

ANDREIA CORRÊA DE ARAUJO

***SPLICING* ALTERNATIVO NA NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA: REVISÃO
SISTEMÁTICA**

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: Fabrício Luciani Valente
Gustavo Costa Bressan

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

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

T

A663s
2021 Araujo, Andreia Corrêa de, 1980-
Splicing alternativo na neoplasia mamaria canina : revisão
sistemática / Andreia Corrêa de Araujo. – Viçosa, MG, 2021.
49 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Emily Correna Carlo dos Reis.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 41-49.

1. Cães - Doenças. 2. Mamas - Câncer. 3. Processamento Alternativo. 4. Isoformas de Proteínas. 5. Modelos animais em pesquisa. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.7089699449

ANDREIA CORRÊA DE ARAUJO

**SPLICING ALTERNATIVO NA NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA: REVISÃO
SISTEMÁTICA**

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: 25 de fevereiro de 2021.

Assentimento:



Andreia Corrêa de Araujo
Autora



Emily Correna Carlo Reis
Orientadora

*Ao meu pai, meu maior amigo e incentivador.
De quem não passo um dia sem sentir saudades.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por escolher a dedo as pessoas que entraram no meu caminho e por me permitir aprender com cada uma delas.

À Nossa Senhora por me ouvir nos momentos mais difíceis e por nunca me faltar quando mais precisei.

Ao meu amor, Rafa, por ser aquela pessoa que jamais me deixou na mão ou deixou de me apoiar. Porque quando eu decidi deixar pra trás toda a minha vida profissional e virar nossa vida de cabeça pra baixo ele me escolheu e o que era melhor para nós dois juntos. Te amo demais!

À minha irmã pelo apoio, carinho e orações.

À minha mãe maravilhosa por me permitir ter a chance de cuidar dela e, por isso, me tornar uma pessoa melhor. 2020 foi um ano inesquecível em muitos aspectos, mas cuidar de você foi sem dúvida o maior desafio da minha vida.

À querida Emily por me ensinar a todo momento, a ser mais paciente, mais atenta, mais resiliente, mais responsável, mais dedicada. Você é um exemplo e uma inspiração.

Ao Fabrício pelo carinho e apoio em tudo o que precisei.

Ao professor Gustavo Bressan por todo ensinamento transmitido e por me apresentar uma parte da oncologia tão desafiadora e interessante.

À professora Anésia e suas orientadas, Mariá, Amanda, Patrícia e Franciele, pelo acolhimento, ajuda e aprendizado.

Aos meus amados pacientes por serem o meu combustível, por cada desafio enfrentado, por cada lágrima de tristeza e sorriso de alívio que compartilhei com seus tutores em 16 anos de medicina veterinária. O bem estar de vocês é o grande motivo de tudo isso.

À queridíssima Rosi por ser tão fantástica, competente, amável e preocupada com todos os pós graduandos.

Ao Polar, Petit, Branca e Gian, meus amores de quatro patas, com vocês a vida se torna mais leve.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFV pela oportunidade de realização do mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

*“Onde há amor pela medicina, há amor pela
humanidade.”*

(Hipócrates)

RESUMO

ARAUJO, Andreia Corrêa de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2021. ***Splicing* alternativo na neoplasia mamária canina: revisão sistemática.** Orientadora: Emily Correna Carlo Reis. Coorientadores: Fabrício Luciani Valente e Gustavo Costa Bressan.

As neoplasias mamárias representam um grande desafio tanto para a medicina humana quanto veterinária. O tumor desenvolvido em cadelas compartilha várias características com o das mulheres como comportamento biológico, acometimento em pacientes imunocompetentes e influência hormonal. *Splicing* alternativo é parte integrante da maquinaria da expressão gênica é acionado mais ou menos de acordo com o momento e a necessidade da célula. No ambiente tumoral predomina a transcrição de isoformas produtos de *splicing* alternativo no sentido do seu desenvolvimento, manipulando vias de proliferação, invasão e sobrevivência. Variantes de transcritos que sofrem *splicing* alternativo detectados em neoplasia mamária em mulheres apresentam níveis de expressão e função diferentes quando comparados ao tecido saudável, demonstrando relevância do processo na tumorigênese. Com o objetivo de analisar a importância do *splicing* alternativo em tumor mamário canino, foi elaborada essa revisão sistemática. A compreensão da manipulação do *splicing* alternativo no processo neoplásico canino pode viabilizar pesquisas na área de terapêutica e servir como base para a oncologia humana. Foram analisados artigos das bases PubMed, Scopus, Web of Science e Science Direct utilizando os seguintes termos chaves: canine OR dog, AND tumor OR cancer, AND expression, AND *splicing*, AND mammary. Foram selecionados treze artigos e avaliada a expressão de dezenove transcritos, desses, cinco não apresentaram variantes além da forma clássica. Entre os quatorze restantes, apenas um não demonstrou diferença entre a expressão em tecido saudável e o neoplásico e dois transcritos foram avaliados além da expressão, tendo sido também pesquisada uma função específica relacionada à isoforma, como a causa da baixa expressão de BRCA2 em tecido mamário neoplásico e o pior prognóstico relacionado à isoforma de CD44, concluindo-se que existe a relação e a relevância do *splicing* alternativo nos processos analisados. Os demais artigos detectaram expressão divergente entre amostras mamárias caninas saudáveis e tumorais, demonstrando que o *splicing*

alternativo é um processo celular relevante para o andamento de eventos de proliferação, invasão e sobrevivência na tumorigênese mamária canina.

Palavras-chave: *Splicing* alternativo. Cão. Tumor mamário. Modelo. Isoformas.

ABSTRACT

ARAUJO, Andreia Corrêa de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. **Alternative splicing in canine mammary tumor: sistematic review.** Adviser: Emily Correna Carlo Reis. Co-Advisers: Fabrício Luciani Valente and Gustavo Costa Bressan.

Breast neoplasms represent a great challenge for both human and veterinary medicine. The tumor development in female dogs shares several characteristics with that of women, such as biological behavior, immunocompetent patients' affection and hormonal influence. Alternative splicing is an integral part of the gene expression machinery and it is triggered according to the moment and need of the cell. In the tumor environment, the transcription of isoforms products of alternative splicing predominates in the direction of their development, manipulating proliferation, invasion and survival pathways. Variants of transcripts that suffer alternative splicing detected in breast cancer in women have different levels of expression and function when compared to healthy tissue, demonstrating the relevance of the process in tumorigenesis. In order to analyze the importance of alternative splicing in canine breast tumors, this systematic review was carried out. Understanding the manipulation of alternative splicing in the canine neoplastic process can enable research in the therapeutic area and serve as a basis for human oncology. Articles from PubMed, Scopus, Web of Science and Science Direct databases were analyzed using the following key terms: canine OR dog, AND tumor OR cancer, AND expression, AND splicing, AND mammary. Thirteen articles were selected and the expression of nineteen transcripts were evaluated, of which five did not present variants beyond the classic form. Among the remaining fourteen, only one showed no difference between expression in healthy and neoplastic tissue. Two transcripts were evaluated in addition to expression, and a specific isoform-related function was investigated as the cause of low BRCA2 expression in breast tissue and the worst prognosis related to the CD44 isoform, concluding that there is a relationship and relevance of alternative splicing in the analyzed process. The remaining articles detected divergent expression between healthy and tumorous canine mammary samples, demonstrating that alternative splicing is a relevant cellular process for the progress of proliferation, invasion and survival events in canine mammary tumorigenesis.

Keywords: Alternative splicing. Canine. Mammary tumor. Model. Isoforms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma demonstrando as fases de seleção dos artigos incluídos na revisão sistemática.....	22
Figura 2 – Tipos proteicos avaliados pelos estudos selecionados.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre os parâmetros utilizados na classificação fenotípica de neoplasias mamárias em mulheres e cadelas.....	16
Tabela 2 – Critérios de inclusão e exclusão.....	19
Tabela 3 – Artigos selecionados para análise.....	23
Tabela 4 – Moléculas alvo dos estudos selecionados e suas informações.....	26
Tabela 5 – Origem das amostras analisadas pelos estudos selecionados.....	28
Tabela 6 – Informações sobre as isoformas analisadas nos estudos selecionados..	30

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

BRCA	Gene supressor de tumor de mama.
c-kit	Gene que codifica a proteína quinase KIT.
CLKs	Quinase semelhante à CDK.
CSC	Célula tronco neoplásica.
ER	Receptor para estrógeno.
GH	Hormônio do crescimento.
ER	Receptor de estrógeno.
GHR	Receptor para hormônio do crescimento.
HER-2	Receptor para EGFR2 humano.
hnNRP	Ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares.
INCA	Instituto Nacional do Câncer.
KIT	Proteína tirosina quinase.
KLK	Peptidase relacionada à caliceína.
Mda-7	Gene associado à diferenciação do melanoma.
NMD	Sistema de decaimento de RNAm mediado por sequência sem sentido.
PCR	Reação em cadeia de polimerase.
PICO	População, intervenção, controle e resultado.
PR	Receptor para progesterona.
PRISMA	Principais itens para relatar na revisão sistemática e meta-análise.
PTC	Códon de terminação prematura.
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina.
qRT-PCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real.
RAGE	Receptor para produtos finais de glicação avançada.
RT-PCR	Transcrição reversa em reação de cadeia de polímerase.
SCF	Fator de célula tronco.
snRNPs	Pequenas rionucleoproteínas nucleares.
SR	Proteínas ricas em sítios RS.
SRPKs	Quinase que fosforilam proteínas SR.
START	Estado da arte para revisão sistemática.
TERT	Unidade catalítica da enzima telomerase.
TNM	Tumor, nodes, metastasis.
WHO	World Health Organization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. METODOLOGIA.....	19
2.1. Seleção.....	19
2.2. Fonte de dados, pesquisa e seleção dos estudos.....	19
2.3. Análise e extração de dados.....	21
3. RESULTADOS.....	21
3.1. Seleção.....	21
3.2. Informações referentes ao artigo e seus autores: título, autores, país e ano..	22
3.3. Informações referentes à molécula alvo: nome, tipo, localização celular e similaridade com a ortóloga humana.....	25
3.4. Origem e quantificação das amostras: linhagem celular e local biopsiado.....	27
3.5. Isoformas produto de <i>splicing</i> alternativo, respectivos métodos de análise, sua expressão em tecido mamário saudável e neoplásico e introdução de códon de terminação prematura.....	28
4. DISCUSSÃO.....	32
5. CONCLUSÃO.....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

No ano de 2021, o câncer de mama passou a ocupar o primeiro lugar das neoplasias mais diagnosticadas no mundo, passando a frente do câncer de pulmão, e a maior causa de morte por câncer entre as mulheres (WHO, 2021). No Brasil, ainda ocupa o segundo lugar entre os tumores mais prevalentes em mulheres. Segundo o INCA (2021), entre 2020-2022, esperam-se 66.280 novos casos de tumor de mama por ano no país; em 2018, esse número foi de 59.700. Por sua alta incidência e mortalidade associadas, percebe-se claramente a necessidade de pesquisas que envolvam o desenvolvimento e fisiopatologia da progressão das neoplasias mamárias além de novas modalidades terapêuticas, o que indispensavelmente envolve a utilização de modelos experimentais.

