a inibição de SRPK1, Zhu et al. (2018) avaliaram um composto da classe química da pirrolopirimidina (CC-671) na progressão mitótica e no *splicing* pré-mRNA de genes envolvidos na sobrevivência de tumores TNBC. Neste estudo verificou-se que CC-671 não inibiu os membros da família SRPK potentemente. Segundo Araki et al. (2015) o composto cpd-1 apresentou atividade inibitória significativa contra SRPK1 e SRPK2. Verificou-se a capacidade dos inibidores de moléculas pequenas para inibir de forma mais eficiente as atividades de CLK1/CLK2 em comparação com as de SRPK1/SRPK2, o que foi significativamente correlacionado com as alterações de *splicing* do pré-mRNA S6K, bem como com a inibição do crescimento de células cancerígenas. Estes resultados sugerem que CLKs e SRPKs funcionam de forma diferente na maquinaria de *splicing* através das suas especificidades de substrato, particularmente para proteínas SR.

De maneira similar, a SRPK1 foi identificada como uma proteína que se liga à Bis (bisindolilmaleimida), um potente inibidor das quinases serina-treonina, como a SRPK1 e a PKR, que provavelmente desempenham papéis importantes no desenvolvimento de carcinomas basais de mama (Dolai et al., 2011).

Yeyeodu et al. (2019) constataram que SRPK1 faz parte das moléculas que mudaram significativamente pelo uso de nanopartículas de prata ao longo do tempo (6h e 8 dias) em tecido mamário. Segundo o estudo de Malvi et al. (2020) a inibição

genética da SRPK1 pelos shRNAs ou a sua inibição farmacológica (SRPIN340) bloqueou os atributos metastáticos das células TNBC.

Toda et al. (2020) verificaram que SRPK1 foi regulado negativamente de forma significativa pela transfecção de miR-101-5p em células MDA-MB-231 e MCF-7.

Segundo Hayes et al. (2007) a regulação negativa de SRPK1 em linhagens celulares de tumor da mama após a transfecção com a construção codificadora de siRNA promoveu redução da expressão de SRPK1 em células tumorais MCF7 e um aumento de células em apoptose, sem diferença significativa na proporção de células MCF10A não transformadas passando por apoptose. Células MCF10A e MCF7 transfectadas também foram tratadas com Gemcitabina e Cisplatina para avaliar o potencial de usar *knockdown* de SRPK1 em combinação com estratégias quimioterápicas convencionais. A adição de Gencitabina, Cisplatina ou uma combinação dos dois medicamentos às células MCF7 expressando quantidades reduzidas de SRPK1 resultou em níveis significativamente maiores de apoptose quando comparadas às células MCF7 transfectadas com o plasmídeo de controle. Por fim, observaram que os níveis da cinase relacionada, SRPK2, permaneceram constantes após a transfecção de qualquer plasmídeo, apoiando a especificidade desta abordagem.

Stoletov et al. (2018) observaram que o silenciamento do SRPK1 com shRNA não inibiu significativamente a motilidade de MDA-MB-231. Ainda, Szwajda et al. (2015) confirmaram experimentalmente a inibição do crescimento celular após o *knockdown* de SRPK3 por siRNAs. van Roosmalen et al. (2015) verificaram que a depleção de SRPK1 ou MAP2K2, ambas inibindo a migração celular pelo shRNA, estabilizou as estruturas de adesões focais em toda a periferia celular e quase não ocorreu nenhuma reorganização. Observaram também que o *knockdown* de SRPK1 em células de câncer de mama negativas para o estrogênio reduz sua capacidade migratória e estabiliza as adesões focais. Ainda, a redução estável de SRPK1 baseada em shRNA suprimiu a metástase para órgãos distantes, incluindo pulmão, fígado e baço, e inibiu a reorganização da adesão focal.

Wang et al. (2020) também avaliaram o efeito da Cisplatina, verificando que em células de câncer de mama a Cisplatina induziu a acetilação de SRPK1. Nas células resistentes correspondentes, reduziu a acetilação, mas aumentou a fosforilação e a atividade da cinase de SRPK1, favorecendo o *splicing* de algumas

variantes antiapoptóticas. Ainda, SRPIN340 foi capaz de ressensibilizar as células resistentes à Cisplatina, possivelmente favorecendo o *splicing* de variantes pró-apoptóticas.

A inibição de SRPK1 por um pequeno inibidor, SRPKIN-1, suprimiu a fosforilação de SRSF5. Isso aumentou a proporção de SRSF5 interagindo com o éxon 11 de NCOR2, reduzindo a produção de mRNA de BQ. Portanto, a inibição da SRPK1 pode reduzir a expressão de BQ e a resistência ao Tamoxifeno alterando a atividade de SRSF5 (Tsoi et al., 2023).

Leea et al., 2017 verificaram que SRPK foi um dos genes cuja expressão foi restaurada ao nível de MCF-7 após tratamento com *cold atmospheric plasma* (CAP) em células MCF-7 resistentes ao Tamoxifeno. De forma semelhante, Miller et al. (2007) demonstraram que um protocolo neoadjuvante com Letrozol causou redução consistente na expressão do gene SRPK1.

Segundo Taze et al. (2022) o tratamento das células hipóxicas com o antioxidante NAC restaurou os níveis de SRPK1 nuclear e também recuperou a proporção de SF2 das frações da matriz solúvel para nuclear.

As informações relativas aos estudos que avaliaram a inibição de SRPKs estão descritas na tabela 7.

Tabela 7. Informações dos artigos selecionados que abordam a inibição de SRPKs.

Inibição				
N. do artigo	Tipo de SRPK	Gene / proteína	Agente	Resposta
5	SRPK1	Gene	Letrozol	SRPK1 mudou com o tratamento.
6	SRPK2	Gene	CAP	SRPK: expressão restaurada ao nível de MCF-7 em comparação a linhagem resistente.
13	SRPK1	Gene	AgNPs	SRPK1: alterada por AgNP ao longo do tempo (6h e 8 D).
14	SRPK1 e SRPK2	Proteína	Cpd-1, Cpd-2 e Cpd-3	Cpd-1: atividade inibitória contra SRPK1 e SRPK2. Inibidores de moléculas pequenas: capacidade melhor CLK1/CLK2 em comparação com as de SRPK1/SRPK2.
15	SRPK1	Proteína	ShRNAs e SRPIN340	Inibição de SRPK1 pelos shRNAs ou SRPIN340 bloqueou os atributos metastáticos das células TNBC.

21	SRPK1	Proteína	Bisindolilmaleimida (Bis)	Alvos de Bis: SRPK1 e PKR.
22	SRPK1	Gene	shRNA	Silenciar SRPK1: sem efeito na motilidade de MDA-MB-231.
25	SRPK1	Gene	miR-101-5p	SRPK1: ↓ pela transfecção por miR-101-5p em células MDA-MB-231 e MCF-7. ↓ SRPK1: aumentou a proporção de células passando por apoptose e as sensibilizou à intervenção quimioterápica.
27	SRPK1	Proteína	SiRNA, plasmídeo, gemcitabina e cisplatina	A adição de Gencitabina e/ou Cisplatina ou às células MCF7 expressando quantidades ↓ de SRPK1 resultou em maior apoptose. Plasmídeos: não alteram níveis de SRPK2.
28	SRPK1	Proteína	NAC	Tratamento das células hipóxicas com o antioxidante NAC: restaurou os níveis de SRPK1 nuclear.
29	SRPK1	Proteína	SRPIN340, carboplatina e oxaliplatina	Cisplatina em células resistentes: ↓ a acetilação e ↑ fosforilação e a atividade da cinase de SRPK1. SRPIN340: capaz de ressensibilizar as células resistentes à Cisplatina.
30	SRPK1	Proteína	SRPKIN-1	SRPKIN-1: a inibição de SRPK1 suprimiu a fosforilação de SRSF5.
31	SRPK	Proteína	CC-671	CC-671: não inibiu os membros da família SRPK.
32	SRPK3	Proteína	siRNAs	SRPK3: inibição do crescimento após sua redução por siRNAs. Depleção de SRPK1: inibiu a migração e inibiu a dinâmica de FA (Focal Adhesions).
34	SRPK1	Proteína	shRNA	Redução de SRPK1: suprimiu a metástase para órgãos distantes e inibiu a reorganização da adesão focal. Depleção de SRPK1: estabilizou as estruturas de FA em toda a periferia da célula.