As linhagens celulares constituem um modelo muito utilizado em pesquisas oncológicas. Essa importância se deve ao seu papel primordial no avanço sobre o que se entende atualmente acerca dos mecanismos moleculares inerentes às células neoplásicas e por permitirem livre manipulação no que concerne às limitações éticas à pesquisa. Entretanto, apesar dos resultados proporcionados pela utilização dos cultivos celulares, o meio *in vitro* impõe algumas mudanças seletivas às células que, de certa forma, limitam a interpretação dos resultados que deixam de ser fidedignos à realidade fisiológica. Ademais as linhagens perdem o mais primordial dos fatores de desenvolvimento e proliferação neoplásica que é o microambiente tumoral e a relação com o sistema imune (Pinho et al., 2012).

Por décadas, as pesquisas oncológicas utilizaram camundongos, principalmente mutantes e receptores de xenoinxertos neoplásicos, como principal modelo de estudo e compreensão do desenvolvimento, comportamento e tratamento de tumores. Esse modelo permitiu também análise da sobrevivência do tumor ao sistema imune e envolvimento da resposta inflamatória na tumorigênese. Entretanto, a utilização desses modelos apresenta limitações importantes que impedem o progresso dos resultados, entre elas aponta-se: sua maior susceptibilidade à carcinogênese por disporem de baixo controle de reparo ao DNA e alta instabilidade genética, menor dependência hormonal e baixos níveis de receptores de estrogênio e progesterona, alta atividade de telomerase e, conseqüentemente, telômeros mais longos, e também, seus tumores possuem diferentes caracterizações histológicas e comportamento metastático (Abdelmegeed e Sulma, 2018).

Em contrapartida, a neoplasia mamária em cães apresenta diversas similaridades biológicas, moleculares e comportamentais com a humana, fazendo a espécie despontar como modelo a ser considerado no estudo da doença em humanos. Dentre elas, pode-se relatar a influência hormonal. Desde 1969, quando foi demonstrado que a castração de cadelas antes do primeiro cio diminui as chances de desenvolver neoplasia para 0,5%, quando comparada com 8% a 26% quando castradas entre o primeiro e o segundo (SCHNEIDER et al., 1969), pesquisas vêm sendo conduzidas com o objetivo de aprofundar a relação entre a exposição hormonal endógena e o desenvolvimento neoplásico. Em estudo posterior foi demonstrado relevante fator protetivo contra tumorigênese em animais castrados até o quarto cio (SONNENSCHNEIN et al., 1991) e, mais recentemente, tem-se discutido a avaliação individualizada para determinar a castração precoce devido a predisposição a distúrbios articulares, incontinência urinária e a desenvolvimento de outras neoplasias (HART et al., 2016 e 2020). Em mulheres, não parece haver uma relação direta entre os hormônios sexuais e o maior risco em se desenvolver tumor mamário, mas sim uma rede de fatores envolvendo a influência hormonal, idade, hábitos de vida e fatores genéticos (KELSEY et al., 1993; FUHRMAN et al., 2011, NIEHOFF et al., 2017).

A utilização de progestágenos exógenos também está altamente relacionada ao risco de desenvolvimento neoplásico em cadelas, os anticoncepcionais induzem a produção local de hormônio do crescimento (GH), induzindo a proliferação do epitélio glandular (MOL et al., 1996; GARDEREN et al., 1997). Os contraceptivos orais utilizados por mulheres apresentam o mesmo efeito tumorigênico em mama, sendo considerado pela Organização Mundial da Saúde como um carcinógeno grau 1 (COGLIANO et al., 2005; WILLIAMS et al., 2018).

Outro fator de risco relevante na tumorigênese mamária é o escore corporal. Tanto animais quanto humanos obesos possuem maior predisposição de desenvolver tumor de mama de comportamento mais agressivo numa forma dependente de leptina, um hormônio liberado pelos adipócitos para sinalização de saciedade e gasto energético. A leptina está envolvida na progressão tumoral desde a ativação de células tronco neoplásicas (CSC) até no desenvolvimento de metástases pela ativação de vias de proliferação, invasão e migração e ainda favorece eventos de angiogênese e inflamação no microambiente tumoral (MORRIS e RUI, 2009, PARK e SCHERER, 2011 e TESI, et al., 2020).

As neoplasias mamárias podem originar do seu compartimento epitelial, os carcinomas, da sua parcela mesenquimal, os sarcomas, ou acometer ambos os grupos celulares, os carcinossarcomas. Tanto no homem quanto no cão o principal tipo histológico de tumor a acometer as mamas é o carcinoma; nos humanos, os mais comuns são os carcinomas ductais ou lobulares (INCA, 2021), em cadelas, o mais prevalente é o carcinoma em tumor misto (CASSALI et al., 2017).

O estadiamento clínico da neoplasia mamária em ambas as espécies segue os critérios do sistema TNM, uma classificação que agrupa as características relacionadas com o tamanho do tumor primário (T), a presença de metástase em linfonodos regionais (N) e a presença de metástases distantes (M) (CASSALI et al., 2014 e AJCC, 2018).

Também são encontradas semelhanças na classificação fenotípica do câncer de mama entre as duas espécies. Essa classificação é baseada na expressão de receptores hormonais para progesterona (PR), estrógeno (ER) e EGFR2 humano (HER-2). Em humanos, ainda é considerado o índice proliferativo, representado pela expressão de Ki67, agrupado com os receptores, índice considerado separadamente, apenas com resultado positivo e negativo em cadelas. Em cães, o valor de corte para Ki67 é 20% (dado não publicado, último consenso de tumor mama realizado no IV Encontro de Patologia Mamária 2019). Em cães, ainda é considerada a expressão de COX-2 para a avaliação preditiva do paciente, sendo o escore acima de seis considerado positivo (COATES, et al., 2015 e CASSALI et al., 2017). A tabela 1 demonstra a comparação entre os parâmetros utilizados em humanos e cães para sua classificação fenotípica.

Tabela 1: Comparação entre os parâmetros utilizados na classificação fenotípica de neoplasias mamárias em mulheres e cadelas

Classificação	Caninos	Humanos
Luminal A	ER +, PR +, HER2 - (+ >20%)	ER+, PR ≥ 20%, Ki67 < 20%, HER2 -
Luminal B HER2 -	ER +, PR +, HER2 + (+ >20%)	ER+, HER2-, PR < 20% e/ou Ki67 ≥ 20%
luminal B HER2 +	Não utilizado	ER +, PR +, HER2 +
Superexpressão HER2	Não utilizado	ER -, PR -, HER2 +
Triplo negativo	ER -, PR -, HER2 -	ER -, PR -, HER2 -

Fonte: (COATES, et al., 2015 e CASSALI et al., 2017)

Assim, com base nas informações expostas, é notória a relevância da utilização de cães como modelo experimental para estudo do câncer de mama de ocorrência natural em humanos, uma vez que, em ambas as espécies, a doença acomete espontaneamente pacientes imunocompetentes, com microambiente intacto e promove manipulação da expressão genética de importantes mecanismos moleculares e de vias de sinalização específicas.

Desde 2000, tem-se voltado atenção para os chamados marcadores moleculares do câncer, comportamentos comuns entre as neoplasias em geral, como evasão de apoptose, imortalidade celular, instabilidade genômica, entre outras. Com o aprofundamento das pesquisas, observou-se que esses eventos ocorrem simultaneamente e que um gene expresso de forma anômala é capaz de induzir diversos marcadores (HANAHAN e WEINBERG, 2000 e HANAHAN e WEIBERG, 2011). A conexão entre as vias alteradas pelo processo neoplásico está relacionada com as isoformas produto de *splicing* alternativo, elas são capazes de interagirem e promoverem ativação de mais de uma via celular concomitantemente. Por esse motivo, o *splicing* alternativo aberrante presente em células neoplásicas também é considerado um marcador molecular do câncer. Esse comportamento é observado tanto na espécie humana quanto na canina (PINHO et al., 2012 e LADOMERY et al., 2013).

Inicialmente, a transcrição genética origina um RNAm imaturo, ou pré-RNAm, formado por sequências codificadoras, os éxons, intercaladas por sequências não codificadoras, os íntrons. *Splicing* é o processo pelo qual ocorre a remoção dos íntrons

e posterior união dos éxons, formando o RNAm maduro e tornando-o capaz de migrar do núcleo ao citosol, onde ocorrerá a tradução proteica.

O *splicing* ocorre ancorado no spliceossomo, uma maquinaria extremamente precisa, formada por snRNA (pequenos RNAs nucleares), denominados U1, U2, U4, U5 e U6, complexados com uma série de proteínas formando as snRNPs (pequenas ribonucleoproteínas nucleares), além de outras proteínas maiores. Por pareamento de bases, as snRNPs identificam sequências específicas no pré-RNAm, os sítios de *splicing*, onde ocorrem atividades enzimáticas responsáveis por (i) formação de um laço no íntron a ser removido e aproximação dos sítios de *splicing*, (ii) clivagem no sítio 5' de *splicing*, (iii) remoção do laço de íntron pela clivagem do sítio 3' de *splicing* e (iv) união das duas sequências de éxons.

A especificidade do reconhecimento dos sítios de *splicing* é garantido pelas proteínas SR e pelas ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares (hnRNP). Ambas possuem segmentos de reconhecimento de sequências consenso no pré-RNAm que identificam os sítios de *splicing*, essas regiões são denominadas iniciadoras e silenciadoras. O reconhecimento dessas regiões pelos fatores de *splicing* SR e hnRNPs sinaliza para as snRNPs os locais de clivagem e união para o processamento do novo transcrito (SHEPARD E HERTEL, 2009; LONG e CACERES, 2009; IBRAHIM et al., 2005).

Entretanto, por meio do *splicing* constitutivo um gene produz apenas um transcrito, o que não justificaria a complexidade do proteoma eucarioto. Para ampliar a diversidade da expressão do genoma, o organismo lança mão do mecanismo de *splicing* alternativo, onde combinações específicas de deleção de éxons e retenção de íntrons, em parte ou inteiros, alteram os sítios de *splicing* e dão origem a isoformas que, se traduzidas, produzirão proteínas com funções distintas das clássicas (FEDOR, 2008; NILSEN e GRAVELEY, 2010), pelo menos 92% do genoma humano sofre *splicing* alternativo (PAN et al., 2008).

O *splicing* alternativo altera a expressão gênica gerando produtos com domínios de ligação alterados que irão interagir com seus ligantes de forma distinta. Quando o transcrito faz parte de uma via de sinalização celular, pode torná-la passível de ativação onde estaria refratária, ou caso contrário, provocando sua inibição. Pode também produzir proteínas truncadas, e inativas ou, ainda, introduzir um códon de terminação prematura (PTC), ativando o sistema de vigilância de decaimento do RNAm mediado por sequência sem sentido (NMD), o que resulta em degradação do

RNA_m e, conseqüentemente, na inibição da expressão de um gene alvo (BLENCOWE, 2006).

Além de demandarem os sítios de éxons, as proteínas SR também 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). Diversas pesquisas relatam a existência de *splicing* alternativo aberrante em células tumorais, resultado da superexpressão de fatores de *splicing*, que acelera episódios de progressão tumoral (KARNI et al., 2007, GHIGNA et al., 2005, ANCZUKÓW et al., 2012). Responsável pela fosforilação do domínio RS característico das proteínas SR, a família de quinases SRPK juntamente com CLKs, são as principais responsáveis pela ativação das proteínas SR, entretanto, as SRPKs se relacionam com as proteínas SR de uma maneira mais fiel, enquanto as CLKs apresentam uma especificidade mais ampla pelos sítios RS (GIANNAKOUROS et al., 2011). A SRPK1 foi detectada super expressa em tumores mamários humanos e relaciona a maior potencial tumorigênico por meio de estímulo de vias de proliferação e evasão de apoptose (HAYNES et al., 2007 e LIN et al., 2014). Em humanos, a superexpressão de isoformas produto do *splicing* alternativo configuram assinaturas de diversas neoplasias e sua inibição está estabelecida com uma linha de ataque à doença (Oltean e Bates, 2014). Entretanto, ainda não se tem esclarecida a relevância desse processo celular na tumorigênese do tumor de mama canino.

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a relevância de eventos de *splicing* alternativo no comportamento clínico do tumor mamário canino para, a partir de então, julgar a importância da intervenção neste processo celular para o tratamento e controle do referido tumor e, dessa forma, incluir as cadelas como modelo em mais uma linha de pesquisa a respeito do tumor de mama humano.

2. METODOLOGIA:

2.1. Seleção:

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: O *splicing* alternativo representa um processo celular contudente na tumorigênese da neoplasia mamária canina?

Para selecionar os artigos usou-se o critério PICO (Population, Intervention, Comparison and Outcomes). Os critérios de elegibilidade estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
População de caninos do sexo feminino que apresentam tumor mamário e linhagens celulares de tecido mamário canino.	Outras espécies, caninos machos e caninos que apresentam outros tipos de neoplasias.
Super expressão de isoformas produto de <i>splicing</i> alternativo.	Presença de isoformas produto de outros processos celulares.
Estudos clínicos randomizados que avaliaram a expressão gênica em tecido mamário sadio e neoplásico publicados em revistas indexadas.	Revisões e capítulos de livros.

Não foram estabelecidos critérios de exclusão para data de publicação e idioma.

2.2. Fontes de dados, pesquisa e seleção dos estudos:

A triagem dos artigos a serem incluídos na pesquisa foi realizada através dos sites das bases de dados PubMed, Science Direct, Web of Science e Scopus no período entre novembro de 2019 e janeiro de 2021 e a seleção contou com o auxílio da ferramenta START (State of the Art through Systematic Review) criado em 2010 pela Universidade Federal de São Carlos. As palavras-chaves e os operadores booleanos empregados foram:

- Canine OR dog
- AND tumor OR cancer
- AND expression
- AND splicing
- AND mammary

A primeira fase da seleção dos estudos foi baseada unicamente na leitura do título, os selecionados foram também submetidos à leitura do resumo e, os eleitos para a terceira fase foram lidos na íntegra.

2.3. Análise e extração de dados

Os artigos selecionados foram analisados por dois revisores independentes, segundo um roteiro de dados qualitativos pertinentes ao objetivo desta análise, são eles:

- Informações referentes ao artigo e seus autores: título, autores, país e ano.
- Informações referentes à molécula alvo: nome, localização celular, função e similaridade com a sua ortóloga humana.
- Origem e quantificação das amostras: linhagem celular ou local biopsiado.
- Isoformas produto de *splicing* alternativo e sua expressão em tecido mamário saudável e neoplásico.
- Inclusão de PTC.

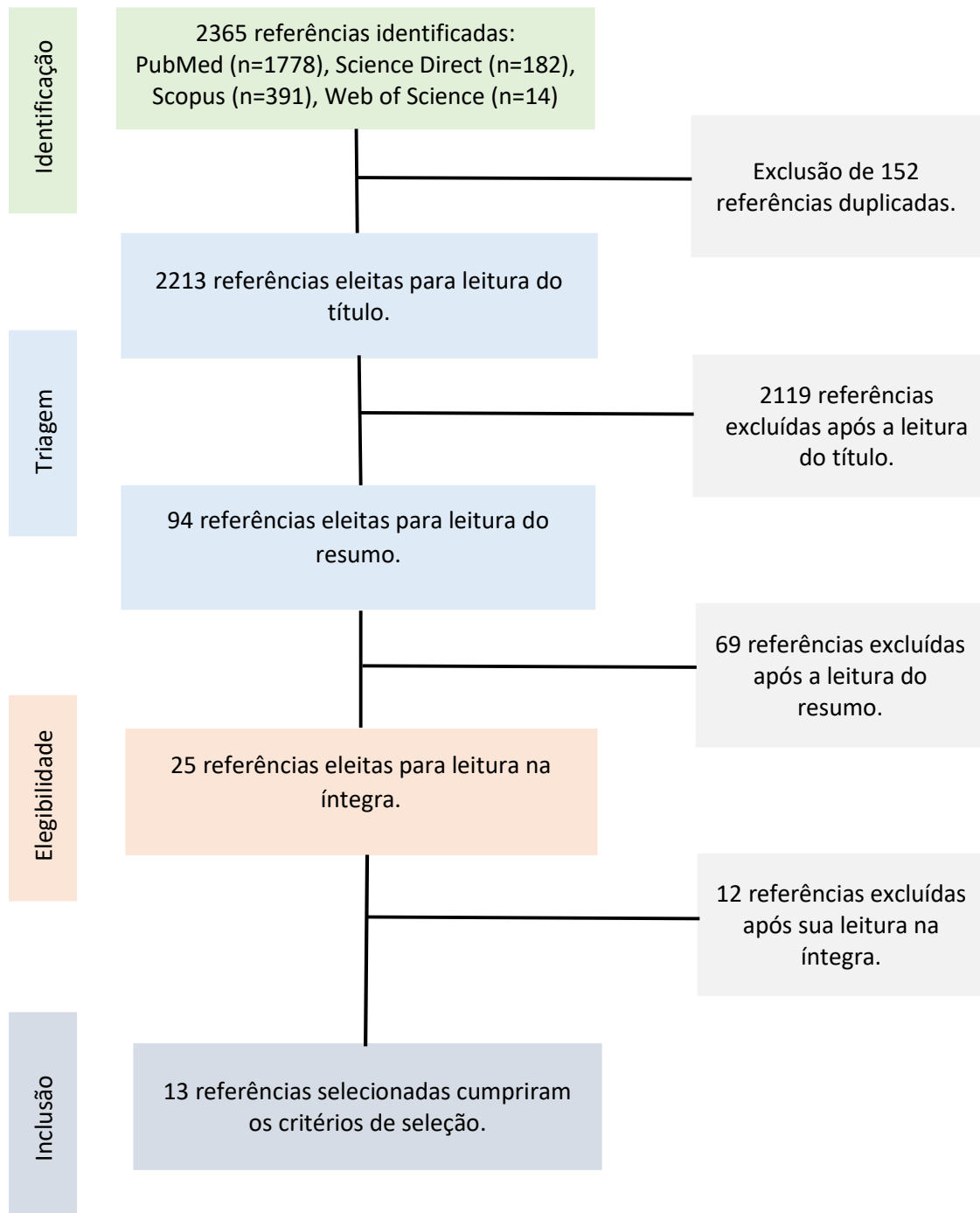
3. RESULTADOS:

3.1. Seleção:

Preliminarmente, foram identificados nas bases de dados 2365 artigos, dentre os quais 152 estavam duplicados. Após a leitura do título, 94 trabalhos foram eleitos para leitura do resumo e destes, 25 seguiram para a sua leitura na íntegra. Ao final dessa etapa, 13 artigos cumpriram os critérios de inclusão. Os principais motivos para exclusão de artigos em cada etapa foram por se tratar da caracterização de produtos de *splicing* alternativo em tumores humanos e outros tumores caninos que não o mamário. Vale ressaltar a exclusão de dois artigos especificamente que tratam sobre a expressão de dois genes supressores de tumor. O primeiro, a respeito da expressão do p53 (CHU 1998), não cumpriu os critérios de elegibilidade dessa revisão porque determinou a expressão de isoformas produto de mutação, a partir da análise do DNA genômico. O segundo, sobre o PTEN (Kanae, 2005), investigou a expressão de variantes fruto de mutação deletéria ao nível do DNA.