3.3.7 Estudos que avaliam o prognóstico associado a SRPKs

Considerando os estudos sobre prognóstico, SRPK1 foi significativamente associado a mau prognóstico em pacientes com BRCA (Toda et al., 2020). De maneira semelhante Shinden et al. (2020) constataram que SRPK1 está entre os genes em que altos níveis de expressão foram significativamente preditivos de

tempos de sobrevivência mais curtos em pacientes com BRCA. Ainda, na pesquisa de Wang et al. (2018) observou-se previsão de baixa sobrevida em 28% pacientes com câncer do tipo basal que apresentaram superexpressão simultânea de SRPK1, YBX1, SNRPA1 e RPL30. De forma semelhante, Cheng et al. (2017) também observaram quatro genes (genes SRPK1, PCCA, PRLR e FBP1) podem prever de forma ideal a sobrevida livre de recidiva em câncer de mama HER-2 negativo após quimioterapia baseada em Taxanos e Antraciclina. A maior expressão de SRPK1 também foi associada a menor tempo de sobrevivência dos pacientes (Li et al. 2014). Ainda, a superexpressão de SRPK1 causa aumento da incidência de metástase, recorrência e morte por câncer (Malvi, 2020). Também, altos níveis de expressão de SRPK3 estavam relacionados a menor sobrevida global de pacientes com TNBC (Wu et al., 2021).

Zhang et al. (2021) obtiveram um modelo de previsão de prognóstico de três genes (SRPK3, PUF60 e PNN) no subtipo basal. Observou-se que SRPK3 e PUF60 foram identificados como genes positivos relacionados ao risco prognóstico, enquanto o PNN foi reconhecido como um gene negativo relacionado ao risco. Assim, estes genes são potenciais biomarcadores multidimensionais para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de BRCA.

Segundo van Roosmalen et al. (2015), SRPK1 mostrou associação clínica significativa com a agressividade do tumor, e os níveis aumentados desta proteína estão correlacionados com mau prognóstico em pacientes com câncer de mama. Além disso, os tumores primários de mama com níveis aumentados de SRPK1 mostraram preferência por direcionar metástases para o pulmão e o cérebro. Ainda, o aumento da expressão de NEK2 e SRPK1 em pacientes com câncer de mama ER-positivo está relacionado a uma menor sobrevida livre de metástases de câncer.

As informações relativas aos estudos que avaliaram o prognóstico associado a SRPKs estão descritas na tabela 8.

Tabela 8. Informações dos artigos selecionados que abordam o prognóstico associado a SRPKs.

Prognóstico			
N. do artigo	Tipo de SRPK	Gene / proteína	Prognóstico
			↑ pontuação de risco (maior risco de mortalidade): ↑ do nível de expressão de SRPK1.
4	SRPK1	Gene	Genes SRPK1, PCCA, PRLR e FBP1: podem prever de forma ideal a sobrevida livre de recidiva em câncer de mama HER-2 negativo após quimioterapia baseada em taxanos e antraciclinas.
8	SRPK3	Gene	SRPK3 e PUF60: genes positivos relacionados ao risco prognóstico.
15	SRPK1	Proteína	↑ SRPK1: ↑ de incidência de metástase, recorrência e morte.
18	SRPK1	Gene	↑ SRPK1: preditivo de tempos de sobrevivência mais curtos em BRCA.
19	SRPK1	Gene	Superexpressão simultânea de SRPK1, YBX1, SNRPA1 e RPL30: previsão de menor sobrevida.
25	SRPK1	Gene	Expressão de SRPK1: pior prognóstico em BRCA.
26	SRPK1	Gene e proteína	Proteína SRPK1: positivamente correlacionada com estadiamento clínico, classificações TNM e negativamente com a diferenciação patológica. ↑ SRPK1: ↓ tempo de sobrevivência.
33	SRPK3	Gene	↑ SRPK3: ↓ sobrevida global em TNBC.
34	SRPK1	Proteína	↑ SRPK1: metástase preferencial para os pulmões e cérebro, mau prognóstico da doença e ↑ da agressividade. ↑ de NEK2 e SRPK1 em câncer de mama ER-positivo: ↓ sobrevida livre de metástases.

3.3.8 Estudos que avaliam mecanismo de resistência ou adaptação

Lin et al. (2014) demonstraram o envolvimento de SRPK1 na resistência a apoptose no câncer de mama através da modulação pela rede SRPK1-RBM4.

Wang et al. (2020) relataram que a expressão de SRPK1 pode não ser o único determinante principal da responsividade à Cisplatina, porém, a diminuição na expressão de Tip60 e acetilação de SRPK1 leva à fosforilação aumentada de SRPK1 e SRSFs induzindo o *splicing* alternativo de variantes anti-apoptóticas. Ainda, o baixo nível de acetilação de SRPK1 pode conferir quimiorresistência, pois a acetilação de SRPK1 pode favorecer o *splicing* pró-apoptótico. Como tanto a hiperfosforilação quanto a hipofosforilação de SRSFs comprometerão o pré-mRNA AS59, um equilíbrio entre a expressão de SRPK1 e a fosforilação de SRSF é crítico para impulsionar a produção de variantes de *splicing* pró-sobrevivência para conferir resistência à cisplatina.

Segundo Tsoi et al. (2023) a superexpressão de BQ323636.1 (BQ) é um dos mecanismos que conferem resistência ao Tamoxifeno. Em seu estudo verificaram que o tratamento com SRPKIN-1 poderia reverter a resistência a este medicamento. Portanto, a inibição do SRPK1 altera a atividade do SRSF5, reduzindo a expressão do gene BQ e a resistência ao Tamoxifeno no câncer de mama positivo para estrogênio.

Em relação a adaptação celular quando os níveis de oxigênio caem, a rápida oxidação mediada por ROS de SAFBs e a subsequente dissociação de complexos ancorados na matriz nuclear garantem que mais moléculas de SF2 livres se tornem imediatamente disponíveis dentro do núcleo e que o SRPK1 nuclear seja translocado para o citoplasma. Esses eventos ajustam finamente o nível de fosforilação da proteína SR e promovem a formação de VEGFa pró-angiogênico sob hipóxia. Esses dados sugerem que a remodelação dependente de ROS da arquitetura nuclear pode promover a produção de variantes de *splicing* que facilitam a adaptação à hipóxia (Taze et al. 2022).

As informações relativas aos estudos que avaliaram mecanismo de resistência ou adaptação associados a SRPKs estão descritas na tabela 9.

Tabela 9. Informações referentes aos artigos selecionados que abordam mecanismo de resistência ou adaptação.

N. do artigo	Tipo de SRPK	Gene / proteína	Resistência ou adaptação celular		Mecanismo
			Resistência / adaptação celular	Processo ou composto	
11	SRPK1	Proteína	Resistência	Apoptose	Rede SRPK-RBM4: atua na modulação da sensibilidade apoptótica das células mamárias cancerígenas.
28	SRPK1	Proteína	Adaptação	Hipóxia	↓ oxigênio: SRPK1 nuclear translocado para o citoplasma. Formação de VEGFa pró-angiogênico.
29	SRPK1	Proteína	Resistência	Cisplatina	Resistência à Cisplatina: ↓ na expressão de Tip60 e acetilação de SRPK1. Acetilação de SRPK1: pode afetar a eficácia da Cisplatina (por modificação do <i>splicing</i> de alguns reguladores-chave da apoptose em células de câncer de mama). ↓ da acetilação de SRPK1 pode conferir quimiorresistência. Equilíbrio entre a expressão de SRPK1 e a fosforilação de SRSF: crítico para impulsionar a produção de variantes de <i>splicing</i> pró-sobrevivência e para conferir resistência à Cisplatina. ↓ da acetilação de SRPK1 mediada por Tip60: pode levar a eventos de <i>splicing</i> alternativo antiapoptóticos e prever um resultado ruim após o tratamento com Cisplatina.
30	SRPK1	Proteína	Resistência	TAM	↑ de BQ323636.1 (BQ) é um dos mecanismos que conferem resistência a TAM. SRSF5 é essencial para a expressão de BQ. SRPK1 pode interagir com SRSF5 para fosforilá-lo.