O percurso para a seleção dos 13 artigos incluídos nesta revisão sistemática está demonstrado de forma esquemática na figura 1.

Figura 1: Fluxograma demonstrando as fases de seleção dos artigos incluídos na revisão sistemática.



3.2. Informações referentes ao artigo e seus autores: título, autores, país e ano.

Dentre os treze artigos selecionados, cinco foram elaborados por um grupo de pesquisadores, sendo quatro relacionados à uma família de proteínas, as KLKs. Quatro foram desenvolvidos por grupos japoneses, sendo que dois, a respeito da BRCA2, tiveram o mesmo primeiro autor e foram produzidos pelo mesmo grupo de

pesquisadores da Universidade Kitasato. Grupos de Taiwan, Alemanha, Estados Unidos e Suécia tiveram cada um uma referência.

As informações básicas de cada um dos treze artigos eleitos a comporem essa revisão encontram-se compiladas na tabela 3. A partir dessa tabela, os artigos serão identificados no texto pelo seu número correspondente.

Tabela 3. Artigos selecionados para análise:

Número atribuído ao artigo	Título	Autor	Ano	País
1	The canine kallikrein-related peptidase 14: Structural characterization, alternative <i>splicing</i> and differential expression in mammary cancer	Angelopoulou, K.; Prassas, I.; Yousef, G. M.	2009	Grécia / Canadá
2	The canine kallikrein-related peptidases 9 and 10: structural characterization and expression in mammary cancer.	Angelopoulou, K.; Karagiannis, G. S.	2009	Grécia
3	Structural characterization and expression of five novel canine kallikrein-related peptidases in mammary cancer	Angelopoulou, K.; Karagiannis, G. S.	2010	Grécia
4	Identification, molecular characterization and alternative <i>splicing</i> of three novel members of canine kallikrein (KLK)-related peptidase family	Angelopoulou, K.; Karagiannis, G. S.	2015	Grécia

5	Expression Patterns of BRCA1 <i>splicing</i> variants in canine normal tissue and mammary gland tumors	Sugiura, T. et al.	2007	Japão
6	Reduced canine BRCA2 expression levels in mammary gland tumors	Yoshikawa, Y. et al.	2015	Japão
7	Cloning, characterization, and comparative quantitative expression analyses of receptor for advanced glycation end products (RAGE) transcripts forms.	Sterenczak, K. A. et al.	2009	Alemanha
8	<i>Canis familiaris</i> telomerase reverse transcriptase undergoes alternative <i>splicing</i>	Angelopoulou, K. et al.	2008	Grécia
9	Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumor.	Garderen, E. V. et al.	1999	Suécia
10	Expression frequency of c-kit isoforms and its prognostic potential in canine mammary tumours	Chen, Y.; Liao, J.; Chang, S.; Hsu, W.	2019	Taiwan
11	Function analysis of CD44 variants and xCT in canine tumors	Tanabe, A. et al.	2020	Japão

12	Reduced translation efficiency due to novel <i>splicing</i> variants in 5' untranslated region and identification of novel cis-regulatory elements in canine and human BRCA2.	YOSHIKAWA, Y. et al.	2021	Japão
13	Characterization of the canine mda-7 gene, transcripts and expression patterns.	SANDEY, M. et al.	2014	EUA

3.3. Informações referentes à molécula alvo: nome, tipo, localização celular e similaridade com a ortóloga humana:

Dentre os treze artigos, quatro avaliaram proteases que atuam na matriz extra celular, as KLKs, e um trata de uma enzima nuclear, a telomerase. Quatro avaliaram proteínas nucleares que resultam da expressão de genes supressores de tumor de mesmo nome, a BRCA1, a BRCA2 e a MDA-7. Os outros quatro caracterizam o comportamento de receptores de membrana nas células mamárias caninas, são eles RAGE, GHR, KIT e CD44.

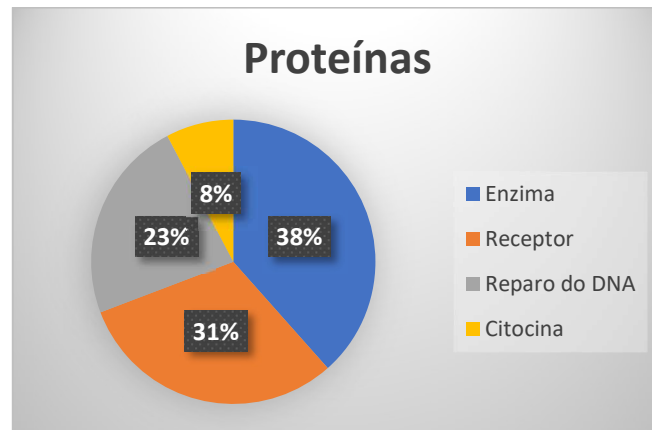
Seis artigos desenvolveram ensaios para determinação da similaridade entre as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos de cada transcrito e proteína prevista com a ortóloga humana, foram eles os quatro sobre as KLKs e os a respeito de GHR e de MDA-7. Os demais transcritos já haviam passado anteriormente por análises comparativas e essa determinação não esteve entre os objetivos de seus respectivos estudos. A tabela 4 exibe um panorama dessa etapa e a figura 2 demonstra a prevalência de cada tipo proteico analisado nos treze artigos.

Tabela 4. Moléculas alvo dos estudos selecionados e suas informações.

Artigo	Proteína	Tipo	Localização celular	Similaridade com humanos	
				NC	AA
1	KLK14	Enzima	Matriz extra celular	Alta, mas não especifica valor	
2	KLK9 e 10	Enzima	Matriz extra celular	9: 88,2%	89,2%
				10: 86,1%	84,1%
3	KLK4, 5, 6, 7 e 8	Enzima	Matriz extra celular	4: 85,3%	77,9%
				5: 81,2%	77,5%
				6: 87,0%	84,9%
				7: 84,4%	81,7%
				8: 83,0%	77,6%
4	KLK 11, 12 e 13	Enzima	Matriz extra celular	11: 85,7%	82,0%
				12: 81,6%	77,0%
				13: 86,1%	83,8%
5	BRCA1	Proteína de reparo do DNA	Núcleo	Não avaliado	
6	BRCA2	Proteína de reparo do DNA	Núcleo	Não avaliado	
7	RAGE	Receptor	Membrana celular	Não avaliado	
8	TERT	Enzima	Núcleo	Não avaliado	
9	GHR	Receptor	Membrana celular	Alta, mas não especifica valor	
10	KIT	Receptor	Membrana celular	Não avaliado	
11	CD44	Receptor	Membrana celular	Não avaliado	
12	BRCA2	Proteína de reparo do DNA	Núcleo	Não avaliado	
13	MDA-7	Citocina	Sítios diversos.	Alta	66%

Legenda: NC, nucleotídeos. AA, aminoácidos.

Figura 2: Tipos proteicos avaliados pelos estudos selecionados.



3.4. Origem e quantificação das amostras: linhagem celular e local biopsiado:

Observou-se um total de 650 amostras e para traçar uma análise comparativa dos resultados nas diferentes espécies e origens de amostras elas foram divididas em seis categorias: Tecido canino mamário saudável (TCMS), tecido canino mamário neoplásico (TCMN), tecido canino não mamário, subdividido em saudável e neoplásico (TCNM), linhagem canina mamária, linhagem canina não mamária e linhagem humana, as três também subdivididas em saudável e neoplásica (LCM, LCNM e LH, respectivamente). Na tabela 5 pode-se observar o número de amostras em cada categoria.

Tabela 5. Origem das amostras analisadas pelos estudos selecionados.

Proteínas	TCMS	TCMN	TCNM	LCM	LCNM	LH	
KLK 14	22	22	-	-	-	-	
KLK 9 e 10	22	22	-	-	-	-	
KLK 4-8	12	32	-	-	-	-	
KLK 11-13	10	30	-	-	-	-	
BRCA1	2	16	6(S)	-	-	-	
BRCA2	7	17	-	-	-	-	
RAGE	-	1	23	7(S) 16(N)	1(S) 2(N)	1(M) 1(B)	3 1(B)
Tert	8	8	-	-	-	-	
GHR	18	19	7(M) 12(B)	3(N)	-	4(N)	-
KIT	16	180	90(M) 90(B)	29	5(S) 24(N)	-	-
CD44	39	39	-	1(N)	6(N)	-	
BRCA2	-	-	3(S)	3(N)	1(S)	2	1(M) 1(B)
MDA-7	-	-	20	5(S) 15(N)	3(N)	4	1(S) 3(N)
TOTAL:	156	386	78	20(S) 58(N)	1(S) 9(N)	2(S) 8(M) 1(B)	3(M) 5 2(B)

Legenda: TCMS, tecido canino mamário saudável. TCMN, tecido canino mamário neoplásico. TCNM, tecido canino não mamário. LCM, linhagem canina mamária. LCNM, linhagem canina não mamária. LH, linhagem humana. M, maligno. B, benigno. S, saudável. N, neoplásico.

3.5. Isoformas produto de *splicing* alternativo, respectivos métodos de análise, sua expressão em tecido mamário saudável e neoplásico e introdução de códon de terminação prematura:

Entre os dezenove transcritos avaliados, cinco não expressaram variantes diferentes da forma clássica, enquanto todos os outros estudos detectaram a expressão de isoformas produto de *splicing* alternativo. Quatro artigos tratam de

transcritos-alvo cuja expressão já foi caracterizada anteriormente, são eles sobre BRCA2 (2 artigos), mda-7 e dog-TERT. Seus respectivos estudos participantes dessa revisão analisam a expressão de sequências distintas, já descritas como envolvidas em processos pró-carcinogênicos, e com o objetivo de determinar sua relação nesses processos, seus autores não avaliam a expressão ampla dos seus transcritos nas amostras, mas procuram determinar sua influência em comportamentos celulares específicos. Os demais nove artigos objetivam a caracterização da expressão livre de seus transcritos nas amostras analisadas.

Todos os estudos utilizaram PCR semi-quantitativo para determinar a expressão dos genes estudados entre suas amostras, seja a forma clássica, as isoformas transcritas a partir de um segmento de RNAm selecionado ou a pesquisa de um transcrito em particular, e quatro deles utilizaram qRT-PCR para determinar a frequência relativa de seu transcrito-alvo e suas variantes.

Em relação à expressão das isoformas produto de *splicing* alternativo entre amostras mamárias neoplásicas comparadas às saudáveis, quatro artigos detectaram super expressão desses transcritos e cinco inibição, em um não houve diferença na expressão entre os dois tipos de amostras e em quatro essa comparação não estava entre os objetivos da pesquisa.

Outro ponto relevante na detecção das variantes é se o *splicing* alternativo introduz PTC nos transcritos recém processados. Dentre os estudos avaliados, cinco não fizeram essa investigação, sete detectaram PTC e um descreve um códon de terminação diferente originando um transcrito dissimilar do clássico, entretanto, não relata se ele é prematuro.

A tabela 6 sumariza as informações a respeito das isoformas e sua expressão, o método de análise utilizado e se o processo de *splicing* alternativo introduz PTC ou não nos novos transcritos.

Tabela 6. Informações sobre as isoformas analisadas nos estudos selecionados:

Artigos	Isoformas	Método de análise das isoformas	Expressão em tec. neoplásico	Introdução de PTC
KLK14	Var1: exon 4 truncado. Var2: deleção do exon 4 Var3: retenção de intron 1 Var4: retenção de intron 1 e deleção de parte do exon 4 Var5: retenção de intron 1 e deleção de exon 4	RT-PCR	Inibição da variante 1	Presente em todas as variantes
KLK9-10	Todas da KLK9: Var1: deleção do exon 3 Var2: Retenção do intron 1 e deleção do exon 3 Var3: retenção do intron 1	RT-PCR	Não houve diferença na expressão	Presente em todas as variantes.
KLK4-8	Var1: deleção do exon 4.	RT-PCR	Inibição da variante 1	Presente na Var1
KLK11-13	KLK11, 12 e 13: Var1: deleção exon 2-3 KLK 11 e 13: Var 2: deleção exon 3 e inserção de 4pb entre exons 2 e 4	RT-PCR	Super expressão das var1 e 2 de KLK11 e da var1 de KLK13 e inibição da var2 de KLK13	Presente nas variantes 2 de KLK11 e KLK13
BRCA1	b1 e b7: com partes do exon 11 b2: região do exon 14-15 b3: sem exon 11. Delta 11 sem todo o exon 11 e delta 11b sem parte do exon 11	RT-PCR	Inibição das variantes b2 e b3	Não informado
BRCA2	Var1: ausência da região entre os exons 14-16 Var2: Ausência da região entre os exons 12-14 Var3: Ausência do exon 12. Var4: Ausência do exon 14. Var 5: Ausência da região entre o exon 13-16.	PCR e nested-PCR	Não informado	Presente na variante 1
RAGE	“Íntron 1” “Saudável”	qRT-PCR	Super expressão da variante “íntron 1”	Não informado
TERT	Var1: Deleção de 17pb e inserção de 28pb Var2: Inserção de 28pb Var3: Inserção de 17pb e deleção de 32pb Var4: Inserção de 175pb e 28pb Var5: Inserção de 175pb	RT-PCR e nested-PCR	Não informado	Presente em todas as variantes
GHR	Var 380pb: deleção de todo o exon 8 Var 305pb: deleção de todo exon 7 Var 316pb: deleção de quase todo exon 6 e do início do exon 7 Var 277pb: deleção de parte do exon 7 e de todo exon 8.	RT-PCR, nested-PCR, southern blot e Northern blot	Inibição de todas as variantes	Presente em todas as variantes
c-kit	Var GNSK ⁺ Var GNSK ⁻	PCR e qRT-PCR	Super expressão de GNSK ⁻	Não informado

CD-44	10 variantes	Semi quantitativo RT-PCR	Super expressão das variantes	Não informado
BRCA2	6 variantes	Semi quantitativo RT-PCR, nested-PCR e qRT-PCR	Não informado	Não informado
mda-7	Var1: deleção de exon 5 Var2: Adição de 93pb em exon 2 e deleção de exon 5 Var3: Deleção de 63pb em exon 4 e do exon 5 Var4: Utiliza exon 5 distinto Var5: adição de 153pb em exon 3 e utiliza exon 5 distinto	PCR e qRT-PCR	Não informado	Cita códon de terminação diferente.

Legenda: Var, variante.

4. DISCUSSÃO

Nove trabalhos realizaram comparação entre amostras saudáveis e neoplásicas mamárias caninas, entre eles, oito observaram expressão diferente entre as amostras e apenas o que analisou a KLK9 (ANGELOPOULOU et al., 2009b) não observou essa distinção. Os transcritos KLK4, KLK5, KLK6, KLK7 e KLK10 (ANGELOPOULOU et al., 2009b, 2010 e 2015) não expressaram variantes diferentes da forma clássica.

Os estudos sobre BRCA2 (YOSHIKAWA et al., 2015; YOSHIKAWA et al., 2021), dog-TERT (ANGELOPOULOU et al., 2008) e MDA-7 (SANDEY et al., 2014) não realizaram teste comparativo da expressão das isoformas identificadas em seus ensaios nas amostras mamárias caninas saudáveis e neoplásicas. Entretanto, foram incluídos nessa análise porque além de detectarem a presença de isoformas em amostras mamárias caninas, descrevem a relação entre elas e funções específicas.

YOSHIKAWA et al. (2015) e YOSHIKAWA et al. (2021) investigaram a causa da baixa expressão de BRCA2 em amostras neoplásicas. Após descartarem a hipótese de que mutações na região promotora e a introdução de PTC, com posterior decaimento do RNAm, determinariam a expressão de BRCA2, os autores identificaram que variantes originadas de *splicing* da região não codificante 5' de BRCA2 alteravam a eficiência de tradução proteica. A variante que reteve o íntron 1 não só estava relacionado com a baixa eficiência de tradução proteica como também manteve a região onde se localizam elementos regulatórios em cis (promotores e silenciadores) de BRCA2. Esse trabalho também determinou esse mesmo comportamento em células humanas.

BRCA2 é um gene supressor de tumor, essencial para o reparo de dano à fita dupla de DNA durante a divisão celular (PATEL et al., 1998). O reparo se dá por recombinação homóloga onde a proteína age complexada com RAD51, um componente essencial do processo, imprescindível para manter a estabilidade genômica. BRCA2 é responsável tanto pela localização nuclear de RAD51 quando pela sua ligação ao DNA (DAVIES et al., 2001).

Não existe consenso entre o padrão de expressão de BRCA2 em células mamárias neoplásicas caninas e humanas, alguns trabalhos observam inibição (YOSHIKAWA et al., 2015; YOSHIKAWA et al., 2021), enquanto outros verificaram sua super expressão (BIÈCHE et al., 1999; KLOPFLEISCH et al., 2009 e GENTILE et al., 2017). Tal fato demonstra a necessidade de estudo de suas isoformas, pois a

pesquisa a cerca da sua forma clássica é insuficiente para determinar seu papel na tumorigênese.

MDA-7 é uma citocina, membro da família IL-10, com propriedades antiproliferativas seletivas para células tumorais. Em células neoplásicas mamárias humanas, a expressão de mda-7 está relacionada com indução de apoptose e parada do ciclo celular. Sua super expressão em células com fenótipo triplo negativo foi observada a recuperação da expressão de receptor para estrógeno, tornando-a sensível ao tratamento hormonal (VALERO et al., 2011). O artigo selecionado pela revisão (SANDEY et al., 2014) descreve pela primeira vez as características estruturais e o padrão de expressão de mda-7 em cães. O estudo descreve 5 isoformas caracterizadas em queratinócitos caninos, mas não detectado em nenhuma das amostras tumorais, com exceção de CMT-12. Essa diferença pode estar relacionada ao padrão de receptores distinto que essa linhagem apresenta: baixa expressão de ER, ausência de PR e super expressão de HER, entretanto o estudo não realiza essa análise (KABIR et al., 2017). A ausência em amostras neoplásicas coincide com o detectado em humanos, mas a apresentação do homólogo canino é ainda mais restrito em tecido neoplásico, devendo-se analisar a amplitude do efeito antineoplásico de MDA-7 canino em células da espécie. Além do efeito direto sobre vias de sinalização pró-apoptóticas, como AKT (VALERO et al., 2011), MDA-7 representa também um papel descrito como “espectador”, por intermediar o aumento na eficiência de outros tratamentos, como a reversibilidade do fenótipo de resistência a múltiplas drogas em tumor colorretal (EMDAD et al., 2007) e pelo restabelecimento da sensibilização de células de tumor pulmonar ao tratamento por radioterapia (NISHIKAWA, et al., 2004).