3.4. DISCUSSÃO

Estima-se que 5 a 10 conduções de mutações sejam necessárias para o início do câncer (Hahn e Weinberg, 2002; Stratton et al., 2009). As células tumorais adquirem propriedades que incluem autossuficiência em sinais de crescimento,

insensibilidade a sinais de crescimento inibitórios, escape da apoptose, replicação ilimitada, angiogênese, invasão e migração (Dutertre et al., 2015).

SRPKs estão envolvidas na regulação do *splicing* de mRNAs e atuam na fosforilação de proteínas SR, o que já foi demonstrado como um pré-requisito para a montagem do spliceossomo e do *splicing* em geral (Giannakouros et al., 2011). A desregulação do *splicing* alternativo é um processo fundamental no câncer e fornece uma fonte potencialmente rica de novos alvos terapêuticos e biomarcadores para a progressão da doença (Urbanski et al., 2018).

A expressão elevada de SRPK1 é comumente encontrada em cânceres epiteliais humanos e frequentemente se correlaciona com o estágio avançado da doença e baixa sobrevida (Duggan et al., 2021). Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o mesmo ocorre em neoplasias mamárias, sendo constatada a superexpressão de SRPK1 (proteína da família das SRPKs mais estudada em neoplasias mamárias) em diversos tipos de câncer de mama como: câncer de mama triplo negativo, angiossarcoma mamário primário e secundário, carcinoma lobular invasivo, carcinoma ductal invasivo e câncer de mama basal em comparação a tecidos saudáveis, assim como em linhagens celulares de mama como BT-20, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7, BME-UV1, ZR-75-1, MDA-MB-435, BT-549, ZR-75-30 e HBL100. Em relação a SRPK3 também foi observada sua superexpressão no câncer de mama triplo negativo e na linhagem celular MCF-7.

Visto que dos 35 artigos analisados, apenas um explorou a expressão de SRPKs em tecidos mamários bovinos, evidencia-se uma lacuna na investigação da relação entre as proteínas SRPKs e as neoplasias mamárias em espécies não humanas.

Muitos estudos demonstraram que SRPK1 foi superexpresso no câncer triplo negativo e no câncer de mama basal. Também em pacientes com TNBC ou câncer de mama basal a expressão de SRPK1 se associou a um mau prognóstico e a menor sobrevida. Também, altos níveis de expressão de SRPK3 estavam relacionados a menor sobrevida global de pacientes com TNBC. Portanto, estabelecer terapias direcionadas para proteínas SRPK1 e SRPK3 representam boas opções para o tratamento de pacientes com TNBC.

O câncer de mama do subtipo basal, que é negativo para receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e apresenta baixa expressão de HER2, é caracterizado como o câncer de mama triplo negativo (TNBC). O TNBC é

responsável por aproximadamente 15% dos diagnósticos de câncer de mama e por aproximadamente 25% das mortes relacionadas a este tipo de neoplasia, devido a uma biologia mais agressiva e à falta de terapias direcionadas (Grigoriadis et al., 2012; Dey et al., 2013).

Watson et al. (2023) identificaram um subtipo molecular em tumores mamários espontâneos de cadelas denominado *canine basal-like mammary tumor* (cBLMT) que apresenta semelhanças moleculares e histológicas com o TNBC. Dessa forma, os cBLMTs podem atuar como um modelo animal espontâneo indispensável para o estudo do TNBC, suprimindo uma lacuna crítica na pesquisa do câncer de mama (Watson et al., 2020). A menor expectativa de vida dos cães, aliada à natureza agressiva da doença, possibilita que ensaios clínicos com novos agentes terapêuticos sejam concluídos de forma mais rápida e econômica em comparação com os estudos de fase I-IV realizados em humanos. A aplicação bem-sucedida do modelo translacional câncer de mama em cadelas na pesquisa oncológica pode ampliar o entendimento molecular sobre o câncer de mama e também ampliar as pesquisas pré-clínicas e, por fim, o tratamento de pacientes com câncer de mama, tanto caninos quanto humanos (Gray et al., 2020). Portanto, cadelas podem ser empregadas como modelo experimental para a avaliação de tratamentos direcionados a pacientes com TNBC, por meio da inibição das proteínas SRPKs.

A superexpressão de SRPK1 causa aumento da incidência de metástase, recorrência e morte por câncer. Ainda, esta proteína mostrou associação clínica significativa com a agressividade do tumor e níveis aumentados desta estão correlacionados com mau prognóstico em pacientes com câncer de mama. Além disso, os tumores primários de mama com níveis aumentados de SRPK1 mostraram preferência por direcionar-se para o pulmão e o cérebro. Ainda, o aumento da expressão de NEK2 e SRPK1 em pacientes com câncer de mama ER-positivo está relacionado a uma menor sobrevida livre de metástases de câncer. Assim, os resultados deste estudo demonstram que aumentos da expressão de SRPK1 estão associados a piores prognósticos em indivíduos com cancro mamário.

Estudos demonstraram também que uma pontuação de risco mais elevada indicou maior chance de mortalidade para pacientes com câncer de mama e que juntamente com o aumento desta pontuação o nível de expressão de SRPK1 foi regulado positivamente. Os genes SRPK3 e PUF60 também foram identificados

como relacionados ao risco prognóstico. Portanto, estes estudos corroboram a possibilidade de utilização de SRPKs como marcadores prognósticos.

As diferentes proteínas da família de SRPKs interagem com diversas vias, genes (miR-9) e proteínas (como RBM4, IGF-1, OGT, LIMK2, MAPK2, Tip60, SRSF5) atuando em processos como a expressão de fatores teciduais, alteração de eventos pró-apoptóticos, promoção de crescimento de células cancerígenas, metástases distais, sinalização de proliferação, sobrevivência e resistência neoplásica.

SRPK1 está envolvida no controle da rede de sinalização NF-kappa β (van Roosmalen et al., 2015). O impacto da resposta inflamatória no câncer pode variar conforme sua intensidade e natureza, podendo tanto exercer um efeito antitumoral quanto favorecer o crescimento, a invasão e a progressão do tumor. Sabe-se que NF-kappa β atua como um regulador central da resposta inflamatória (tanto na imunidade inata quanto adaptativa), estando deste modo relacionado ao surgimento e à progressão do câncer (Pires et al., 2018).

Ainda, van Roosmalen et al. (2015) encontraram uma correlação significativa entre SRPK1 e de Ki67. O Ki-67 é um antígeno nuclear humano intimamente ligado ao ciclo celular e à mitose, sendo que sua porcentagem indica a fração proliferativa de um tumor. Diversos estudos têm demonstrado seu valor como marcador prognóstico no câncer de mama. Na prática clínica, o Ki-67 é amplamente utilizado para orientar a escolha terapêutica e possui o potencial de avaliar a resposta ao tratamento em curso (Mannell, 2016).

Tecidos não proliferativos frequentemente obtêm ácidos graxos adequados da dieta; no entanto, células cancerosas frequentemente apresentam síntese aberrante de ácidos graxos de novo para fornecer substratos amplos para lipidações pós-traducionais, fosfolipídios e energia (Menendez e Lupu, 2007). Proteínas SRPK2 interagem com complexas redes de proteínas para a síntese de ácidos graxos “de novo” em células de câncer de mama.

Proteínas SRPK1 estão associadas a mecanismos de desenvolvimento de resistência à apoptose celular (através da via SRPK-RBM4), quimioterápicos (como Tamoxifeno e Cisplatina) e atuam na adaptação celular a hipóxia, apresentando comportamento pró-oncogênico.

Além disso, diversos agentes que interagem com proteínas SRPKs estão sendo estudados tanto para utilização como inibidores neoplásicos quanto para o

uso combinado com agentes quimioterápicos (agindo no combate a resistência aos mesmos). Assim, foi constatado que o plasma atmosférico frio pode atuar em células resistentes ao Tamoxifeno, restaurando a expressão de SRPK2 ao mesmo nível de expressão em células não resistentes. siRNA atua na regulação negativa de SRPK1 aumentando a proporção de células tumorais de mama em apoptose e sensibilizando à intervenção quimioterápica. Ainda, siRNA atuaram em SRPK3 causando inibição de crescimento. A utilização de um inibidor chamado SRPKIN-1 atuou na inibição de SRPK1 reduzindo a expressão de BQ (a superexpressão de BQ é um dos mecanismos que conferem resistência ao Tamoxifeno). Os compostos Letrozol e Nanopartículas de Prata promoveram alterações nos genes SRPK1. SRPK1 foi identificado como alvo da cinase BIS, que é um forte inibidor da família serina-treonina de proteínas cinases. O composto Cpd-1 apresentou atividade inibitória contra SRPK1 e SRPK2. A inibição de SRPK1 baseada em shRNA suprimiu a metástase para órgãos distantes, incluindo pulmão, fígado e baço e inibiu a reorganização da adesão focal. Ainda, estudos relataram a especificidade das diferentes proteínas que compõem a família SRPKs demonstrando que alguns compostos ou proteínas interagem apenas com tipos específicos de SRPKs.

Tendo demonstrado que a superexpressão das SPRKs nos diversos tipos de câncer de mama está diretamente relacionada a mal prognóstico e a diminuição de sobrevida, as estratégias de inibição das SPRKs aqui relatadas podem ser utilizadas como alvo terapêutico. Espera-se que nos próximos anos as terapias gênicas e moleculares possam ser aplicadas em estudos clínicos, aprimorando a terapêutica do cancro mamário.

3.5. CONCLUSÃO

Os estudos sobre SRPKs relacionados as mamas saudáveis e/ou neoplásicas abordaram: a interação destas com outras proteínas, genes e vias demonstrando que estas estão envolvidas em redes complexas e participam de processos celulares pró-oncogênicos; a expressão de SRPKs, demonstrando que sua superexpressão ocorre em neoplásias mamárias, se associando principalmente ao TNBC; a inibição destas proteínas, demonstrando que seu bloqueio pode combater a resistência a quimioterápicos, favorecer a apoptose e reduzir a taxa de metástases; relataram sobre prognóstico envolvendo estas proteínas, demonstrando

que sua expressão está associada a pior prognóstico; demonstraram a correlação de SRPKs com desenvolvimento de resistência e adaptação a hipóxia celular.

Estes dados reforçam a importância do desenvolvimento de compostos para suprimir o *splicing* alternativo aberrante impulsionado por SRPKs em neoplasias mamárias e, demonstram, ser necessário estabelecer uma compreensão mais profunda dos fatores que influenciam a expressão de SRPKs nestes tecidos, além disso apresenta perspectivas de utilização destas proteínas como marcadores neoplásicos e alvos para o desenvolvimento de novas moléculas anti-neoplásicas.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nas informações apresentadas ao longo deste trabalho, destacam-se as similaridades clínicas e moleculares entre os tumores mamários caninos e o câncer de mama humano, bem como a importância do uso de cães como modelo experimental para estudar o câncer de mama de ocorrência natural em humanos.

Considerando: (i) a importância das proteínas SRPKs nas neoplasias mamárias, já estudadas em humanos; (ii) a necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas, principalmente voltadas para o câncer de mama triplo negativo; (iii) visto que é fundamental realizar estudos pré-clínicos em modelos animais antes de avançar para ensaios clínicos em humanos; sugere-se que futuras pesquisas explorem a presença e o papel destas proteínas em tecidos mamários caninos, possibilitando o uso de cadelas como modelo experimental para avaliar clinicamente compostos que inibem SRPKs, com vistas ao desenvolvimento de terapias para o tratamento do câncer de mama em mulheres.

5. REFERÊNCIAS

ABDELMEGEED, S.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). **Oncology Letters**. 2018.

ARAKI, S.; DAIRIKI, R.; NAKAYAMA, Y.; MURAI, A.; MIYASHITA, R.; IWATANI, M.; NOMURA, T.; NAKANISHI, O. Inhibitors of CLK protein kinases suppress cell growth and induce apoptosis by modulating pre-mRNA splicing. **PLoS One** 10:e0116929, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116929>

BILLER, B.; BERG, J.; GARRETT, L.; RUSLANDER, D.; WEARING, R.; ABBOTT, B.; PATEL, M.; SMITH, D.; BRYAN, C. AAHA oncology guidelines for dogs and cats. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** 2016, 52, 181–204.

BUSCH, A.; HERTEL, KJ. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v.3, n.1, pp. 1-12, 2012. PMID: 21898828; PMCID: PMC3235224. DOI: 10.1002/wrna.100.

CARELS, N.; TILLI, T.; TUSZYNSKI, J. A. A computational strategy to select optimized protein targets for drug development toward the control of cancer diseases. **PLoS one**, v. 10, n. 1, p. e0115054, 2015.

CASSALI, G. D.; JARK, P.C.; GAMBA, C.; DAMASCENO, K. A.; LIMA, A. E.; NARDI, A. B. de; FERREIRA, E.; HORTA, R. S.; FIRMO, B. R.; SUEIRO, F. A. R.; RODRIGUES, L. C. S.; NAKAGAKI, K. Y. R. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. **Braz J Vet Pathol**, 2020, 13(3), 555 – 574 DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, J. M. C.; CAVALCANTI, M. F.; FONTENELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRIL, J. E.; FREHSE, M. S.; ALMEIDA, E. C.P.; CAMPOS, C. B. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Braz J Vet Pathol**. 2011;4:153-80.

CHENG, P.; WANG, Z.; HU, G.; HUANG, Q.; HAN, M.; HUANG, J. A prognostic 4-gene expression signature for patients with HER2-negative breast cancer receiving taxane and anthracycline-based chemotherapy. **Oncotarget**, 8(61), 103327, 2017.

CONCANNON P.; ALTSZULER N.; HAMPSHIRE J.; BUTLER W. R.; HANSEL W. Growth hormone, prolactin, and cortisol in dogs developing mammary nodules and an acromegaly-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate. **Endocrinology** 106:1173–1177, 1980.

DAVID, CHARLES J.; MANLEY, JAMES L. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. **Genes & development**, v. 24, n. 21, p. 2343-2364, 2010.

DEY, N., YOUNG, B., ABRAMOVITZ, M., BOUZYK, M., BARWICK, B., DE, P., LEYLAND-JONES, B. Differential activation of Wnt- β -catenin pathway in triple negative breast cancer increases MMP7 in a PTEN dependent manner. **PLoS One** 8 (10), 10, 2013.

DOLAI, S.; XU, Q.; LIU, F.; MOLLOY, M. P. Quantitative chemical proteomics in small-scale culture of phorbol ester stimulated basal breast cancer cells. **Proteomics**,11(13), 2683-2692, 2011.

DONG, X.; CHEN, R. Understanding aberrant RNA splicing to facilitate cancer diagnosis and therapy. **Oncogene**, v. 39, n. 11, pp. 2231-2242, 2020. PMID: 31819165. DOI: 10.1038/s41388-019-1138-2.

DU, J. X., ZHU, G.; CAI, J.; WANG, B.; LUO, Y.; CHEN, C.; CAI, C.; ZHANG, S.; ZHOU, J.; FAN, J.; ZHU, W.; DAY, Z. Splicing factors: Insights into their regulatory network in alternative splicing in cancer. **Cancer Lett**, v. 501, pp. 83-104, 2021. PMID: 33309781. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.11.043.

DUGGAN, W. P.; O'CONNELL, E.; PREHN, J. H.; BURKE, J. P. Serine-Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1): A systematic review of its multimodal role in oncogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 477(10), 2451-2467, 2022.

DUTERTRE, M.; VAGNER, S.; AUBOEUF, D. Alternative splicing and breast cancer. **RNA biology**, 7(4), 403-411, 2010.

ELLIS, I. O. Intraductal proliferative lesions of the breast: morphology, associated risk and molecular biology. **Modern pathology**, v. 23, p. S1-S7, 2010.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I.O.; Assessment of histological grade. ELSTON CW., ELLIS IO. (Ed.). **Systemic Pathology**. The breast. London: Churchill Livingstone, 1998, 365-384.