O artigo sobre dog-TERT (ANGELOUPOULO et al., 2008) também não estabelece a relação entre as amostras caninas mamárias, mas descreve a geração de 5 isoformas produto de *splicing* alternativo em cães. TERT é a subunidade catalítica responsável pela atividade de transcriptase reversa da enzima telomerase. Atuando na manutenção do DNA, a telomerase produz e repõem sequências específicas na extremidade do cromossomo, promovendo a estabilidade do comprimento do telômero e o “antienvhecimento” da célula. Sua função é essencial durante a embriogênese e suprimida à medida que os tecidos sofrem diferenciação, mas durante a transformação neoplásica de tumores telomerase positivo, ocorre a restauração da sua atividade num processo que envolve obrigatoriamente TERT nas

formas clássica e variantes, já nos tumores malignos telomerase negativo, TERT, quando expressa, apresenta-se muito menos abundante que suas variantes (PANG, et al., 2009).

Assim como em humanos, 90% dos tumores em cães apresentam atividade de telomerase, além disso, os telômeros caninos apresentam mesmo comprimento que os humanos, em contrapartida, os modelos murinos não se aplicam com tanta eficiência ao estudo comparativo pois apresentam telômeros muito maiores do que o das outras espécies e a telomerase é constitutivamente presente em tecidos murinos adultos (ZAFFARONI, et al., 2002). Nenhuma das variantes caninas, se traduzidas, originaria uma proteína funcional, pois, assim como nas isoformas humanas, seriam deficientes nos motivos essenciais RT ou teriam a introdução de um códon de terminação prematura, resultando em uma proteína truncada. As semelhanças levantam a hipótese de TERT humana e canina terem o mesmo mecanismo de regulação de telomerase na tumorigênese via forma clássica e isoformas.

Os demais artigos relatam a análise comparativa do comportamento de seus transcritos-alvo em células mamárias caninas. Quatro estudos abordam a família das KLKs (Angelopoulou e Karagiannis, 2009, 2010 e 2015; Angelopoulou et al., 2009), proteases da matriz extracelular de epitélios secretórios presentes em órgãos como pele, mama, próstata, pâncreas e cérebro. Elas atuam em atividades de descamação da pele, liquefação do sêmen, plasticidade neuronal, regulação da pressão sanguínea e defesa antimicrobiana. As KLKs são proteínas altamente conservadas entre as diferentes espécies e as ortólogas canina e humana apresentam alta similaridade funcional e estrutural. Uma das características dessa família é ser altamente propensa a sofrer *splicing* alternativo, originando uma ampla gama de variantes com funções distintas entre os processos fisiológicos e patológicos. Em processos neoplásicos humanos, essa família apresenta-se variavelmente expressa a depender do tecido, podendo estar superativada ou inibida, e dessa forma, participam da progressão tumoral em eventos de proliferação, invasão e angiogênese (Borgoño e Diamandis, 2004).

KLKs humanas apresentam importante papel no monitoramento do paciente oncológico. O membro mais ilustre dessa família é a KLK3, também conhecida como antígeno prostático específico, ou PSA, um marcador cujo aumento tem relação com câncer de próstata em homens. Estudos apontam variantes de KLK5, KLK6, KLK7,

KLK8 e KLK9 como instrumentos úteis para avaliação diagnóstica e determinação de prognóstico e de estratégia terapêutica (FIGUEROA, et al., 2018).

Foi detectado na transcrição de KLK3, variante PSA-LM, a retenção do íntron 1 que, quando traduzida, origina uma proteína diferente da forma clássica que se encontra superativada sob a ação dos hormônios andrógenos (DAVID, et al., 2002). Esse mesmo evento foi detectado em cinco das quatorze isoformas identificadas entre as KLKs caninas. Entretanto, análises comparativas sobre o comportamento dessa família devem ser realizadas com cautela porque em humanos, suas variantes parecem ser expressas de forma específica de acordo com o tecido e a neoplasia, portanto, faz-se necessário um estudo voltado especificamente para a espécie canina (KURLENDER et al., 2005).

BRCA1 é outro gene supressor de tumor abordado nessa revisão, ele apresenta funções relacionadas ao controle do ciclo celular, modulação da transcrição genética e reparo de quebra da fita dupla do DNA (ZHANG e POWELL, 2005). Alterações na sua expressão estão relacionadas com maior predisposição ao desenvolvimento de tumor mamário e pior prognóstico tanto em mulheres quanto em cadelas (Nieto, et al., 2003 e Rivera et al., 2009). Avaliações da sua expressão apresentam por vezes resultados divergentes sobre seu comportamento em relação à tumorigênese mamária canina. Em cães da raça shih-tzu, através de análise imunistoquímica, foi descrita a super expressão de BRCA1 em tumores que expressavam piores marcadores prognósticos (Im, et al., 2013), enquanto Klopffleisch et al., (2009) demonstraram não haver relação entre a expressão de BRCA1 em adenocarcinomas ou em linfonodos metastáticos canino quando comparados com tecido mamário saudável. O artigo que trata da expressão BRCA1 entre as amostras mamárias caninas (Sugiura et al., 2007) analisa a expressão das variantes envolvendo o exon 11, pois nesta região são codificados dois sinais de localização nuclear contundentes para que sua proteína exerça sua função. Uma avaliação sobre a localização em células saudáveis murinas e humanas de BRCA1 e da sua variante BRCA1- Δ 11, onde ocorre ausência do exon 11, demonstrou que a forma clássica era quase que exclusivamente nuclear e a variante citoplasmática, justamente pela perda de seu sinal nuclear (BACHELIER, et al., 2000). Assim como apresentado em células humanas, a variante na qual falta o seguimento do exon 11 parece estar inibida em células caninas mamárias neoplásicas (Sugiura et al., 2007). Esse resultado parece controverso quando se atenta à função primária do éxon 11, entretanto, ainda existem

muitas dúvidas em relação à expressão de BRCA1 e suas variantes, o que é relevante compreender é que, a depender também do tecido, o equilíbrio entre os transcritos é o que determina a sua ação em conjunto. Na tumorigênese mamária, parece que não só a inibição de BRCA1 é necessária, mas também a de sua isoforma BRCA1-delta-11 (TAMMARO, et al., 2012).

Sterenczak et al. (2009) caracterizaram a expressão da proteína RAGE, um membro da superfamília das imunoglobulinas localizadas na superfície celular que age como um receptor multiligante que interage com moléculas diversas. Quando complexado ao seu ligante, tem a função de ativar vias de sinalização celular relacionadas ao crescimento e proliferação. Assim, alterações na sua expressão possuem importante papel em processos patológicos como aterosclerose diabética, deficiência de cicatrização tecidual, Doença de Alzheimer, distúrbios imunológicos e inflamatórias e vários tipos de câncer, com destaque para ligação RAGE-HMGB1 no processo metastático tumoral em glioma (Taguchi et al., 2000). O artigo que analisou a expressão de RAGE agrupou as variantes em dois grupos, o primeiro que retinha o íntron 1, característica que determina transcritos que perdem o domínio de interação com o ligante e com a tradução de proteínas *nonsense*. O segundo, denominado “saudável”, formado pelas variantes que perdem o íntron 1, transcritos também chamados solúveis RAGEs, perdem o seguimento de ancoragem na membrana e agem como ligantes inibidores de RAGE. Os autores avaliaram a expressão numa gama muito ampla de linhagens e tecidos, saudáveis e neoplásicos, tanto humanas quanto caninas e observaram resultados uniformes entre os grupos das amostras normais e o grupo das tumorais nas duas espécies. Eles concluíram que as isoformas que retinham o íntron 1 estavam super expressadas nas amostras tumorais e, mais especificamente na amostra cultivo de células neoplásicas mamárias de cães, onde essa isoforma apareceu quase 15 vezes mais abundante que o transcrito saudável.

GHR é um receptor transmembrana que, ao associar-se ao seu ligante (hormônio do crescimento), dimeriza e ativa a transmissão do sinal de proliferação celular via enzima tirosina quinase citosólica JAK. O *splicing* alternativo de GHR gera isoformas, as GHPBs, homólogas à região extracelular do receptor, mas com função de potente inibidor competitivo do ligante provocando a interrupção do envio do sinal de proliferação celular. Células humanas saudáveis e neoplásicas, apresentam expressão de ambas as formas, entretanto, a expressão das variantes decai consideravelmente em amostras tumorais (ROSS et al., 1997). O artigo sobre GHR

que compõe essa revisão (GARDEREN, et al., 1999) analisou o padrão de variantes originadas da região ao redor do éxon 8, pois essa região codifica o segmento transmembrana do receptor, assim ele se torna incapaz de se ancorar, mas em alguns casos, preserva sua capacidade de ligação ao GH, graças à expressão do motivo YGEFS. Dessa forma, os autores identificaram quatro variantes, uma delas perde a capacidade de se ancorar na membrana plasmática, mas preserva o motivo funcional YGEFS, assim reúne as características de um GHPB e as outras três perdem o motivo. Em concordância com ROSS et al. (1997), todas as amostras analisadas expressaram a forma clássica da proteína, com exceção da linhagem SH15 que não expressou nenhum transcrito de GHR. A linhagem CMT-U335 expressou todas as variantes analisadas. E entre as amostras teciduais, as normais ou tumor benigno expressaram outros transcritos além do clássico, 380bp e 305pb, já as de origem neoplásica apenas expressaram a forma clássica, apresentando inibição de todas as isoformas produto de *splicing* alternativo.

Em tecido mamário, foi observado que a relação GNSK⁻/GNSK⁺ é diretamente proporcional ao grau de malignidade do tumor, entretanto, ocorre inversão dessa relação na análise de amostras mais agressivas e metastáticas (CHEN et al., 2019). Esse comportamento explicita a participação de ambas as isoformas na tumorigênese mamária e, principalmente, a relação entre elas na sua progressão e não só sua função individual.