FERREIRA, E., GOBBI, H., SARAIVA, B. S., CASSALI, G. D. Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hyperplasia as a preneoplastic marker in dogs. **Veterinary pathology**, 49(2), 322-329, 2012.

FOSSUM, T. W. Cirurgia de pequenos animais. **Elsevier Brasil**. 4th ed., Vol. 1, 2014.

FOSTER, R. A. Sistema Reprodutor da Fêmea e Glândula Mamária. In: **Bases da patologia em veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 1088–1129.

GHERMAN, L. M.; CHIROI, P.; NUȚU, A.; BICA, C.; BERINDAN-NEAGOE, I. Profiling canine mammary tumors: A potential model for studying human breast cancer. **The Veterinary Journal**, 106055, 2023.

GIANNAKOUROS, T.; NIKOKAKI, E.; MYLONIS, I.; GEORGATSOU, E. Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. **The FEBS journal**, v.278, n.4, p. 570-586, 2011.

GRAY, M.; MEEHAN, J.; MARTÍNEZ-PÉREZ, C.; KAY, C.; TURNBULL, A. K.; MORRISON, L. R.; PANG, L. Y.; ARGYLE, D. Naturally-occurring canine mammary tumors as a translational model for human breast cancer. **Frontiers in oncology**, 10, 617, 2020.

GRIGORIADIS, A.; MACKAY, A.; NOEL, E.; WU, P.; NATRAJAN, R.; FRANKUM, J.; REIS-FILHO, J. S.; TUTT, A. Molecular characterisation of cell line models for triplenegative breast cancers. **BMC Genomics** 13, 619, 2012.

GRUEL, N.; LUCCHESI, C.; RAYNAL, V.; RODRIGUES, M. J.; PIERRON, G.; GOUDEFROYE, R.; COTTU, P.; REYAL, F.; SASTRE-GARAU, X.; FOURQUET, A.; DELATTRE, O.; VINCENT-SALOMON, A. Lobular invasive carcinoma of the breast

is a molecular entity distinct from luminal invasive ductal carcinoma. **Eur J Cancer**. 46:23992407, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.05.013>.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Rules for making human tumor cells. **N Engl J Med** 2002; 347:1593-603.

HAYES, G. M.; CARRIGAN, P. E.; MILLER, L. J. Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinoma. **Cancer research**, v. 67, n. 5, p. 2072-2080, 2007.

HERNANDO-AMADO, S.; COQUE, T. M.; BAQUERO, FERNANDO; Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1432-1442, 2019.

HIJAZI, M.; SMITH, R.; RAJEEVE, V.; BESSANT, C.; CUTILLAS, P. R. Reconstructing kinase network topologies from phosphoproteomics data reveals cancer-associated rewiring. **Nature Biotechnology**, 38(4), 493-502, 2020.

HÖRNFELDT, M.B., MORTENSEN, J.K. Surgical dose and the clinical outcome in the treatment of mammary gland tumours in female dogs: a literature review. **Acta Vet Scand** 65, 12. 2023. <https://doi.org/10.1186/s13028-023-00674-1>.

HUANG, J. Q.; HE-FENG, L.; ZHU, J.; SONG, J. W.; ZHANG, X. B.; GONG, P.; LIU, Q. Y.; ZHOU, C. H.; WANG, L.; GONG, L. Y.; SRPK1/AKT axis promotes oxaliplatin-induced anti-apoptosis via NF- κ B activation in colon cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2021.

HUANG, K.-L.; WU, Y.; PRIMEAU, T.; WANG, Y.-T.; GAO, Y.; MCMICHAEL, J.; SCOTT, A.; CAO, S.; WENDL, M.; JOHNSON, K.; RUGGLES, K.; HELD, J.; PAYNE, S. H.; DAVIES, S.; DAR, A.; KINSINGER, C. R.; MESRI, M.; RODRIGUEZ, H.; ELLIS, M. J.; TOWNSEND, R. R.; CHEN, F.; FENYÖ, D.; LI, S.; LIU, T.; CARR, S. A.; DING, L. Regulated Phosphosignaling Associated with Breast Cancer Subtypes and Druggability. **Mol. Cell. Proteom.** 2019, 18, mcp.RA118.001243.

Instituto Nacional de Câncer. Disponível em <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>>. Acesso em 08 de abril de 2023.

Instituto Nacional de Câncer. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/campanhas/outubro-rosa/2022/eu-cuido-da-minha-saude-todos-os-dias-e-voce>> . Acesso em 05 de abril de 2023.

ISHIKAWA T.; INOUE S.; KAKINUMA C.; KUWAYAMA C.; HAMADA Y.; SHIBUTANI Y. Growth-stimulating effect of dienogest, a synthetic steroid, on rodent, canine, and primate mammary glands. **Toxicology** 151:91–101, 2000.

KARAYANNOPOULOU M.; KALDRYMIDOU E.; CONSTANTINIDIS T. C.; DESSIRIS A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **J Comp Pathol** 133: 246-252, 2005.

KOCATÜRK, B.; VAN DEN BERG, Y. W.; TIEKEN, C.; MIEOG, J. S. D.; DE KRUIJF, E. M.; ENGELS, C. C.; VAN DER ENT, A. M.; KUPPEN, P. J.; VAN DE VELDE, C. J.; RUF, W.; REITSMA, P. H.; OSANTO, S.; LIEFERS, G.; BOGDANOV, V. Y.; VERSTEEG, H. H. Alternatively spliced tissue factor promotes breast cancer growth in a β 1 integrin-dependent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110(28), 11517-11522, 2013.

KOZLOWSKI, M.; GAJEWSKA, M.; MAJEWSKA, A.; JANK, M.; MOTYL, T. Differences in growth and transcriptomic profile of bovine mammary epithelial monolayer and three-dimensional cell cultures. **J Physiol Pharmacol**, 60(Suppl 1), 5-14, 2009.

KUMBHANI, T. R.; FEFAR, D. T.; TRANGADIA, B. J.; BHADANIYA, A. R.; KALARIA, V. A.; JAVIA, B. B. Cytological, Histopathological and Immunohistochemical study of canine mammary gland tumors. **Indian J. Vet. Pathol.**, 46(3): 224-229, 2022: DOI: 10.5958/0973-970X.2022.00037.2

KWON, J. Y.; MOSKWA, N.; KANG, W.; FAN, T. M.; LEE, C. Canine as a comparative and translational model for human mammary tumor. **Journal of Breast Cancer**, 26(1), 1, 2023.

LAVALLE, G.E.; DE CAMPOS, C.B.; BERTAGNOLLI, A.; CASSALI, G.D. CANINE MALIGNANT MAMMARY GLAND NEOPLASMS WITH ADVANCED CLINICAL STAGING TREATED WITH CARBOPLATIN AND CYCLOOXYGENASE INHIBITORS. **IN VIVO** 2012, 26, 375–379.

LEE, S.; LEE, H.; JEONG, D.; HAM, J.; PARK, S.; CHOI, E. H.; KIM, S. J. Cold atmospheric plasma restores tamoxifen sensitivity in resistant MCF-7 breast cancer cell. **Free Radical Biology and Medicine**, 110, 280-290, 2017.

LI, X.-H.; SONG, J.-W.; LIU, J.-L.; WU, S.; WANG, L.-S.; GONG, L.-Y.; LIN, X. Serine-arginine protein kinase 1 is associated with breast cancer progression and poor patient survival. **Medical Oncology**, v. 31, p. 1-9, 2014.

LIBERATI, A., ALTMAN, D. G., TETZLAFF, J., MULROW, C., GØTZSCHE, P. C., IOANNIDIS, J. P., CLARKE, M.; DEVEREAUX, P. J.; KLEIJNEN, J.; MOHER, D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. **Annals of internal medicine**, 151(4), W-65.

LIN, J. C., LIN, C. Y., TARN, W. Y., LI, F. Y. Elevated SRPK1 lessens apoptosis in breast cancer cells through RBM4-regulated splicing events. **Rna**, 20(10), 1621-1631, 2014.

LIN, J.-C., LIN, C.-Y., TARN, W.-Y., & LI, F.-Y Elevated SRPK1 lessens apoptosis in breast cancer cells through RBM4-regulated splicing events. **Rna**, v. 20, n. 10, p. 1621-1631, 2014.

MALVI, P.; JANOSTIAK, R.; CHAVA, S.; MANRAI, P.; YOON, E.; SINGH, K.; HARIGOPAL, M.; GUPTA, R.; WAJAPEYEE, N. LIMK2 promotes the metastatic

progression of triple-negative breast cancer by activating SRPK1. **Oncogenesis**. 9, 77, 2020.

MANNELL, A. The role of Ki-67 in breast cancer. **South African Journal of Surgery**, 54(2), 10-13, 2016.

MARINELLI, L.; GABAI, G.; WOLFSWINKEL, J.; MOL, J. A. MAMMARY STEROID METABOLIZING ENZYMES IN RELATION TO HYPERPLASIA AND TUMORIGENESIS IN THE DOG. **J STEROID BIOCHEM MOLEC BIOL** 92:167–173, 2004.

MCCLELLAN, B.; GRIES, P.; HARLOW, B.; TIZIANI, S.; JOLLY, C.; DEGRAFFENRIED, L. An IGF-1R-mTORC1-SRPK2 signaling Axis contributes to FASN regulation in breast cancer. **BMC cancer**, 22(1), 976, 2022.

MENENDEZ J. A.; LUPU R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. **Nat Rev Cancer**. 2007;7(10):763–77.

MILLER, W. R.; LARIONOV, A.; RENSHAW, L.; ANDERSON, T. J.; WHITE, S.; HAMPTON, G.; WALKER, J. R.; HO, S.; KRAUSE, A.; EVANS, D. B.; DIXON, J. M. Aromatase inhibitors—gene discovery. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 106(1-5), 130-142, 2007.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMEIN, E.; LIPSCOMB, T. P.; HISTOLOGICAL CLASSIFICATION OF MAMMARY TUMORS OF THE DOG AND THE CAT, 2ND SERIES, VOL VII, PP. 1–59. **AFIP**, WASHINGTON DC, 1999.

MOREIRA, G.A.; LIMA, G.D.A.; SIQUEIRA, R.P.; ANDRADE, V.A.; ADJANOHOON, A.L.M.; SANTOS, V.C.S.; BARBOSA, E.A.A.; LOTERIO, R.K.; PAIVA, J.C.; GONÇALVES, V.H.S.; VIOL, L.C.S.; SILVA, E.A.M.; JUNIOR, A.S.; ALMEIDA, M.R.; FIETTO, J.L.R.; NEVES, M.M.N.; FERREIRA, R.S.F.; TEIXEIRA, R.R.; BRESSAN, G.C. Antimetastatic effect of the pharmacological inhibition of serine/arginine-rich protein kinases (SRPK) in murine melanoma. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 356, p. 214-223, 2018.

MOUSER, P.; MILLER, M. A.; ANTUOFERMO, E.; BADVE, S. S.; MOHAMMED, S. I. PREVALENCE AND CLASSIFICATION OF SPONTANEOUS MAMMARY INTRAEPITHELIAL LESIONS IN DOGS WITHOUT CLINICAL MAMMARY DISEASE. **VET. PATHOL.** 2010, 47, 275–284.

NARDI, A. B. de; DALECK, C.R. Neoplasias Mamárias. In: **Oncologia em Cães e Gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2016, p. 499–516.

NOTAS, G.; KAMPA, M.; PELEKANOU, V.; TROULLINAKI, M.; JACQUOT, Y.; LECLERCQ, G.; CASTANAS, E. Whole transcriptome analysis of the ER α synthetic fragment P295-T311 (ER α 17p) identifies specific ER α -isoform (ER α , ER α 36)-dependent and independent actions in breast cancer cells. **Mol. Oncol.** 2013, 7, 595–610.

NUNES, F. C.; DAMASCENO, K. A.; DE CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. MIXED TUMORS OF THE CANINE MAMMARY GLANDS: EVALUATION OF PROGNOSTIC FACTORS, TREATMENT, AND OVERALL SURVIVAL. **VETERINARY AND ANIMAL SCIENCE**. 7, 100039, 2019.

OLTEAN, S.; BATES, D. O. Hallmarks of alternative splicing in cancer. **Oncogene**. v. 33, p. 5311-5318, 2014.

OLTEAN, S.; BATES, D.O. Hallmarks of alternative splicing in cancer. **Oncogene**, v. 33, n.46, pp. 5311-5318, 2014. PMID: 24336324. DOI: 10.1038/onc.2013.533.

OSTACOLO, C.; DI SARNO, V.; LAURO, G.; PEPE, G.; MUSELLA, S.; CIAGLIA, T.; VESTUTO, V.; AUTORE, G.; BIFULCO, G.; MARZOCCO, S.; CAMPIGLIA, P.; GOMEZ-MONTERREY, I. M.; BERTAMINO, A. Identification of an indol-based multi-target kinase inhibitor through phenotype screening and target fishing using inverse virtual screening approach. **European journal of medicinal chemistry**, 167, 61-75, 2019.

PAGE, D. L.; DUPONT, W. D. ANATOMIC MARKERS OF HUMAN PREMALIGNANCY AND RISK OF BREAST CANCER. **CANCER** 1990, 66:1326–1335.

PAIVA, S. I. S. EFEITO DO INIBIDOR DE Serine Arginine Protein kinases (SRPKs) SRPIN340 E DERIVADOS EM CÉLULAS MURINAS DE CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2022.

PAJARES, M. J.; EZPONDA, T.; CATENA, R.; CALVO, A.; PIO, R.; MONTUENGA, R. M. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. **Lancet Oncol**, v. 8, n.4, pp. 349-357, Apr. 2007. PMID: 17395108. DOI: 10.1016/S1470-2045(07)70104-3.

PANDIT, S.; ZHOU Y.; SHIUE, L.; COUTINHO-MANSFIELD, G.; LI, H.; QIU, J.; HUANG, J.; YEO, G. W.; ARES, M. JR.; FU, X. Genome-wide analysis reveals SR protein cooperation and competition in regulated splicing. **Mol Cell**, v. 20, n,2, pp. 223-235, Apr. 2013. PMID: 23562324; PMCID: PMC3640356. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.03.001.

PIRES, B. R.; SILVA, R. C.; FERREIRA, G. M.; ABDELHAY, E. NF-kappaB: two sides of the same coin. **Genes**, 9(1), 24, 2018.

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**, 25(3), 455-465, 2011.

SALAS, Y.; MÁRQUEZ, A.; DIAZ, D.; ROMERO, L. EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF MAMMARY TUMORS IN FEMALE DOGS DIAGNOSED DURING THE PERIOD 2002–2012: A GROWING ANIMAL HEALTH PROBLEM. **PLOS ONE** 2015, 10, E0127381.

SELCUKLU, S. D.; DONOGHUE, M. T.; REHMET, K.; DE SOUZA GOMES, M.; FORT, A.; KOVVURU, P.; MUNIYAPPA, M. K.; KERIN, M. J.; ENRIGHT, A. J.; SPILLANE, C. MICRORNA-9 INHIBITION OF CELL PROLIFERATION AND IDENTIFICATION OF NOVEL MIR-9 TARGETS BY TRANSCRIPTOME PROFILING IN BREAST CANCER CELLS. **J. BIOL. CHEM.** 287, 29516–29528, 2012.

SHEPARD, P. J. E HERTEL, K. J. The SR protein Family. **Genome Biology.** v. 10, n. 242, p. 1-9, 2009.

SHINDEN, Y.; HIRASHIMA, T.; NOHATA, N.; TODA, H.; OKADA, R.; ASAI, S.; TANAKA, T.; HOZAKA, Y.; OHTSUKA, T.; KIJIMA, Y.; SEKI, N. Molecular pathogenesis of breast cancer: Impact of miR-99a-5p and miR-99a-3p regulation on oncogenic genes. **J. Hum. Genet.** 66, 519–534, 2021.