KIT é uma proto-oncoproteína codificada pelo gene c-KIT com função de receptor para o fator de célula tronco (SCF). Sua ativação se dá pela ligação com SCF, o que promove sua dimerização e autofosforilação intracelular, induzindo, subsequentemente, a ativação de vias downstream de proliferação celular, como PI3K/Akt, JAK-STAT, Ras-Erk, PLCγ e Src (Chen et al., 2020). As isoformas de KIT canina são caracterizadas pela presença ou ausência de quatro aminoácidos no éxon 9, GNSK (glicina, asparagina, serina e lisina), sendo denominadas GNSK⁺ e GNSK⁻, respectivamente (TSAI et al., 2003).

Em amostras de hemangioma e hemangiossarcoma canino (CHEN et al., 2016), através de análise imunoistoquímica, KIT não foi detectado no tumor benigno, enquanto no tumor maligno, KIT apresentou-se superexpressada e correlacionada com a graduação histopatológica da amostra. Sobre o padrão de expressão das isoformas, no hemangiossarcoma não foi detectada GNSK⁺, mas GNSK⁻ e a forma clássica estavam presentes e foi observada também super expressão de GNSK⁻

quando comparada com o controle saudável utilizado pela pesquisa, amostra de cerebelo.

Finalizando o levantamento desta revisão, foi incluída a referência que avaliou a expressão de CD44, uma proteína de superfície de membrana responsável por intermediar a comunicação e a adesão entre a célula e os componentes da matriz extra celular. Entre suas diversas funções biológicas estão a mobilização de leucócitos, regeneração tecidual e proliferação e migração celular. Ele desempenha também importante função na tumorigênese envolvendo os processos de crescimento celular, invasão e metástase (Tanabe, 2020). Dez variantes estão associadas à CD44, mas a pesquisa a respeito dessa proteína de membrana foi direcionada para uma em específico, CD44v8-10. Os autores justificam essa escolha na importância de sua capacidade de acionar a produção de glutathione e o sistema antioxidante celular que protege o tumor dos danos oxidativos causados por quimioterapia e radioterapia, portanto, sua superexpressão está relacionada a um pior prognóstico. Os níveis de glutathione intracelulares dependem do funcionamento de xCT, uma subunidade do sistema anteporte transmembrana que permite o influxo de cistina, necessária para a produção de GSH e o efluxo de glutamato. A análise confirmou a super expressão dessa variante em amostras tumorais quando comparadas com amostras saudáveis, além de comprovar sua maior resistência ao processo oxidativo e radiação pela super expressão de xCT em amostras neoplásicas.

CD44v8-10 é um marcador específico de CSC em câncer gástrico humano (LAU et al., 2014), a presença dessa isoforma na superfície de CSC é responsável pela diminuição de glutathione-SH intracelular via interação com xCT. Em células caninas mamárias neoplásicas, tanto xCT quanto CD44v8-10 encontram-se super expressas, entretanto, esses achados parecem ser independentes um do outro, divergindo do encontrado em células tumorais gástricas humanas, onde CD44v8-10 estabiliza xCT favorecendo a produção de GSH intracelular e aumentando a resistência do tumor ao tratamento (ISHIMOTO et al., 2011). Esses dados levam à hipótese de estar o comportamento descrito em células caninas mamárias neoplásicas relacionado à presença e atuação de células tronco neoplásicas das amostras. Isso permitiria um direcionamento do tratamento alvo-específico não para células que expressem CD44, mas para esse tipo específico presente apenas em tecidos neoplásicos.

Com a análise detalhada dos artigos selecionados, pode-se observar que a determinação de isoformas produto de *splicing* alternativo expressaram-se diferentemente entre amostras mamárias normais e neoplásicas, evidenciando seu importante papel na tumorigênese e na progressão do tumor de mama canino. Não só o comportamento de uma variante específica é contundente para o direcionamento do processo neoplásico, mas é necessária a relação entre duas ou mais variantes ou entre a forma clássica e suas isoformas. E essa relação pode ser alterada e manipulada pela célula neoplásica mesmo após o processo maligno estar estabelecido, como observado no comportamento das isoformas de kit. Além disso, ressalta-se que a introdução de códons de terminação prematura se mostrou uma maneira frequente para alterar a expressão gênica por meio do *splicing* alternativo dos transcritos analisados por essa revisão.

Quanto às limitações dessa revisão sistemática, observou-se que a maior parte dos artigos utilizou métodos semiquantitativos de análise da expressão dos transcritos, logo, alguns dos resultados podem ser diferentes caso o estudo seja desenvolvido com métodos mais precisos.

Quanto à aplicação prática do conhecimento a respeito de *splicing* alternativo, recentemente, estudos demonstraram que a inibição do processo por moléculas capazes de impedir a montagem do spliceossoma e de bloquear a ativação de fatores de *splicing*, confere a elas atividades antiproliferativa, antiangiogênica e antimetastática consequentes do seu mecanismo de ação. Outra classe terapêutica antineoplásica que objetiva afetar o *splicing* alternativo é a construção de pequenos oligonucleotídeos específicos que são capazes de alterar os eventos de *splicing* ou até mesmo restaurar o padrão saudável da expressão gênica (Martinez-Montiel et al., 2018).

Portanto, os resultados aqui apresentados estão inseridos na atualidade das pesquisas sobre comportamento neoplásico e suas implicações. A análise do padrão dos eventos de *splicing* alternativo modulando a expressão gênica no ambiente tumoral representa o presente e o futuro das pesquisas que objetivam o desenvolvimento de terapias antineoplásicas por meio do seu bloqueio e os dados levantados por essa revisão reforçam tanto a relevância do *splicing* alternativo na tumorigênese mamária canina quanto a importância do modelo experimental canino para oncologia humana.

5. CONCLUSÃO:

Conclui-se que o *splicing* alternativo é um evento frequente em amostras mamárias caninas neoplásicas e seu padrão de comportamento se apresenta distinto das amostras saudáveis. Sugere-se, então, que as isoformas produto de *splicing* alternativos têm importante papel na tumorigênese mamária canina assim como na humana, de forma que a interferência nesse processo celular representa uma estratégia interessante para desenvolvimento de novas terapias anti-câncer.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

ABDELMEGEED, S.M.; SULMA, M. Canine mammary tumors as a model for human disease. **Oncology Letters**, v.15, n.6, p. 8195-8205, 2018.

AMERICAN JOINT COMITEE ON CANCER. Breast. 13 mar. 2018. Disponível em: <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC%208th%20Edition%20Breast%20Cancer%20Staging%20System.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2021.

ANGELOPOULOU, K. et al. *Canis familiaris* telomerase reverse transcriptase undergoes alternative splicing. **Mamm Genome**. v. 19, p. 647-653, 2008.

ANGELOPOULOU, K.; PRASSAS, I.; YOUSEF, G. M. The canine kallikrein-related peptidase 14: Structural characterization, alternative splicing and differential expression in mammary cancer. **Gene**. v. 446, p. 68-74, 2009.

ANGELOPOULOU, K.; KARAGIANNIS, G. S. The canine kallikrein-related peptidases 9 and 10: structural characterization and expression in mammary cancer. **Mamm Genome**. v. 20, p. 758-767, 2009.

ANGELOPOULOU, K.; KARAGIANNIS, G. S. Structural characterization and expression of five novel canine kallikrein-related peptidases in mammary cancer. **Mamm Genome**. v. 21, p. 516-524, 2010.

ANGELOPOULOU, K.; KARAGIANNIS, G. S. Identification, molecular characterization and alternative splicing of three novel members of canine kallikrein (KLK)- related peptidase family. **Anticancer Research**. v. 35, p. 2715-2724, 2015.

ANCZUKÓW, O. et al. The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nature Structural & Molecular Biology*. v. 19, n. 2, p. 220-228, 2012.

BIÈCHE, I.; NOGUÈS, C.; LIDEREAU, R. Overexpression of BRCA2 gene in sporadic breast tumours. **Oncogene**. v. 18, p. 5232-5238, 1999.

BLENCOWE, B. J. et al. Alternative splicing: New insights from global analyses. **Cell**, v.126, p. 37-47, 2006.

BORGOÑO, C. A.; DIAMANDIS, E. P. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. **Nature**, v. 4, p. 876-890, 2004.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors – 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v. 7, n. 2, p. 38-69.

CASSALI, G. D. et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v. 10, n. 3, p. 87-99, 2017.

CARUANA, G. et al. Isoforms of c-KIT differ in activation of signalling pathways and transformation of NIH3T3 fibroblasts. **Oncogene**. v. 18, p. 5573-5581. 1999.

CHEN, Y.; LIAO, J.; CHANG, S.; HSU, W. Expression frequency of c-kit isoforms and its prognostic potential in canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 18, p. 303-314, 2019.

CHEN, Y. C. et al. Identification of the two KIT isoforms and their expression status in canine hemangiosarcomas. **BMC Veterinary Research**. v. 12, n. 142, p. 1-8. 2016.

CHU, L. L.; et al. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. **Breast Cancer Research and Treatment**. v.50, p. 11-25, 1998.

COATES, A. S.; et al. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. **Annals of Oncology Advance**. V. 26, p. 1533-1546, 2015.

COGLIANO, V., Y. et al. WHO International Agency for Research on Cancer. Carcinogenicity of combined oestrogen-progestagen contraceptives and menopausal treatment. **Lancet Oncology**. v. 6, p. 552–53, 2005.

DAVID, A. et al. Unusual Alternative Splicing within the Human Kallikrein Genes KLK2 and KLK3 Gives Rise to Novel Prostate-specific Proteins. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. 20, p. 18084-18090, 2002.

DAVIES, A. A. et al. Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein. **Molecular Cell**. v. 7, 273-282, 2001.

EMDAD, L. et al. Melanoma differentiation associated gene-7/ interleukin-24 reverses multidrug resistance in human colorectal cancer cells. **Molecular Cancer Therapy**. V. 6, n. 11, p. 2985-2994, 2007.

FEDOR, M.; J. et al. Alternative splicing minireview series: Combinatorial control facilitates splicing regulation of gene expression and enhances genomic diversity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 3, p. 1209-10210, 2008.