SIQUEIRA, R. P. SERINE/ARGININE PROTEIN KINASE (SRPK) INHIBITION AS A POTENTIAL THERAPEUTIC STRATEGY AGAINST LEUKEMIA CELLS. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2018.

SLEECKX, N.; DE ROOSTER, H.; KROEZE, E.V.; VAN GINNEKEN, C.; VAN BRANTEGEM, L. CANINE MAMMARY TUMOURS, AN OVERVIEW. **REPROD. DOMEST. ANIM.** 2011, 46, 1112–1131.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; ZAPPULLI, V. TUMORS OF THE MAMMARY GLAND. IN WITHROW AND MACEWEN'S SMALL ANIMAL CLINICAL ONCOLOGY, 6TH ED.; **W.B. SAUNDERS: BIRMINGHAM**, AL, USA, 2019; PP. 604–625.

STOLETOV, K.; WILLETTS, L.; PAPROSKI, R.J.; BOND, D.J.; RAHA, S.; JOVEL, J.; ADAM, B.; ROBERTSON, A.E.; WONG, F.; WOOLNER, E.; SOSNOWSKI, D. L.; BISMAR, T. A.; WONG, G. K.; ZIJLSTRA, A.; LEWIS, J. D. Quantitative in vivo whole genome motility screen reveals novel therapeutic targets to block cancer metastasis. **Nat. Commun.** 9, 2343, 2018.

STRATMANN, N.; FAILING, K.; RICHTER, A.; WEHREND, A. MAMMARY TUMOR RECURRENCE IN BITCHES AFTER REGIONAL MASTECTOMY. **VET. SURG.** 2008, 37, 82–86.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J. Futreal PA. The cancer genome. **Nature** 2009; 458:1-7.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JERNAL, A.; BRAY, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 71, n.3, pp. 209- 249, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

SZWAJDA, A.; GAUTAM, P.; KARHINEN, L.; JHA, S.K.; SAARELA, J.; SHAKYAWAR, S.; TURUNEN, L.; YADAV, B.; TANG, J.; WENNERBERG, K.; AITTOKALLIO, T. Systematic Mapping of Kinase Addiction Combinations in Breast Cancer Cells by Integrating Drug Sensitivity and Selectivity Profiles. **Chem. Biol.** 2015, 22, 1144–1155.

TAN, W.; JIANG, P.; ZHANG, W.; HU, Z.; LIN, S.; CHEN, L.; LI, Y.; PENG, C.; LI, Z.; SUN, A.; CHEN, Y.; ZHU, W.; XUE, Y.; YAO, Y.; LI, X.; SONG, Q.; HE, F.; QIN, W.; PEI, H. Posttranscriptional regulation of de novo lipogenesis by glucose-induced O-GlcNAcylation. **Mol. Cell.** 81, 1890–1904.e7, 2021.

TAZE, C.; DRAKOULI, S.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; SIMOS, G.; GEORGATSOU, E.; MYLONIS, I. Short-term hypoxia triggers ROS and SAFB mediated nuclear matrix and mRNA splicing remodeling. **Redox Biology**, 58, 102545, 2022.

TODA, H.; SEKI, N.; KUROZUMI, S.; SHINDEN, Y.; YAMADA, Y.; NOHATA, N.; MORIYA, S.; IDICHI, T.; MAEMURA, K.; FUJII, T.; HORIGUCHI, J.; KIJIMA, Y.; NATSUGOE, S. RNA-sequence-based microRNA expression signature in breast cancer: Tumor-suppressive miR-101-5p regulates molecular pathogenesis. **Mol. Oncol.** 2020, 14, 426–446.

TSOI, H.; FUNG, N. N.; MAN, E. P. S.; LEUNG, M. H.; YOU, C. P.; CHAN, W. L. SRSF5 regulates the expression of BQ323636.1 to modulate tamoxifen resistance in ER-positive breast cancer. **Cancers (Basel)**, 15, 2271, 2023.

TWYFFELS, L.; GUEYDAN, C.; KRUYSS, V. Shuttling SR proteins: more than splicing factors. **FEBS J**, v. 278, n. 18, pp. 3264-3255, 2011. PMID: 21794093. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08274.x.

URBANSKI, L. M.; LECLAIR, N.; ANCZUKÓW, O. Alternative-splicing defects in cancer: splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, 2018, 9(4), e1476.

VALE, J. A. Efeito da inibição de *Serine-Arginine Protein Kinases* (SRPKs) em modelo de melanoma murinho subcutâneo. **Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa**, Minas Gerais. 2017.

van ROOSMALEN, W.; LE DEVEDEC, S. E.; GOLANI, O.; SMID, M.; PULYAKHINA, I.; TIMMERMANS, A.M.; LOOK, M.P.; ZI, D.; PONT, C.; DE GRAAUW, M. M.; NAFFAR-ABU-AMARA, S.; KIRSANOVA, C.; RUSTICI, G.; 'T HOEN, P.A.C.; MARTENS, J.W.M.; FOEKENS, J.A.; GEIGER, B.; VAN DE WATER, B. Tumor cell migration screen identifies SRPK1 as breast cancer metastasis determinant. **J Clin Invest** 125,1648–1664, 2015.

VAZQUEZ, E.; LIPOVKA, Y.; CERVANTES-ARIAS, A.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; HABY, M.M.; QUEIROGA, F.L.; VELAZQUEZ, C. Canine Mammary Cancer: State of the Art and Future Perspectives. **Animals** 2023, 13, 3147. <https://doi.org/10.3390/ani13193147>.

VERONESI, M. C.; BATTOCCHIO, M.; RIZZIC, S. G. Relationship between dysplastic and neoplastic mammary lesions and pseudopregnancy in the bitch. **Vet Res Commun** 27(Suppl 1):245–247, 2003.

WANG, C.; ZHOU, Z.; SUBHRAMANYAM, C. S.; CAO, Q.; HENG, Z. S. L.; LIU, W.; FU, X.; HU, Q. SRPK1 acetylation modulates alternative splicing to regulate cisplatin

resistance in breast cancer cells. **Commun Biol**, v.3, n. 268, May. 2020. DOI: 10.1038/s42003-020-0983-4.

WANG, L.; WROBEL, J. A.; XIE, L.; LI, D.; ZURLO, G.; SHEN, H.; YANG, P.; WANG, Z.; PENG, Y.; GUNAWARDENA, H. P.; ZHANG, Q.; CHEN, X. Novel RNA-affinity proteogenomics dissects tumor heterogeneity for revealing personalized markers in precision prognosis of cancer. **Cell Chem. Biol.** 2018, 25, 619–633.

WATSON, J.; WANG, T.; HO, K. L.; FENG, Y.; MAHAWAN, T.; DOBBIN, K. K.; ZHAO, S. Human basal-like breast cancer is represented by one of the two mammary tumor subtypes in dogs. **Breast Cancer Research**, 25(1), 114, 2023.

WEI, Y.; YANG, X.; GAO, L.; XU, Y.; YI, C. Differences in potential key genes and pathways between primary and radiation-associated angiosarcoma of the breast. **Translational Oncology**, 19, 101385, 2022.

WILLIS S.; DE, P.; DEY, N.; LONG, B.; YOUNG, B.; SPARANO, J. A.; WANG, V.; DAVIDSON, N. E.; LEYLAND-JONES, B.R. Enriched transcription factor signatures in triple negative breast cancer indicates possible targeted therapies with existing drugs. **Meta Gene**. 4:129–41, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2015.04.002>.

WILSON, T. M. Lesões não neoplásicas da glândula mamária de cadelas e sua relação com neoplasias adjacentes. **Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia**, Minas Gerais. 2017.

WU, S.; WANG, J.; ZHU, X.; CHYR, J.; ZHOU, X.; WU, X.; HUANG, L. The functional impact of alternative splicing on the survival prognosis of triple-negative breast cancer. **Frontiers in Genetics**, 11, 604262, 2021.

YEYEDU, S. T.; MARTIN, M. E.; REAVES, D. K.; ENDERS, J. R.; COSTANTINI, L. M.; FLEMING, J. M. Experimental data demonstrating the effects of silver nanoparticles on basement membrane gene and protein expression in cultured colon, mammary and bronchial epithelia. **Data in brief**, 26, 104464, 2019.

ZHANG, H.; HAN, B.; HAN, X.; ZHU, Y.; LIU, H.; WANG, Z.; CUI, Y.; TIAN, R.; GAO, Z.; TIAN, R.; REN, S.; ZUO, X.; TIAN, J.; ZHANG, F.; NIU, R. Comprehensive analysis of splicing factor and alternative splicing event to construct subtype-specific prognosis-predicting models for breast cancer. **Frontiers in Genetics**, 12, 736423, 2021. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.736423>

ZHAO, X.; LI, J., LIU, Z.; Powers, S. Combinatorial CRISPR/Cas9 screening reveals epistatic networks of interacting tumor suppressor genes and therapeutic targets in human breast cancer. **Cancer Research**, 81(24), 6090-6105, 2021.

ZHU, D.; XU, S.; DEYANAT-YAZDI, G.; PENG, S.X.; BARNES, L.A.; NARLA, R.K.; TRAN, T.; MIKOLON, D.; NING, Y.; SHI, T.; JIANG, N.; RAYMON, H. K.; RIGGS, J. R.; BOYLAN, J. F. Synthetic Lethal Strategy Identifies a Potent and Selective TTK and CLK1/2 Inhibitor for Treatment of Triple-Negative Breast Cancer with a Compromised G1-S Checkpoint. **Mol. Cancer Ther.** 2018, 17, 1727–1738.

APÊNDICE A. Informações gerais dos artigos selecionados na revisão sistemática.

Número atribuído ao artigo*	Título	Autores	Ano	Revista	Local de estudo
1	A computational strategy to select optimized protein targets for drug development toward the control of cancer diseases	Carels, N. et al.	2015	PLoS ONE	EUA
2	Alternatively spliced tissue factor promotes breast cancer growth in a β 1 integrin-dependent manner	Kocatürka, K. et al.	2013	PNAS	EUA
3	An IGF-1R-mTORC1-SRPK2 signaling Axis contributes to FASN regulation in breast cancer.	McClellan, B. et al.	2022	BMC Cancer	EUA
4	A prognostic 4-gene expression signature for patients with HER2- negative breast cancer receiving taxane and anthracycline-based chemotherapy	Cheng, P. et al.	2017	Oncotarget	China
5	Aromatase inhibitors—Gene discovery	Miller, W. R. et al.	2007	Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology	EUA
6	Cold atmospheric plasma restores tamoxifen sensitivity in resistant MCF-7 breast cancer cell	Seungyeon, L. et al.	2017	Free Radical Biology and Medicine	Coreia
7	Combinatorial CRISPR/Cas9 Screening Reveals Epistatic Networks of Interacting Tumor Suppressor Genes and Therapeutic Targets in Human Breast Cancer	Zhao, X. et al.	2021	American Association for Cancer Research	EUA
8	Comprehensive Analysis of Splicing Factor and Alternative Splicing Event to Construct Subtype-Specific Prognosis-Predicting Models for Breast Cancer	Zhang, H. et al.	2021	Frontiers in Genetics	EUA

9	Differences in growth and transcriptomic profile of bovine mammary epithelial monolayer and three-dimensional cell cultures	Kozłowski, M. et al.	2009	JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY	Polónia
10	Differences in potential key genes and pathways between primary and radiation-associated angiosarcoma of the breast	Wei, Y. et al.	2022	Translational Oncology	China
11	Elevated SRPK1 lessens apoptosis in breast cancer cells through RBM4-regulated splicing events	Lin, J. et al.	2014	Cold Spring Harbor Laboratory Press for the RNA Society	China
12	Enriched transcription factor signatures in triple negative breast cancer indicates possible targeted therapies with existing drugs	Willis, S. et al.	2015	Meta Gene	EUA
13	Experimental data demonstrating the effects of silver nanoparticles on basement membrane gene and protein expression in cultured colon, mammary and bronchial epithelia	Yeyeodu, S. T. et al.	2019	Data in brief	EUA
14	Inhibitors of CLK protein kinases suppress cell growth and induce apoptosis by modulating pre-mRNA splicing	Araki, S. et al.	2015	PLoS ONE	EUA
15	LIMK2 promotes the metastatic progression of triple-negative breast cancer by activating SRPK1.	Malvi, P. et al.	2020	Oncogenesis	EUA
16	Lobular invasive carcinoma of the breast is a molecular entity distinct from luminal invasive ductal carcinoma	Gruel, N. et al.	2010	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER	França
17	MicroRNA-9 inhibition of cell proliferation and identification of novel miR-9 targets by transcriptome profiling in breast cancer cells	Selcuklu, S. D. et al.	2012	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY	Irlanda

18	Molecular pathogenesis of breast cancer: impact of miR-99a-5p and miR-99a-3p regulation on oncogenic genes.	Shinden, Y. et al.	2020	Journal of Human Genetics	Japão
19	Novel RNA-Affinity Proteogenomics Dissects Tumor Heterogeneity for Revealing Personalized Markers in Precision Prognosis of Cancer	Wang, L. et al.	2018	Cell Chemical Biology	EUA / China
20	Posttranscriptional regulation of de novo lipogenesis by glucose-induced O-GlcNAcylation	Tan, W. et al.	2021	Molecular Cell	EUA / China
21	Quantitative chemical proteomics in small-scale culture of phorbol ester stimulated basal breast cancer cells	Dolai, S. et al.	2011	Proteomics	Austrália
22	Quantitative in vivo whole genome motility screen reveals novel therapeutic targets to block cancer metastasis	Stoletov, K. et al.	2018	NATURE COMMUNICATIONS	Canadá
23	Reconstructing kinase network topologies from phosphoproteomics data reveals cancer-associated rewiring	Hijazi, M. et al.	2020	Nature Biotechnology	Inglaterra
24	Regulated Phosphosignaling Associated with Breast Cancer Subtypes and Druggability	Huang, K. et al.	2019	The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.	EUA
25	RNA-sequence-based microRNA expression signature in breast cancer: tumor-suppressive miR-101-5p regulates molecular pathogenesis	Toda, H. et al.	2020	FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd	Japão
26	Serine-arginine protein kinase 1 is associated with breast cancer progression and poor patient survival	Li, X. et al.	2014	Medicine Oncology	China

27	Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas	Hayes, G. M. et al.	2007	American Association for Cancer Research	EUA
28	Short-term hypoxia triggers ROS and SAFB mediated nuclear matrix and mRNA splicing remodeling	Taze, C. et al.	2022	Redox Biology	Grécia
29	SRPK1 acetylation modulates alternative splicing to regulate cisplatin resistance in breast cancer cells	Wang, C. et al.	2020	COMMUNICATIONS BIOLOGY	Singapura
30	SRSF5 Regulates the Expression of BQ323636.1 to Modulate Tamoxifen Resistance in ER-Positive Breast Cancer	Tsoi, H. et al.	2023	Cancers	Suíça
31	Synthetic lethal strategy identifies a potent and selective TTK and CLK1/2 inhibitor for treatment of triple-negative breast cancer with a compromised G1-S checkpoint	Zhu, D. et al.	2018	Molecular Cancer Therapeutics Online	EUA
32	Systematic Mapping of Kinase Addiction Combinations in Breast Cancer Cells by Integrating Drug Sensitivity and Selectivity Profiles	Szwajda, A. et al.	2015	Chemistry & Biology	Finlândia
33	The Functional Impact of Alternative Splicing on the Survival Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer	Wu, S. et al.	2021	Frontiers in Genetics	China/EUA
34	Tumor cell migration screen identifies SRPK1 as breast cancer metastasis determinant	van Roosmalen, W. et al.	2015	The Journal of Clinical Investigation	Noruega/Israel

35	Whole transcriptome analysis of the ER α synthetic fragment P295-T311 (ER α 17p) identifies specific ER α -isoform (ER α , ER α 36)-dependent and -independent actions in breast cancer cells	Notas, G. et al.	2013	Molecular Oncology	Grécia/ França
----	--	------------------	------	--------------------	-------------------

* Número atribuído por ordem alfabética dos títulos dos artigos.