FIGUEROA, C. D.; et al. Overview of tissue kallikrein and kallikrein-related peptidases in breast cancer. **Biological Chemistry**. v. 399, n. 9, p. 937-957, 2018.

FUHRMAN, B. J. et al. Estrogen Metabolism and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 104, p. 329-339, 2012.

GARDEREN, E.V.; et al. Expression of Growth Hormone in Canine Mammary Tissue and Mammary Tumors. Evidence for a Potential Autocrine/Paracrine Stimulatory Loop. **American Journal of Pathology**. v. 150, n. 3, p. 1037-1047, 1997.

GARDEREN E. V. et al. Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumor. **Endocrinology**. v. 140, n. 12, p. 5907-5914, 1999.

GENTILE, L. B. et al. Establishment of primary mixed cell cultures from spontaneous canine mammary tumors: Characterization of classic and new cancer associated molecules. **Plos One**. v. 12, n. 9, 1-19, 2017.

GHIGNA, C. et al. Cell Motility Is Controlled by SF2/ASF through Alternative Splicing of the Ron Protooncogene. **Molecular Cell**. v. 20. p. 881-890, 2005.

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.

HANAHAN, D. WEINBERD, R. A. The hallmarks of cancer. **CELL**. v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D. WEINBERD, R. A. The hallmarks of cancer: The next generation. **CELL**. v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HART, B. L. et al. Neutering of German Shepherd Dogs: associated joint disorders, cancers and urinary incontinence. **Veterinary Medicine and Science**. v. 2, p. 191-199, 2016.

HART, B. L. et al. Assisting decision-making on age of neutering for mixed breed dogs of five weight categories: associated joint disorders and cancers. **Frontiers in Veterinary Science**. v. 7, n. 472, p. 1-6. 2020.

HAYES, M.G.; 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 carcinomas. **Cancer research**, v.67, n.5, p 2072-2080, 2007.

IBRAHIM, E. C. et al. Serinearginine-rich protein-dependent suppression of exon skipping by exonic splicing enhancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 102, n. 14, p. 5002-5007, 2005.

ISHIMOTO, T. et al. CD44 Variant Regulates Redox Status in Cancer Cells by Stabilizing the xCT Subunit of System xc⁻ and Thereby Promotes Tumor Growth. **Cancer Cell**. V. 19, p. 387-400, 2011.

KABIR, F. M. L. et al. Estrogen receptor- α , progesterone receptor, and c-erbB/HER-family receptor mRNA detection and phenotype analysis in spontaneous canine models of breast cancer. **Journal of Veterinary Science**. v. 18, n. 2, p. 149-158, 2017.

KANAE, Y.; et al. Expression of the PTEN tumor suppressor gene in malignant mammary gland tumors of dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v. 67, n. 1, p. 127-133, 2006.

KARNI, R. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. **Nature Structural & Molecular Biology**. v. 14, n. 3, p. 185-193, 2007.

KELSIE, J. L. GAMMON, M D. JOHN, E. M. Reproductive Factors and Breast Cancer. **Epidemiologic Reviews**. v. 15, n. 1, p. 36-47, 1993.

KURLENDER, L. et al. A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1755, p. 1-14, 2005.

IM, K. S.; et al. Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. **The Veterinary Journal**. V. 195, p. 366-372, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estatística para câncer de mama. 20 jul. de 2020. Disponível em: <http://www.oncoquia.org.br/conteudo/estatisticas-para-cancer-demama/6562/34/#:~:text=O%20Instituto%20Nacional%20de%20C%C3%A2ncer,a%20cada%20100%20mil%20mulheres>. Acesso: 14 fev. de 2021.

KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Increased Expression of BRCA2 and RAD51 in Lymph Node Metastases of Canine Mammary Adenocarcinomas. **Veterinary Pathology**. v. 46, p. 416-422, 2009.

LADOMERY, M. Aberrant Alternative Splicing Is Another Hallmark of Cancer. **International Journal of Cell Biology**. v. 2013, p. 1-6, 2013.

LAU, W. M. et al. CD44v8-10 Is a Cancer-Specific Marker for Gastric Cancer Stem Cells. **Cancer Research**. v. 74, n. 9, p. 2630-2641, 2014.

LIBERATI, A.; et al. PRISMA statement for reporting of systematic review and meta-analysis of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. **Annals of internal medicine**. v. 151, n. 4, p. 65-94, 2009.

LIN, J. C. Elevated SRPK1 lessens apoptosis in breast cancer cells through RBM4-regulated splicing events. **RNA**. v. 20, p. 1621-1631. 2007.

LONG, J. C. e CACERES, J. F. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. **Biochemical Journal**. v. 417, p. 15-27, 2009.

Martinez-Montiel, N. et al. Alternative splicing as a target for cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 19, n.545, p. 1-28, 2018.

MOL, J. A. et al. New Insights in the Molecular Mechanism of Progestin-induced Proliferation of Mammary Epithelium: Induction of the Local Biosynthesis of Growth Hormone (GH) in the Mammary Gland of Dogs, Cats and Humans. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 57, n.1/2, p. 67-71, 1996.

MORRIS, D. L. e RUI, L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**. v. 297, p. 1247-1259, 2009.

NIEHOFF, N. M. WHITE, A. J. SANDLER, D. P. Childhood and teenage physical activity and breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 164, n. 3, p. 697-705, 2017.

NIETO, A., et al. BRCA1 Expression in Canine Mammary Dysplasias and Tumours: Relationship with Prognostic Variables. **Journal of Comparative Pathology**. v. 128, p. 260-268, 2003.

NILSEN, T. W.; GRAVELEY, B. R. Expansion of eukaryotic proteome by alternative splicing. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 457-463, 2010.

NISHIKAWA, T. et al. Adenoviral-mediated mda-7 expression suppresses DNA repair capacity and radiosensitizes non-small-cell lung cancer cells. **Oncogene**. V. 23, p. 7125-7131, 2004.

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

PAN, Q.; et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. **Nature Genetics**. v. 40, n. 12, p. 1413-1415, 2008.

PANG, L. e ARGYLE, D. J. Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1792, P. 380-391, 2009.

PARK, J. e SCHERER, P. E. Leptin and cancer: from cancer stem cells to metastasis. **Endocrine-Related Cancer**. v. 18, n. 4, p. 25-29, 2011.

PATEL, K. J.; et al. Involvement of Brca2 in DNA Repair. **Molecular Cell**. v. 1, p. 347-357, 1998.

PINHO, S.S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; REIS, C.A.; GARTNER, F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research**, v.159, n.3, p. 165-172, 2012.

RIVERA, P.; et al. Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. **American Association for Cancer Research Journals**. V. 69, n. 22, p. 8770-8774, 2009.

ROSS, R. J. M. et al. A Short Isoform of the Human Growth Hormone Receptor Functions as a Dominant Negative Inhibitor of the Full-Length Receptor and Generates Large Amounts of Binding Protein. **Molecular Endocrinology**. v. 11, n. 03, p. 265-273, 1997.

SANDEY, M. et al. Characterization of the canine mda-7 gene, transcripts and expression patterns. **Gene**. v. 547, n. 1, p. 23-33, 2014.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 43, p. 1249-1261, 1969.

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

STERENCZAK, K. A et al. Cloning, characterization, and comparative quantitative expression analyses of receptor for advanced glycation end products (RAGE) transcripts forms. **Gene**. v. 434, p. 35-42, 2009.

SUGIURA, T. et al. Expression Patterns of BRCA1 splicing variants in canine normal tissue and mammary gland tumors. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 69, n. 6, p. 587-592, 2007.

TAGUCHI, A. et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. **Nature**. v. 405, p. 354-360, 2000.

TANABE, A. et al. Functional analysis of CD44 variants and xCT in canine tumours. **Veterinary Medicine Science**. v. 1, p. 1-9, 2020.

TAMMARO, C. et al. BRCA1 exon 11 alternative splicing, multiple functions and the association with cancer. **Biochemical Society Transactions**. v. 40, p. 768-772, 2012.

TESI, M. et al. Role of body condition score and adiponectin expression in the progression of canine mammary carcinomas. **Veterinary Medicine Science**. v. 6, p. 265-271, 2020.

TSAI, K. L.; Guyon, R.; Murphy, K. E. Identification of isoforms and RH mapping of canine KIT. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 102, p. 261-263, 2003.

VALERO III, V. MDA-7 results in downregulation of AKT concomitant with apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells. **Cancer Gene Therapy**. V. 18, n. 7, p. 1-17, 2011.

WILLIAMS, V. W. Association of Combined Estrogen–Progestogen and Progestogen-Only Contraceptives with the Development of Cancer. **The Linacre Quarterly**. v. 85, n. 4, p. 412-452, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Breast cancer now most common form of cancer: WHO taking action. 03 fev. de 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/03-02-2021-breast-cancer-now-most-common-form-of-cancer-who-taking-action>. Acesso em: 14 fev. de 2021.

YANG, Q.; et al. Aberrant alternative splicing in breast cancer. **Journal of Molecular Cell Biology**. v. 10, n. 11, p. 920-929, 2019.

YOSHIKAWA, Y. et al. Reduced canine BRCA2 expression levels in mammary gland tumors. **BioMed Central Veterinary Research**. v. 11, n. 159, p. 1-8, 2015.

YOSHIKAWA, Y. et al. Reduced translation efficiency due to novel splicing variants in 5' untranslated region and identification of novel cis-regulatory elements in canine and human BRCA2. **BMC Molecular and Cell Biology**. v. 22, n. 2, p. 1-13.

ZAFFARONI, N. et al. Transcription and alternative splicing of telomerase reverse transcriptase in benign and malignant breast tumours and in adjacent mammary glandular tissues: implications for telomerase activity. **Journal of Pathology**. V. 198, p. 37-46, 2002.

ZHANG, J. AND POWELL, S.N. The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. **Molecular Cancer Research**. v. 3, p. 531–539, 2005.